

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»**

АНДРІЯШ ГАННА СЕРГІЇВНА

УДК 612.398:547.965

**ОТРИМАННЯ ШТАМІВ *BREVIBACTERIUM* З ПІДВИЩЕНИМИ
РІВНЯМИ СИНТЕЗУ ЛІЗИНУ ТА ТРЕОНІНУ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі промислової та харчової біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

Науковий керівник: Кандидат фізико-математичних наук, старший науковий співробітник

Шульга Сергій Михайлович,

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу промислової та харчової біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Пирог Тетяна Павлівна,

Національний університет харчових технологій МОН України, завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

доктор біологічних наук, професор

Дуган Олексій Мартем'янович,

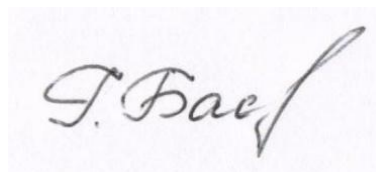
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут» МОН України, декан факультету біотехнології і біотехніки

Захист відбудеться 10 грудня 2015 р. об 11:00 год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, тел. (044) 343 37 77, e-mail: d26.254.01@ukr.net.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.

Автореферат розісланий 09 листопада 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.б.н.



Г. Я. Баєр

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Амінокислоти – органічні кислоти, що містять одну чи кілька аміногруп, найважливіші азотовмісні речовини в живій клітині. Всі α -амінокислоти (крім гліцину) мають асиметричний α -вуглецевий атом та існують у двох ізомерних формах. Незамінні амінокислоти не синтезуються в організмах людини та вищих тварин і повинні надходити в організм з продуктами харчування. Для організму людини та більшості тварин незамінними є гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і валін. Незамінні амінокислоти; повинні бути присутніми в їжі для підтримки необхідного азотистого балансу в організмі людини. Дефіцит незамінних амінокислот в організмі призводить до порушень обміну речовин, зупинки росту, зниження маси тіла.

Можливі три способи промислового отримання незамінних амінокислот: гідроліз білків рослинного і мікробного походження, мікробіологічний і хімічний синтез. Більше 70% усіх вироблених промисловістю чистих препаратів амінокислот отримують шляхом мікробіологічного синтезу. На другому місці за обсягом виробництва знаходиться хімічний синтез. Основним недоліком хімічного синтезу є отримання суміші амінокислот, що складаються з ізомерів D- і L-ряду, тоді як біологічною активністю в організмі людини і тварин володіють лише L-ізомери. Технології одержання амінокислот за рахунок гідролізу білків економічно менш вигідні, тому не отримали широкого розповсюдження. При мікробіологічному синтезі утворюються L-амінокислоти, що є продуктами життєдіяльності спеціально підібраних і відселектованих штамів мікроорганізмів, які здатні накопичувати в культуральній рідині необхідну кількість амінокислоти (Виестур, 1987; Шлегель 2005; Пирог, 2009; Підгорський, 2010). Звичайні мікроорганізми не здатні синтезувати необхідні амінокислоти в потрібній кількості, тому використовують мутанти мікроорганізмів, отримані за допомогою хімічних і фізичних мутагенів.

Досить часто для мікробіологічного синтезу амінокислот використовують ауксотрофні мутантні штами, які одержують методами звичайної селекції або генної інженерії (Koffas, 2005, Ikeda et al., 2007, Haleem, 2012). За допомогою мутагенних факторів у таких ауксотрофних штамів індукується мутація, в результаті якої припиняється або інгібується синтез одного з продуктів, що регулюють ферментні системи, каталізують утворення даної амінокислоти в клітинах мутанта і в культуральній рідині.

На теперішній час найбільше біотехнологічних розробок присвячено мікробіологічному синтезу лізину (продуценти родів *Brevibacterium* і *Corynebacterium*) (Удровский и др., 1978; Hermann, 2003; Leuchtenberger, 2005), також запропоновано способи біотехнологічного отримання ізолейцину, лейцину, триптофану і треоніну (за використання *E. coli*) (Debabov, 2003).

За вартістю продукції мікробіологічне виробництво амінокислот поступається тільки виробництву антибіотиків, проте займає перше місце в світі за тоннажем (на 2013 рік виробляли приблизно 1,6 млн. т лізину та 350,0 тис. т треоніну) (Шевелуха и др., 2008). Потреби сільського господарства, харчової промисловості та медицини зумовлюють інтенсивний розвиток промислового виробництва амінокислот,

зростання виробництва лізину та треоніну складає близько 10% на рік. В Україні виробництво лізину та треоніну відсутнє.

Для створення ефективної промислової (комерційної) технології виробництва амінокислот з максимальним накопиченням кінцевого продукту потрібно мати високопродуктивні штами-продуценти, знайти оптимальні умови культивування і використовувати дешеві субстрати. Окрім цих чинників, накопичення незамінних амінокислот можна також збільшити, змінивши метаболічні шляхи синтезу.

Наведене обумовлює актуальність отримання нових активних штамів-продуцентів лізину та треоніну, дослідження їх біологічних властивостей, механізмів адаптації до засвоєння субстратів та можливості використання вказаних мікроорганізмів для біотехнології незамінних амінокислот.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в рамках відомчих тематик відділу промислової та харчової біотехнології «Розробити наукові основи біотехнологічного процесу одержання харчової добавки – лізину» (2003-2005) № державної реєстрації 0103U005800; «Розроблення наукових основ біотехнології незамінних амінокислот; Створення генетично модифікованого (ГМ) штаму продуценту лізину *Brevibacterium sp.*» (2007-2011) № державної реєстрації 0107U000443; «Розроблення наукових основ біотехнології незамінних амінокислот треоніну та триптофану» (2009-2013) № державної реєстрації 0109U0000471.

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – отримання мутантних штамів-продуцентів лізину та треоніну роду *Brevibacterium*, вивчення біологічних особливостей та визначення біосинтетичної здатності до підвищеного синтезу цільових амінокислот перспективними штамми.

Для досягнення визначеної мети сформульовано такі завдання:

- здійснити клоновий аналіз штамів-продуцентів;
- провести фізичний (УФ) мутагенез продуцентів лізину та треоніну;
- провести хімічний мутагенез за допомогою N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину продуцентів лізину та треоніну;
- відібрати найбільш продуктивні за цільовими амінокислотами ауксотрофні та аналогорезистентні штами-мутанти;
- дослідити морфологічні та біохімічні властивості мутантних штамів;
- провести порівняльне секвенування гена 16S рРНК вихідних та мутантних штамів;
- оптимізувати умови культивування мутантних штамів.

Об'єкт дослідження – мікробіологічний синтез незамінних амінокислот лізину та треоніну.

Предмет дослідження – зміна рівня синтезу амінокислот лізину та треоніну штамми роду *Brevibacterium* за допомогою мутагенезу та підбору умов культивування.

Методи дослідження – мікробіологічні (визначення ауксотрофності), біохімічні (визначення концентрації амінокислот, амонійного азоту, редукуючих речовин), молекулярно-генетичні (виділення ДНК, проведення

ПЛР), фізико-хімічні (фізичний та хімічний мутагенез) та статистичне оброблення результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено після дії УФ-опромінення здатність до надсинтезу лізину та треоніну штамми *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 та *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446, відповідно. Філогенетичний аналіз гена 16S рРНК вихідних та мутантних штамів-продуцентів лізину та треоніну дозволив встановити, що гомологія нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК вихідного штаму-продуценту лізину *Brevibacterium sp.* 90 та мутантного штаму *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 складає 98%. Проведений філогенетичний аналіз штаму-продуценту треоніну *B. flavum* ІМВ В-7446 дозволив переглянути його систематичне положення, як наслідок, штам *B. flavum* ІМВ В-7446 відноситься до виду *Corynebacterium glutamicum*. Вперше встановлено послідовності гена 16S рРНК штамів *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 та *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*). Послідовності гена 16S рРНК штамів *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 та *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) зареєстровано в базі даних "GenBank" (реєстраційні номери КТ151946 та КТ151948, відповідно). Вибір різних цукрів та джерел азоту і оптимізація параметрів культивування (температури, рН середовища, ступеню аерації, кількості ростових речовин) мутантних штамів дозволили збільшити накопичення лізину та треоніну в культуральному середовищі.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами багатостадійної селекції отримані перспективні штамми-продуценти треоніну та лізину *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) та *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447, відповідно. За допомогою фізичного (УФ) мутагенезу отримано перспективні стабільні мутантні штамми-продуценти лізину та треоніну, що поповнюють Колекцію штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України». Культури депоновані в «Національному Депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Комплекс проведених досліджень дозволив збільшити продукування треоніну штамом *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) та лізину штамом *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 в порівнянні з вихідними культурами в 6 та 8 разів, відповідно. Результати роботи є ключовою ланкою для подальшого дослідження направлених мутацій в геномі продуцентів під впливом різних мутагенів для підвищення рівня синтезу амінокислот. Отримані результати є науковим підґрунтям для отримання промислових штамів-продуцентів незамінних амінокислот.

Особистий внесок здобувача полягає у розв'язанні завдань роботи, аналізуванні літературних даних, плануванні і проведенні експериментів у лабораторних умовах, узагальненні та інтерпретації отриманих результатів, встановленні закономірностей, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до публікації. Спільно з керівником роботи були поставлені завдання дисертаційної роботи та проводились консультації і обговорення результатів досліджень.

Апробація результатів. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися на міжнародних науково-практичних конференціях: Міжнародний конгрес «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 2007

г., 2009 г., 2011 г., 2013 г.); III International Conference “BioMicroWorld 2009” (Lisbon, Portugal, 2009); Первая конференция молодых ученых «Биология растений и биотехнология» ИПБГ НАН Украины (Украина, Белая Церковь, 2011 г.); Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених та студентів (Київ, КП, 2011 р.); 77-а наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів (Київ, НУХТ, 2011 р.); 15th European Congress on Biotechnology «New biotechnology» (Turkey, Istanbul, 2012); XII конференція молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Київ, 2012 р.); Всеукраїнська науково-практичної конференція, присвячена 115 річниці заснування НТУУ «КП» «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2013); Друга конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 2013 р.); VIII Всеукраїнська науково-практична конференція, присвячена 200 річниці з дня народження Т.Г. Шевченка «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2014 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 19 наукових праць, у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях, що рекомендовано МОН України, 12 тез доповідей наукових конференцій, 1 розділ в монографії.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, шістьох розділів, висновків, додатків та списку використаних джерел з 189 найменувань. Матеріали дисертації викладені на 142 сторінках, містять 33 рисунки, 13 таблиць і два додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Літературний огляд присвячено загальній характеристиці незамінних амінокислот, зокрема лізину та треоніну, різним способам отримання амінокислот та шляхам регуляції біосинтезу через діамінопімеліновий шлях. Також наведено способи інтенсифікації біосинтезу лізину та треоніну та методи отримання стійких штамів-продуцентів цільових амінокислот.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для досліджень використовували *B. flavum* ТН-7, *Brevibacterium sp.* УКМ Ас-674 (*Brevibacterium sp.* 90), *Brevibacterium sp.* ІМВ Ас-5004 (*Brevibacterium sp.* 90Н), *Brevibacterium sp.* УКМ Ас-675 (*Brevibacterium sp.* Е531), мутантний штам *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 та мутантний штам *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7446 з Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (далі Колекція).

Для вирощування штамів-продуцентів лізину та треоніну використовували повноцінні живильні середовища: м'ясо-пептонний агар (МПА) (г/дм³): поживний бульон – 23,0, агар – 30,0, вода дистильована, рН 7,0 та м'ясо-пептонний агар збагачений (МПАзб.) (г/дм³): поживний бульон – 23,0, глюкоза – 1,0, дріжджовий екстракт (ДЕ) – 5,0, агар – 30,0, вода дистильована, рН 7,0. В окремих експериментах у середовищі МПА замінювали глюкозу на сахарозу.

Як інокуляційне використовували середовище наступного складу (г/дм³): м'яса – 30,0, NH₄Cl – 5,0, ДЕ – 3,0. Інокулянт вносили у ензиматичне середовище у кількості від 10% до 20% в залежності від досліду.

Для визначення ауксотрофності клітин *Brevibacterium* брали суспензію дводобової культури з концентрацією клітин $1,5 \times 10^{10}$ КУО/дм³, переносили в мінімальне середовище (МС) наступного складу (г/дм³): сахароза (або глюкоза) – 30,0, (NH₄)₂SO₄ – 10,0, KH₂PO₄ – 2,0, MgSO₄ – 0,4, агар – 30,0 з досліджуваною амінокислотою або ензиматичне середовище наступного складу (г/дм³): м'яса – 160,0, (NH₄)₂SO₄ – 15,0; KH₂PO₄ – 0,5; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄ x7H₂O – 0,25; FeSO₄ x7H₂O – 0,01; MnSO₄ xH₂O – 0,01; ZnSO₄ x7H₂O – 0,001; CuSO₄ – 0,2; NiCl₂ – 0,02; ДЕ – 5,0, після стерилізації вносили суху стерильну крейду до концентрації 1%. Глюкозу, сахарозу та амінокислоти вносили в мінімальне середовище окремо після стерилізації. Розчини амінокислот готували з застосуванням стерильної дистильованої води (190 мг на 0,025 дм³), автоклали 15 хв при 0,5 атм. Стерильні розчини вносили по 0,4 см³ в розплавлене мінімальне середовище (0,05 дм³), перемішували та розподіляли на чашки Петрі. Культивування протягом трьох діб здійснювали в колбах Ерленмейера об'ємом 0,25 дм³ з 0,003 дм³ середовища за температури 30±1 °С і 240 об/хв в шейкері-інкубаторі "BIOSAN" ES-20 (Латвія).

Вміст різних компонентів середовища змінювали в залежності від поставленого завдання. Джерела вуглецю – глюкозу, фруктозу, сахарозу вносили в середовище із розрахунку 40 г/дм³. Концентрація Na₂CO₃ варіювала від 0,1 до 0,5 г/дм³; проліну від 0,4 до 2,0 г/дм³; тіаміну HCl $1-5 \cdot 10^{-3}$ г/дм³; біотину $1-5 \cdot 10^{-4}$ г/дм³; ДЕ 0,5-2,5 г/дм³; ізолейцину та метіоніну від 0,1 до 0,5 г/дм³.

Для культивування продуцентів треоніну використовували м'ясне середовище I наступного складу (г/дм³): м'яса – 160,0, кукурудзяний екстракт – 40,0; (NH₄)₂SO₄ – 15,0; KH₂PO₄ – 0,5; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄ x7H₂O – 0,25; біотин – $3,0 \times 10^{-4}$; лейцин – $2,0 \times 10^{-4}$; FeSO₄ x7H₂O – 0,01; MnSO₄ xH₂O – 0,01; ZnSO₄ x7H₂O – 0,001; CuSO₄ – 0,2; NiCl₂ – 0,02.

Для визначення ефективності альтернативних джерел вуглецю використовували бурякову м'якоть, молочну сироватку і синтетичне середовище. В цьому випадку використовували м'ясне середовище II наступного складу (г/дм³): м'яса – 160,0; (NH₄)₂SO₄ – 15,0; KH₂PO₄ – 0,5; K₂HPO₄ – 0,5; ДЕ – 2,5; а також сироваткове середовище наступного складу (г/дм³ молочної сироватки): глюкоза – 80,0; (NH₄)₂SO₄ – 15,0; пептон – 1,0; ДЕ – 2,5. В середовища додатково вносили амінокислоти в кількості 0,0025 г/дм³: метіонін, лізин, ізолейцин, або біотин в кількості 0,002 г/дм³.

Дослідження ауксотрофності здійснювали згідно методики (Pometto et al., 2005), модифікованої для потреб бактеріальних продуцентів та поживних середовищ.

Згідно з методикою (Yetti et al., 2004) проведено УФ опромінення (використовували дві лампи «Phillips» потужністю 30 Вт кожна, $\lambda=254$ нм, відстань до об'єкту опромінення – 0,12 м) бактеріальних суспензій за кімнатної температури протягом 60 – 720 с з інтервалом 60 с.

Хімічний мутагенез здійснювали наступним чином: бактеріальну суспензію вибраних клонів витримували на шейкері (220 об/хв) за температури 30-32°C протягом 5-30 хв у Трис-малат буфері (рН 6,0), що містив від 100 до 500 мкг/дм³ N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину (NTG). Потім клітини промивали у 0,1 М Трис-фосфатному буфері з рН 7,2. Бактеріальну суспензію, отриману методом розведень розсівали на чашки Петрі на мінімальне середовище з аналогом лізину – S-(2-аміноетил)-L-цистеїн (АЕЦ) та треоніну – β-гідроксинорвалін (НВ). Кількість клітин, що виживали, визначали за кількістю колоній штамів бревібактерій, що вирости на МПАЗб.

Для виділення ДНК клітини бактерій брали з одnodобової культури, отриманої на м'ясо-пептонному агарі, збагаченому (МПБзб.) за температури 31±1°C в умовах аерації за 220 хв⁻¹. ДНК виділяли за стандартною процедурою для грампозитивних бактерій (Wilson, 2001). Для більш ефективного лізису клітин додавали 1% лізоциму (10 мг/мл). Виділену ДНК досліджували за допомогою горизонтального електрофорезу та ПЛР (Edwards et al., 2004, Freidberg et. al., 1995, Griffith et. al., 2000). Електрофоретичне розділення виділеної ДНК проводили в 1%-му агарозному гелі в Трис-ацетатній буферній системі. Молекулярну масу фрагментів ДНК визначали за їх електрофоретичною рухливістю, використовуючи ДНК маркер (1kb Fermentas SM1163).

Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали за допомогою універсальних бактеріальних праймерів 27f та 907r (27F 5'-AGAGTTTGATGGCTCAG-3'; 907r 5'-CCGTCAATTCCATTTGAGTTT-3') та 27f і 1492r (27F 5'-AGAGTTTGATGGCTAG-3'; 1492r 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT T-3'). ПЛР проводили на ампліфікаторі «Mastercycler personal 5332» (Eppendorf). Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера з сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази (Fermentas), 2,0 мМ хлориду магнію, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 2,0x10⁻⁴ дм³.

Після ампліфікації генів нуклеотидну послідовність отриманого амплікону визначали за допомогою сиквенатору «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems). Результуючий контиг сиквенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотньокомплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних «GenBank». Молекулярно-філогенетичний аналіз здійснено за допомогою методу максимальної правдоподібності. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей в програмі ClustalW та побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків. Філогенетичний аналіз був проведений в програмі MEGA6.

Кількість синтезованих цільових амінокислот визначали за допомогою амінокислотного аналізатору «AAA-400» (Ingos, Чехія) та тонкошарової хроматографії (пластини Silufol 20x20). Кількість біомаси визначали за зміною

оптичної густини. Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопу “Laboval4” (“Carl Zeiss”, Німеччина). Знімки робили фотоапаратом “Canon PowerShot A640” (Японія).

Статистичну обробку даних здійснювали, використовуючи програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 3 повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною при $p < 0,05$ (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Клоновий аналіз штамів-продуцентів лізину та треоніну. Дослідження розпочинали з культивування продуцентів лізину в періодичних умовах на мелясному середовищі та виявлення спонтанних мутантів. Наприкінці кожної ферментації розсівали культуральну рідину в чашки Петрі на збагаченому поживному середовищі, основним компонентом якого використано м'ясо-пептонний бульон (МПБ). На цьому агаризованому середовищі поряд з типовими (випуклими, блискучими, жовтувато-лимонного кольору) колоніями *Brevibacterium sp.* виявлено колонії, які не утворювали жовтого пігменту і мали біло-сіре забарвлення (безпігментні). Кількісне співвідношення колоній жовто-лимонного кольору і відмінних від них за забарвленням складало 12:8 для всіх клонів. Дослідження проводили з культурами *Brevibacterium sp.* 90 Н, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531 та *B. flavum* ТН7 в періодичних умовах культивування протягом 72 годин на ензиматичному середовищі. Штам *B. flavum* утворював окремі колонії тільки жовтого кольору. Максимальну кількість лізину утворювали клони на 60 год культивування, жовті колонії показували вищий рівень синтезу амінокислоти. З кожного типу колоній було отримано клони з номерами згідно табл. 1 та проведено дослідження їх біосинтетичної активності.

У процесі культивування на збагаченому середовищі протягом 60 годин клони №2, №5, №8 (білі колонії) і №6, №7, №11 (жовті колонії) продукували більше лізину (концентрація лізину складала 8,7; 9,4; 9,5 та 10,0; 12,6; 11,7 г/дм³, відповідно) ніж інші клони, що утворювали колонії з таким же забарвленням. Для перевірки ауксотрофності досліджували вищезгадані клони, які продукували більше лізину.

Встановлення ауксотрофності проводили на твердих живильних середовищах. Позитивний контроль проводили на повноцінному середовищі МПАзб, яке містило всі необхідні фактори росту. Клони, які росли при позитивному контролі, не росли на МС як з глюкозою, так і з сахарозою.

Для кожного клону проводили паралельні посіви на МС з амінокислотами. Джерелом вуглецевого живлення були глюкоза та сахароза. Проте на середовищі з глюкозою більшість клонів не проявляли ауксотрофність і не давали пігментації.

Бревібактерії слабо утворювали пігмент на МС, проте проявляли ауксотрофність по відношенню більш широкого кола амінокислот (табл. 2).

Накопичення лізину клонами штамів *Brevibacterium* на 60 год культивування на ферментаційному мелясному середовищі

№ клону	Пігмент	Концентрація лізину, г/дм ³
<i>Brevibacterium sp. 90H</i>		
1	пігментовані	7,30±0,40
2	безпігментні	8,70 ± 0,50
3	безпігментні	7,30 ±0,35
4	пігментовані	5,70 ±0,30
5	безпігментні	9,40 ±0,50
6	пігментовані	10,00 ±0,55
<i>Brevibacterium sp. 90</i>		
7	пігментовані	12,60 ±0,55
8	безпігментні	9,50 ±0,45
9	пігментовані	6,50 ±0,35
10	пігментовані	4,50 ±0,30
<i>Brevibacterium sp. E531</i>		
11	пігментовані	11,70 ±0,50
12	пігментовані	5,70 ±0,30
13	безпігментні	6,30 ±0,35
14	пігментовані	4,50 ±0,30
15	безпігментні	4,50 ±0,30
<i>B. flavum</i>		
16	пігментовані	4,00±0,25

Таблиця 2

Визначення ауксотрофності клонів *Brevibacterium* на агаризованому МС з сахарозою

Середовища, амінокислоти	Клони					
	2	5	6	7	8	11
Контроль МПБзб.	+++	+++	+++	+++ п	+++	+++п
Контроль МС	-	-	-	-	-	-
Аспарагін	-	-	-	-	-	-
Треонін	-	-	++	-	+	+
Ізолейцин	-	-	+	-	+	-
Лейцин	+++	+++	+++	+++ п	+++ п	+++п
Тирозин	-	-	-	-	+	-
Метіонін	-	+	++	+ п	-	+
Триптофан	+	+	+++	-	-	+
Гомосерин	+	-	+++	-	-	+

Примітка: +++ - інтенсивний ріст; + - наявність росту; - - відсутність росту; п- жовтий пігмент.

Як видно з табл. 2 всі клони були лейцинозалежними і набули ауксотрофності до інших амінокислот, а саме: метіоніну – клони № 5, 7, 11, треоніну – клони № 8, 11, ізoleyцину – клон №8, триптофану – клони № 2, 5, 11 та гомосерину – клони № 2, 11.

На наступному етапі досліджень було здійснено культивування штамів-продуцентів на рідкому середовищі МС з амінокислотами тільки аспартатної родини. Серед всіх продуцентів вибрано найбільш продуктивні клони за лізином – № 6, № 7, № 11. На рідкому середовищі МС з різними амінокислотами було підтверджено ауксотрофність за лейцином та метіоніном клону № 7, який інтенсивно ріс, продукуючи пігмент, змінюючи рН середовища, синтезуючи лізин та інші амінокислоти.

Досліджено ауксотрофність щодо амінокислот продуцента треоніну *B. flavum* ТН7. На мінімальному та інших середовищах з амінокислотами не виявлено ріст бактерій, окрім росту на середовищах з серином і лейцином, тобто *B. flavum* ТН7 є ауксотрофом за цими амінокислотами.

Рівень синтезу треоніну штамом *B. flavum* був низький, тому подальші дослідження були спрямовані на отримання продуктивних мутантних штамів за допомогою мутагенезу.

Отримання мутантних штамів-продуцентів лізину та треоніну. Життєздатність клітин під дією УФ змінювалась в залежності від тривалості опромінення. Для трьох штамів *Brevibacterium sp.* летальною дозою було опромінення протягом 4-5 хв. Оптимальним терміном для мутагенезу встановлено 3 хв. Для накопичення летальної дози *B. flavum* ТН7 було необхідно опромінювати протягом 12 хв, а оптимальний термін опромінення для мутагенезу складав 10 хв (рис. 1).

Критерієм відбору штамів-продуцентів була стійкість до антиметаболітів або аналогів амінокислот. Отримані мутантні штами перевіряли на продукування лізину та треоніну (рис. 2). Штами, які найбільше синтезували лізин та треонін, відібрали для подальших досліджень.

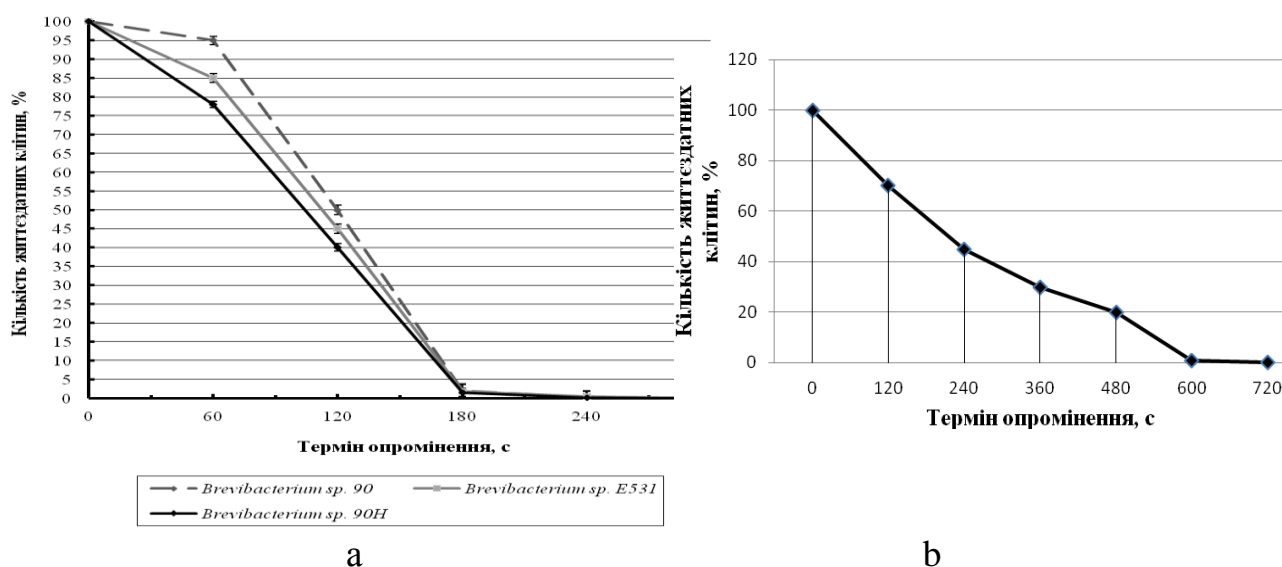


Рис. 1. Життєздатність клітин *Brevibacterium sp.* (а) та *B. flavum* ТН7 (б) під дією УФ опромінення.

Стійкість до аналогів можуть викликати мутації, які просто блокують їх надходження в клітини. Було проведено декілька етапів селекції отриманих штамів з використанням поступового підвищення концентрації аналогу лізину – АЕЦ та аналогу треоніну – β -гідроксинорваліну. Концентрацію аналогів змінювали від $0,25 \text{ мг/дм}^3$ до $0,4 \text{ мг/дм}^3$. Отримано АЕЦ-стійкі продуценти лізину з частотою мутацій $(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ і НВ-стійкі продуценти треоніну з частотою мутацій $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-3}$.

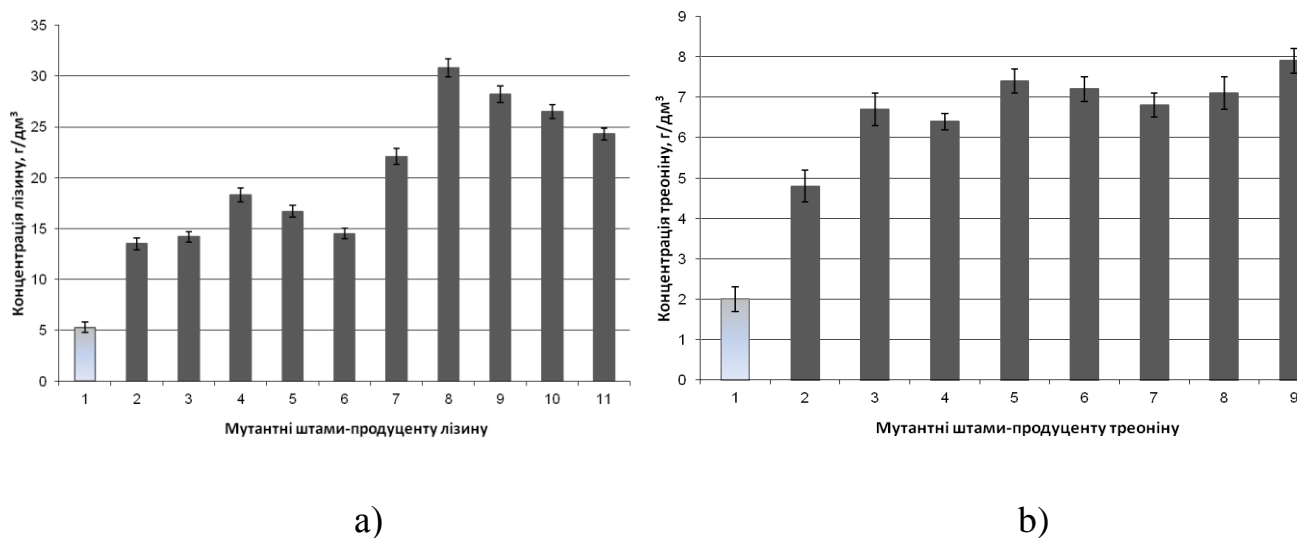


Рис. 2. Накопичення лізину та треоніну мутантними штамми *Brevibacterium*.

Примітки: а) 1 – *Brevibacterium sp.* 90 до УФ опромінення; 2-11 – отримані УФ-мутанти; б) 1 - *B. flavum* ТН7 до УФ опромінення; 2-9 - отримані УФ-мутанти.

З використанням отриманих мутантних штамів провели культивування на м'ясовому середовищі в умовах аерації при $T=31 \pm 1^\circ\text{C}$ (табл. 3). В результаті дії мутагену УФ-опромінення на продуценти лізину одержано мутантний штам *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447, який продукував майже в 5 разів більше лізину порівняно з вихідним штамом (конверсія цукру 46,4%) та мутантний штам-продуцент треоніну *B. flavum* ІМВ В-7446, який за біосинтетичною активністю та продукуванням амінокислоти відрізнявся від вихідної культури майже в 4 рази (конверсія цукру 11,8%).

Хімічний мутагенез. Життєздатність клітин штамів-продуцентів лізину та треоніну, а також отриманого мутантного штаму *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 змінювалась під дією NTG в залежності від терміну дії і концентрації речовини в межах досліджуваних величин. При дії NTG в концентрації 500 мкг/дм^3 на 2-й хвилині не залишалось життєздатних клітин. Було визначено оптимальну для мутагенезу концентрацію NTG 100 мкг/дм^3 (рис. 3). На збагаченому м'ясо-пептонному агарі були отримані колонії різного забарвлення (без пігментів, жовті і рожеві) та розмірів. Після оброблення NTG мутантного штаму *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 отримали рожеві колонії, які відібрали для подальшого визначення біосинтетичної активності щодо лізину та треоніну.

Після трьох днів культивування отримані колонії були проаналізовані. Кількість лізину та треоніну, що синтезували мутанти не перевищували їх

кількості у вихідних штамів. Рожеві колонії втратили своє забарвлення протягом 10 діб і набули жовтого забарвлення, що свідчить про нестабільність мутації. Тому подальші дослідження отриманих за допомогою NTG мутантних штамів не проводили.

Таблиця 3

Культивування мутантних штамів-продуцентів

Продуценти	Показники культуральної рідини				
	pH	Концентрація сахарози, %	Концентрація лізину, г/дм ³	Концентрація треоніну, г/дм ³	Конверсія цукру в цільову амінокислоту, %
Вихідне середовище (без продуценту)	7,7±0,1	8,2±0,5	2,0±0,1	0,9±0,1	-
Продуценти лізину					
<i>Brevibacterium sp.</i> 90	7,4±0,1	5,6±0,3	5,9±0,5	1,5±0,3	22,7±1,7
<i>Brevibacterium sp.</i> IMB B-7447	7,3±0,1	1,3±0,3	31,9±0,4	1,8±0,4	46,4±2,2
Продуценти треоніну					
<i>B. flavum</i> TH7	6,6±0,1	5,4±0,2	2,0±0,4	2,0±0,2	7,1±0,1
<i>B. flavum</i> IMB B-7446	6,7±0,1	1,5±0,3	4,5±0,5	7,9±0,3	11,8±0,2

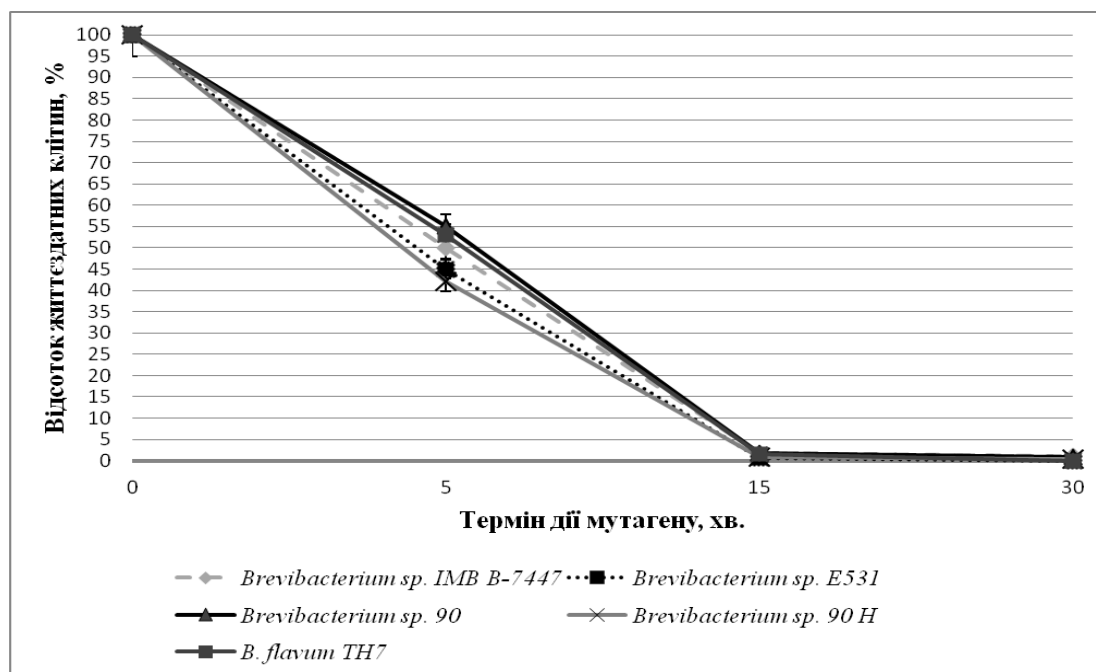


Рис. 3. Життєздатність клітин *Brevibacterium* під дією NTG.

Порівняння послідовностей гена 16S рРНК у різних штамів-продуцентів лізину та треоніну. Для визначення таксономічного положення отриманих мутантних штамів-продуцентів лізину *Brevibacterium sp.* IMB B-7447 та треоніну *B. flavum* IMB B-7446 проведено аналіз гена 16S рРНК та

філогенетичний аналіз взаємовідносин зі штамми роду *Brevibacterium* з баз даних “GenBank”.

На основі отриманих послідовностей гена 16S рРНК побудовано філогенетичне дерево для штамів *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 та *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 з Колекції та таксономічно близьких до них представників родини бревібактерій (рис. 4).

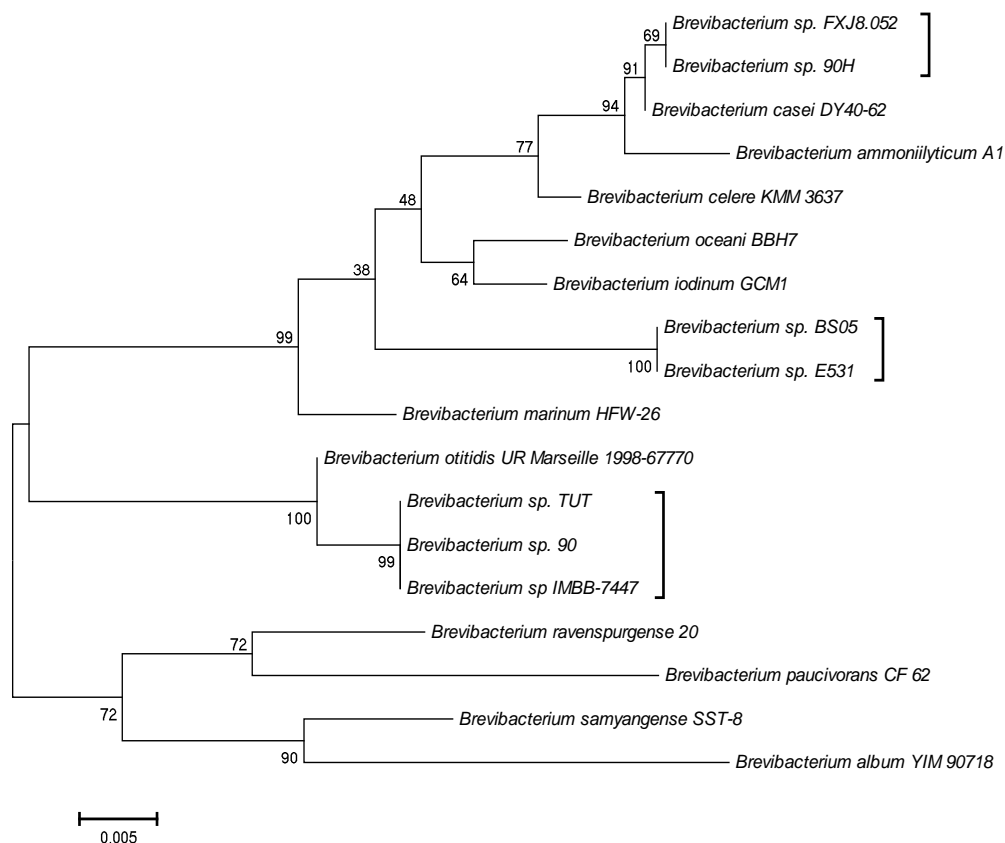


Рис. 4. Дендрограма філогенетичних взаємовідносин деяких представників роду *Brevibacterium*.

Молекулярно-філогенетичний аналіз здійснено за допомогою методу максимальної правдоподібності (maximum likelihood) з використанням моделі Тамура-Неї (Tamura-Nei) для оцінки еволюційної відстані. Кількість повторів (bootstrap) – 1000. Філогенетичне дерево представлено з найвищим значенням логарифму подібності (log-likelihood value) – 2018,5. Всього було використано 18 нуклеотидних послідовностей і в рамках кожної філогенетичної групи рівень подібності складав 97% і більше. Філогенетичне дерево, побудоване іншим, аналогічним методом приєднання сусідів (Neighbor-joining) мало таку ж топологію. Аналізування проведено в програмі MEGA6.

Належність штамів-продуцентів незамінних амінокислот аспартатної родини з Колекції до роду *Brevibacterium* підтверджено за допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК.

Досліджено дендрограму філогенетичних зв'язків штамів *B. flavum* TH7 і *B. flavum* IMB B-7446 з Колекції та філогенетично близьких представників родів *Brevibacterium* і *Corynebacterium*.

Нижче наведено філогенетичне дерево з найвищим значенням логарифму подібності (log-likelihood value) – 2171,38, побудоване за допомогою методу максимальної правдоподібності з використанням моделі Тамура-Неї для оцінки еволюційної відстані. Кількість повторів (bootstrap) – 1000 (рис. 5).

Досліджені штами на дендрограмі (рис. 5) знаходяться в одній групі з типовими штамами виду *Corynebacterium glutamicum*. Ця група виділена з 100% вірогідністю (Bootstrap аналізу) від іншої групи, утвореної представниками родів *Brevibacterium* і *Kocuria*. Таким чином, проведений аналіз показав, що штами *B. flavum* TH7 та *B. flavum* IMB B-7446 відносяться до виду *C. glutamicum*.

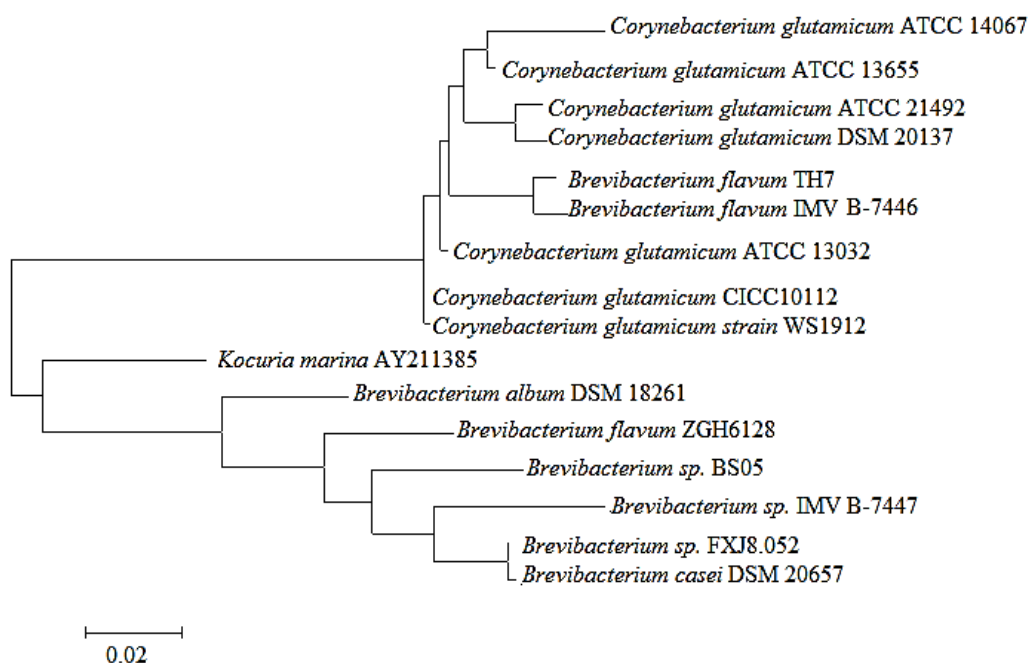


Рис. 5. Філогенетичне положення штамів *B. flavum* TH7 та *B. flavum* IMB B-7446 серед представників родів *Brevibacterium*, *Kocuria* та *Corynebacterium* на основі послідовності гена 16S рРНК.

Невідповідність при ідентифікації, виявлену на основі комплексу мікробіологічних даних і аналізу секвенування гена 16S рРНК, можна пояснити опублікованою нещодавно рекласифікацією деяких видів *Brevibacterium* як *Corynebacterium* (Vertes et al., 2013). В подальшому необхідно провести додатково детальний аналіз отриманих штамів для остаточної ідентифікації.

Оптимізація умов культивування мутантного штаму-продуценту лізину *Brevibacterium* sp. IMB B-7447. Одним із важливих етапів розроблення технологій мікробного синтезу є встановлення оптимальних умов культивування продуцента, що забезпечують найвищий синтез цільового продукту. Основні фактори, що впливають на ріст та біосинтетичну здатність штамів-продуцентів лізину це: джерела вуглецю та азоту, їх концентрації в живильних середовищах, рН, температура, концентрація розчиненого кисню, ростові субстрати, додаткове підживлення і т.д.

Оптимізацію параметрів культивування здійснювали за умов зниження інтенсивності аерації, зниження концентрації цукру в середовищі, зниження концентрації азоту в середовищі та скорочення терміну культивування.

З рис. 6 видно, що оптимальним середовищем було середовище наступного складу: джерело вуглецю – сахароза або меляса; джерело азоту – сірчанокислений амоній; ростові фактори – кукурудзяний екстракт.

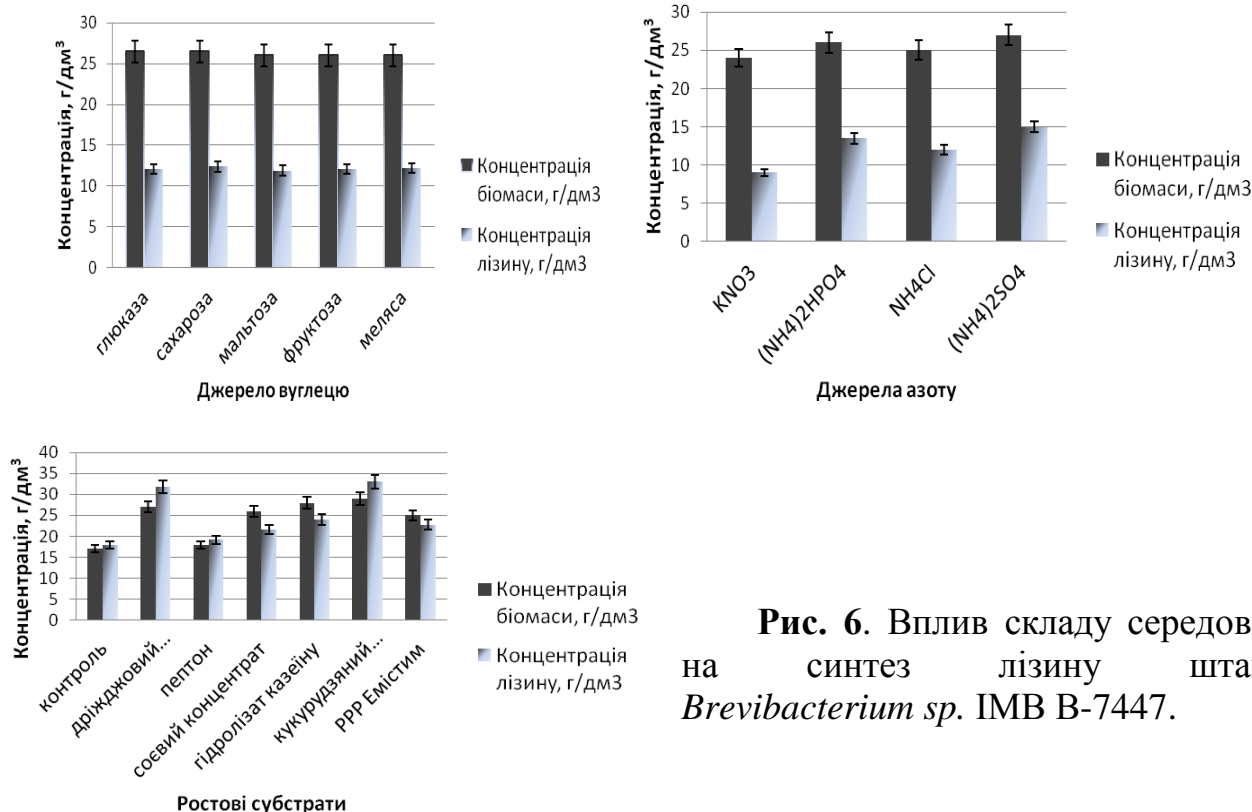


Рис. 6. Вплив складу середовища на синтез лізину штамом *Brevibacterium sp.* IMB B-7447.

Наступним етапом було встановлення кількісного складу живильних середовищ (рис. 7). Для встановлення потреби *Brevibacterium sp.* IMB B-7447 у забезпеченні середовища киснем було проведено дослідження за різних режимів аерації, які забезпечували завдяки різному співвідношенню середовища і загальним об'ємом колби (рис. 8). Колби мали об'єм 0,250 дм³ (100%), середовище вносили у кількості 0,015, 0,025, 0,030, 0,040, 0,050, 0,060 дм³, що відповідає 8, 10, 12, 20, 25 % (рис. 8). Ріст продуцента активно здійснювався за різних режимів аерації.

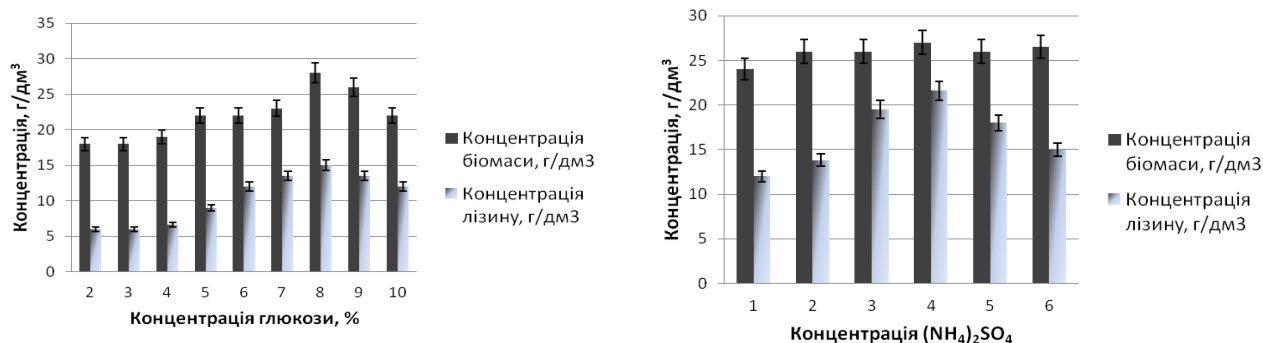


Рис. 7. Вплив різних концентрацій глюкози та сірчанокиислого амонію на синтез лізину штамом *Brevibacterium sp.* IMB B-7447.

Для синтезу лізину необхідно в 2-3 рази більше кисню ніж для синтезу біомаси, це означає, що інтенсивність аерації середовища під час росту культури має складати за сульфїтним числом не менше, ніж 3 – 4 г O_2 на 1 дм³ середовища за годину.

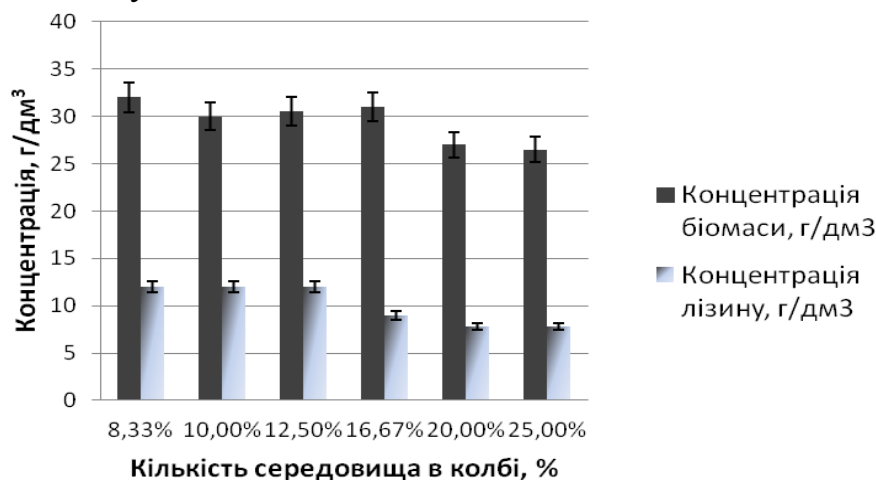


Рис. 8. Вплив режимів аерації на продукцію лізину *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447.

Досліджено динаміку використання цукрів, амонійного азоту (рис. 9) та динаміку росту штаму і синтезу лізину (рис. 10) при культивуванні *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 на оптимізованому поживному середовищі.

Як видно з рис. 9. *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 активно споживав вуглець та азот протягом 72 годин, при цьому концентрація цукрів знижувалась з 8% до 2%, азоту з 4% до 1%.

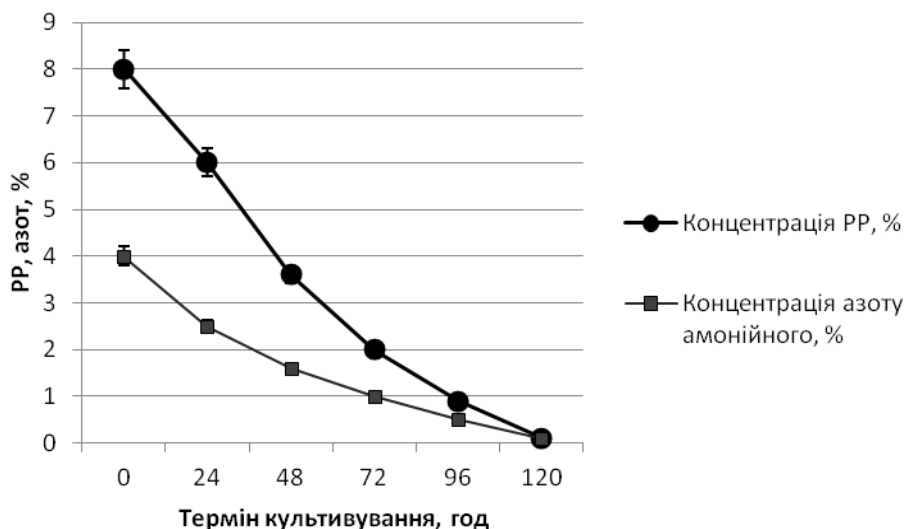


Рис. 9. Споживання редуруючих речовин (цукрів), азоту амонійного за оптимальних умов культивування *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447.

Зниження вмісту цукрів та амонійного азоту продовжувались і на 96-120 год культивування, проте видно, що на 96-120 год штам уповільнював ріст, культура починала використовувати власний лізин, концентрація останнього в культуральній рідині різко знижувалась (рис. 10). Залишкова концентрація

цукрів та азоту амонійного на 96-120 год стала лімітуючою і призвела до падіння вмісту лізину в культуральній рідині. Результати дослідження показали, що після 72 год культивування при безперервному режимі культивування доцільно ввести додаткові поживні речовини – цукри та амонійний азот, тобто підживлення, і продовжити синтез лізину за оптимальних концентрацій поживних речовин.

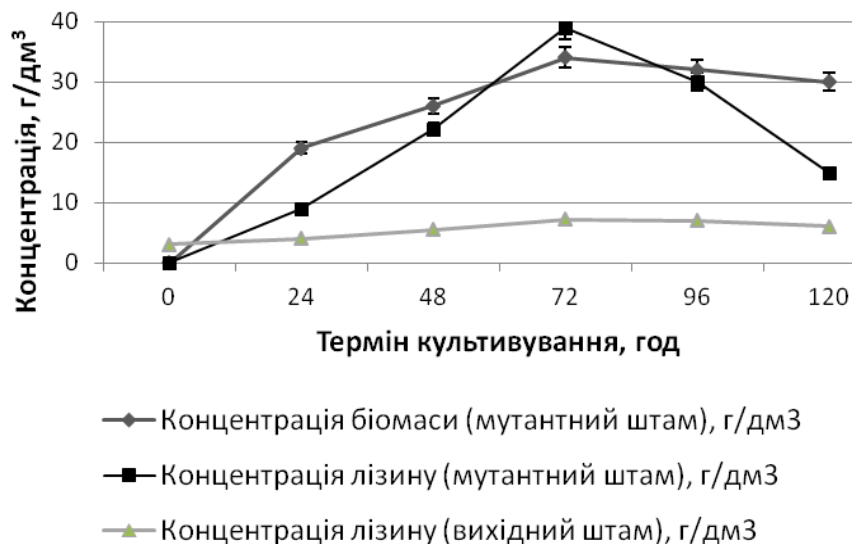


Рис. 10. Синтез біомаси, продукція лізину за оптимальних умов культивування *Brevibacterium sp.* IMB B-7447.

Оптимізація умов культивування мутантного штаму-продуценту треоніну *B. flavum* (*C. glutamicum*) IMB B-7446. Для забезпечення підвищення накопичення амінокислот в процесі синтезу необхідно змінити систему регуляції обміну. Для цього необхідно або стимулювати споживання субстрату і виділення амінокислот в середовище або пригнічувати побічні реакції і процеси деградації амінокислот.

Досліджено вплив глюкози, фруктози та сахарози на синтез біомаси та треоніну (рис. 11).

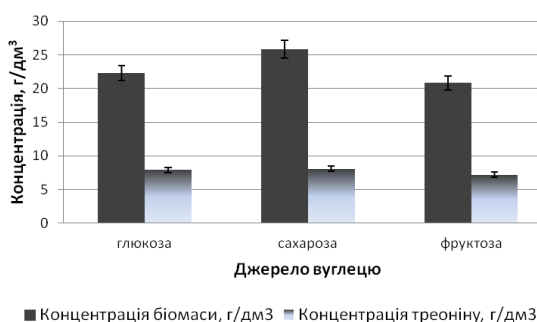


Рис. 11. Вплив джерела вуглецю на синтез треоніну та біомаси штамом *B. flavum* (*C. glutamicum*) IMB B-7446.

При оптимальних умовах культивування швидкість накопичення біомаси та швидкість утворення продуктів життєдіяльності залежать від кількості інокуляту. Тому було вивчено вплив концентрації посівного матеріалу (рис. 12) та температури культивування (рис. 13) на приріст бактеріальної популяції та

на синтез треоніну. Встановлено, що найвищі показники відносної швидкості синтезу біомаси та треоніну спостерігались при внесенні у середовище 20% інокуляту та температурі 32°C.

Динаміка утворення біомаси та треоніну бактеріями *B. flavum* IMB B-7446 в залежності від зміни швидкості розчинення кисню представлена на рис. 14. Максимальне накопичення біомаси відбувалось при швидкості розчинення кисню 10,0 гО₂/дм³/год, а максимальна кількість накопичення треоніну при 11,0 гО₂/дм³/год. Збільшення швидкості розчинення кисню пригнічувало ріст біомаси та треоніну. В подальших дослідженнях використовували швидкість розчинення кисню 11,0 гО₂/дм³/год.

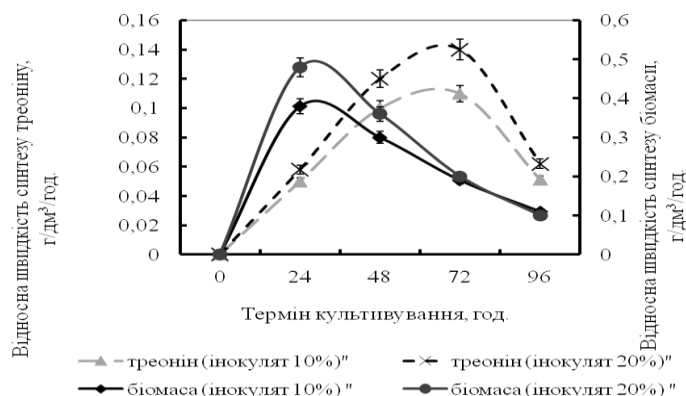


Рис. 12. Відносна швидкість синтезу біомаси та треоніну.

Досліджено процес накопичення біомаси та синтезу треоніну штамом *B. flavum* ТН-7 в залежності від температури культивування (рис. 13).

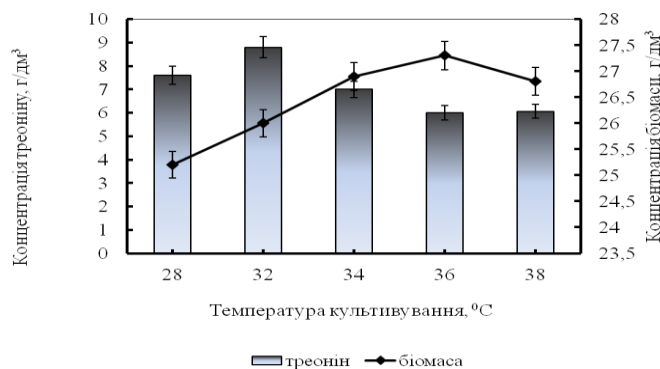


Рис. 13. Вплив температури культивування на синтез біомаси та треоніну.

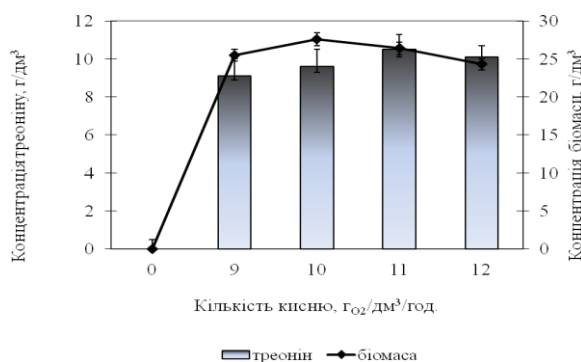


Рис. 14. Вплив швидкості розчинення кисню на синтез біомаси та треоніну.

При зміні концентрацій проліну, тіаміну, біотину, дріжджового екстракту концентрація треоніну в середовищі збільшувалась. Для синтезу треоніну визначено оптимальні концентрації ростових факторів у суміші (г/дм³): проліну – 0,8; тіаміну – 0,002; біотину – $2,0 \times 10^{-4}$; дріжджового екстракту – 1,0. При цих умовах в культуральній рідині накопичувалось 11,0 г/дм³ треоніну.

Досліджено вплив додаткового внесення амінокислот метіоніну та ізолейцину в культуральне середовище в різних концентраціях на процес біосинтезу треоніну. Було підібрано оптимальну концентрацію суміші ізолейцину та метіоніну (з вмістом 0,4 г/дм³ кожної амінокислоти), додавання якої підвищило кількість треоніну у культуральній рідині до 11,9 г/дм³.

Процес культивування отриманого мутантного штаму за умов визначених оптимальних параметрів проводили на мелясному середовищі з додаванням ростових речовин (рис. 15).

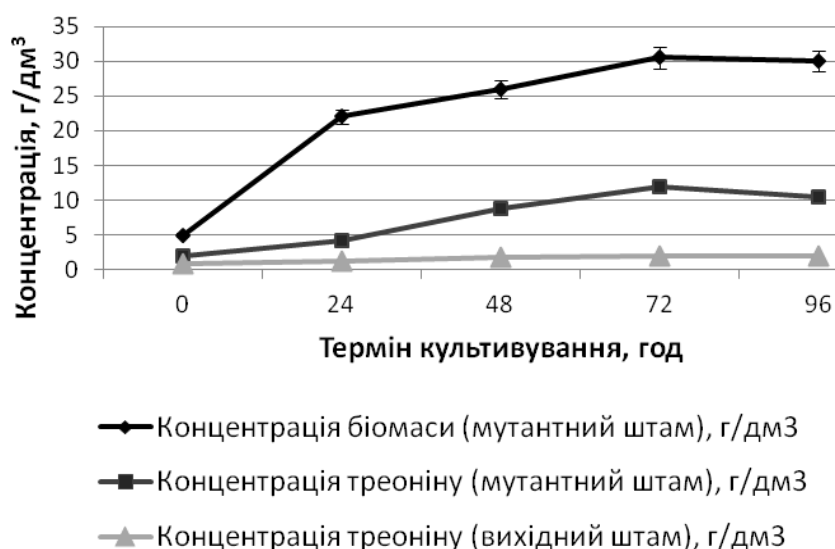


Рис. 15. Синтез треоніну мутантним штамом *B. flavum* IMB B-7446 (*S. glutamicum*) при оптимізованих умовах культивування.

ВИСНОВКИ

Отримано нові штами-продуценти лізину та треоніну *Brevibacterium sp.* IMB B-7447 та *B. flavum* IMB B-7446, відповідно. Вивчено їх біологічні особливості та визначено біосинтетичну здатність до підвищеного синтезу цільових амінокислот при оптимальних умовах культивування.

1. Проведено клоновий аналіз штамів-продуцентів лізину та треоніну. Встановлено, що продуценти лізину *Brevibacterium sp.* 90H, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531 розщеплювались на два типи колоній (без пігменту та пігментовані), а продуцент треоніну *B. flavum* TH7 утворював тільки пігментовані (жовті) колонії.

2. Визначена ауксотрофність клонів з найбільшою продуктивністю за цільовими амінокислотами. Виявлено, що клони зберігали ауксотрофність за лейцином та набували залежності до треоніну, метіоніну, триптофану і ізолейцину. Продуцент треоніну *B. flavum* TH7 був ауксотрофом за серином та лейцином.

3. Здійснено мутагенез штамів *Brevibacterium sp.* 90Н, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531, *B. flavum* ТН7 за допомогою УФ опромінення та отримано стійкі мутантні штами-продуценти лізину та треоніну *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 та *B. flavum* ІМВ В-7446, відповідно.

4. Здійснено хімічний мутагенез штамів *Brevibacterium sp.* 90Н, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531, *B. flavum* ТН7 та *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 за допомогою NTG. Кількість лізину та треоніну, що синтезували отримані за допомогою хімічного мутагенезу штами, не перевищувала їх кількість у вихідних штамів. Отримані рожеві колонії *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 “поверталися” до початкового жовтого забарвлення, що свідчить про нестабільні мутації.

5. При проведенні порівняльного аналізу гена 16S рРНК мутантних штамів з вихідними штамами та штамами з бази даних “GenBank” встановлено, що гомологія *Brevibacterium sp.* 90 та *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 складає 98%, а штами *B. flavum* ТН7 та *B. flavum* ІМВ В-7446 відносяться до виду *C. glutamicum*.

6. Показано, що оптимізація умов культивування (рН 7,0, Т=31±1°C, кількість кисню 3,0-4,0 гО₂/дм³/год, термін культивування 72 год, джерела вуглеводів – сахароза або меляса (8%), джерела азоту – сірчаноокислий амоній (4%), ростові фактори – біотин, кукурудзяний або дріжджовий екстракт) штаму *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 підвищила синтез лізину у 8 разів порівняно з вихідним штамом.

7. Показано, що оптимізація умов культивування (рН 7,0, температура 32±1°C, кількість посівного матеріалу 20%, кількість кисню 11,0 гО₂/дм³/год, термін культивування 72 год, джерела вуглеводів – сахароза або меляса, джерела азоту – сірчаноокислий амоній, концентрації ростових факторів (г/дм³): проліну – 0,8; тіаміну – 0,002; біотину – 2,0x10⁻⁴; дріжджового екстракту – 1,0, концентрації ізолейцину та метіоніну – 0,4 г/дм³ кожної амінокислоти) штаму *B. flavum* ІМВ В-7446 підвищила синтез треоніну в 6 разів порівняно з вихідним штамом.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Threonine synthesis of *Brevibacterium flavum* mutant strain / G. S. Andriiash, G. M. Zabolotna, A. F. Tkachenko, Ya. V. Blume, S. M. Shulga // Threonine: Food Sources, Functions and Health Benefits / [G. S. Andriiash, G. M. Zabolotna, A. F. Tkachenko, Ya. V. Blume, S. M. Shulga], 2015. – (Nova). – P. 1–26. (Дисертантка разом із співавторами виконала експериментальну частину, опрацювала та проаналізувала дані, брала участь в написанні розділу).

2. Шульга С. М. Інтенсифікація біосинтезу треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7/ С. М. Шульга, О. О. Тігунова, А. Ф. Ткаченко, Н. Є. Бейко, С. І. Прийомов, Г. С. Андріяш // Біотехнологія. – 2011. – №5. – С. 97–103. (Дисертантка разом із співавторами виконала експериментальну частину, брала участь в написанні статті).

3. Андріяш Г. С. Ауксотрофність продуцентів лізину / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга. // Біотехнологія. – 2012. – №1. – С. 70–77. (Дисертантка разом із співавторами брала участь у плануванні та проведенні експерименту, опрацювала та проаналізувала дані, брала участь в написанні статті).

4. Андріяш Г. С. Мутантні штами мікроорганізмів – продуцентів лізину та треоніну / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга. // *Biotechnol. Acta.* – 2014. – №3. – С. 95–101. (*Дисертантка разом із співавторами приймала участь у проведенні експерименту, опрацювала дані, брала участь в написанні статті*).

5. Андріяш Г. С. Філогенетичний аналіз штамів-продуцентів лізину порівнянням послідовностей гена 16S рРНК / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, В. С. Бондаренко, С. М. Шульга. // *Biotechnol. Acta.* – 2014. – №6. – С. 40-45. (*Дисертантка разом із співавторами брала участь у плануванні та проведенні експерименту, опрацювала та проаналізувала дані, брала участь в написанні статті*).

6. Андріяш Г. С. Характеристика штаму *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 та оптимізація біосинтезу треоніну / Г. М. Заболотна, А. Ф. Ткаченко, С. М. Шульга // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2015. – №2. – С. 68-78. (*Дисертантка разом із співавторами брала участь у плануванні та проведенні експерименту, опрацювала та проаналізувала дані, брала участь в написанні статті*).

7. Андріяш Г. С. Регулювання та шляхи інтенсифікації біосинтезу лізину / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга. // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2012. – №4. – С. 6–17. (*Дисертантка разом із співавторами проаналізувала літературу та підготувала статтю*).

8. Андріяш А.С. Способ извлечения L-лизина из культуральной жидкости продуцента / Шульга С.М., Лужков А.М. // Тезисы докладов IV Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2007. – С. 41.

9. Andriiash G. S. Method of lysine extraction from the culture fluid of producent / G. S. Andriiash, S. M. Shulga, A. I. Chomenko // *Materials III International Conference “BioMicroWorld 2009”* (2-4 December, Lisbon, Portugal). – Lisbon, 2009. – P. 416.

10. Андріяш А. С. Создание генетически модифицированного штамма продуцента лизина / А. С. Андріяш, С. М. Шульга, Г. М. Заболотная // Тезисы докладов V Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2009. – С. 433-434.

11. Андріяш А.С. Ауксотрофность промышленных продуцентов лизина / Андріяш А. С., Бейко Н. Е., Заболотная Г. М., Тигунова Е. А., Ткаченко А. Ф., Шульга С. М. // Тезисы докладов VI Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2011. – С. 375-376.

12. Андріяш Г. С. Промислові продуценти лізину – ауксотрофні мутанти / Г. С. Андріяш, Н. Е. Бейко, Г. М. Заболотна, А. Ф. Ткаченко, О. О. Тігунова, С. М. Шульга // Труды первой конф. молодых ученых «Биология растений и биотехнология» ИПБГ НАН Украины. – Белая Церковь, 2011. – С. 92.

13. Andriiash G. Study of strains *Brevibacterium* as producer of lysine / G. Andriiash, G. Zabolotna, S. Shulga // *Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology (Istanbul, Turkey), «New biotechnology».* – Istanbul, 2012. – V. 29. – Issue S. – P. S57.

14. Shulga S. Tryptophan production by *Corynebacterium glutamicum* / S. Shulga, A. Tkachenko, N. Beyko, A. Khomenko, G. Andriash // Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology (Istanbul, Turkey), «New biotechnology». – Istanbul. – 2012. – V. 29. – Issue S. – P. S63.

15. Андріяш Г. С. Селекційне вдосконалення штамів-продуцентів лізину *Brevibacterium* за допомогою УФ-опромінення / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга // Матеріали XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Київ, 15-16 листопада, 2012 р.). – Київ, 2012. – С. 218-219.

16. Андріяш А. С. Получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов аминокислот / А. С. Андріяш, Г. М. Заболотная, С. М. Шульга // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2013. – С. 293.

17. Андріяш Г. С. Порівняльний аналіз ауксотрофних мутантів-продуцентів незамінних амінокислот лізину та треоніну / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, О. Ю. Кваско, С. М. Шульга // Біотехнологія XXI століття: Тези доповідей VII Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 115 річниці заснування НТУУ «КПІ» – Київ, 2013. – С. 15.

18. Андріяш Г. С. Мутантні штами-продуценти амінокислот аспаратної родини / Андріяш Г. С. // Друга конференція молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23-24 грудня 2013 р. – Київ, 2013. – С. 55.

19. Андріяш Г. С. NTG мутагенез продуцентів лізину / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга // VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 200 річниці з дня народження Т. Г. Шевченка, 25 квітня 2014 р. – Київ, 2014. – С. 14.

АНОТАЦІЯ

Андріяш Г.С. – Отримання штамів *Brevibacterium* з підвищеними рівнями синтезу лізину та треоніну. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2015.

В дисертації представлено результати досліджень штамів-продуцентів незамінних амінокислот лізину та треоніну роду *Brevibacterium*. Проведено клоновий аналіз штамів-продуцентів лізину та треоніну. Встановлено ауксотрофність клонів з найбільшою продуктивністю за цільовими амінокислотами. Здійснено мутагенез штамів *Brevibacterium sp.* 90Н, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531, *B. flavum* TH7 за допомогою УФ опромінення та отримано стійкі мутантні штами-продуценти лізину та треоніну *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 та *B. flavum* ІМВ В-7446 відповідно. Кількість лізину та треоніну, що синтезували отримані за допомогою хімічного мутагенезу N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідином штами, не перевищувала їх кількість у вихідних штамів. При проведенні порівняльного аналізу гена 16S рРНК мутантних штамів з вихідними штамами та штамами з бази даних “GenBank” було встановлено, що гомологія нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК *Brevibacterium sp.* 90 та

Brevibacterium sp. ІМВ В-7447 складає 98%, а штами *B. flavum* ТН7 та *B. flavum* ІМВ В-7446 відносяться до виду *Corynebacterium glutamicum*. Показано, що оптимізація умов культивування штаму *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 дозволила підвищити синтез лізину у 8 разів. Показано, що штам *B. flavum* ІМВ В-7446 синтезував в 6 разів більше треоніну порівняно з вихідним штамом за рахунок оптимізації умов культивування.

Ключові слова: *Brevibacterium*, штами-продуценти, лізин, треонін, мутагенез.

АННОТАЦІЯ

Андрияш А.С. – Получение штаммов *Brevibacterium* с повышенными уровнями синтеза лизина и треонина. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2015.

В диссертации представлены результаты исследований штаммов-продуцентов незаменимых аминокислот лизина и треонина рода *Brevibacterium*. Проведен клоновый анализ штаммов-продуцентов лизина и треонина. Установлено, что продуценты лизина *Brevibacterium sp.* 90Н, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531 дали расщепление на два типа колоний (без пигмента и пигментированные), а продуцент треонина *B. flavum* ТН7 образовывал только желтые колонии. Установлено ауксотрофность клонов с наибольшей производительностью по целевым аминокислотами. Обнаружено, что клоны сохраняют ауксотрофность по лейцину и приобретают новую зависимость треонину, метионину, триптофану, изолейцину. Продуцент треонина *B. flavum* ТН7 был ауксотрофом по серину и лейцину. Осуществлен мутагенез штаммов *Brevibacterium sp.* 90Н, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531, *B. flavum* ТН7 с помощью УФ облучения и получены устойчивые мутантные штаммы-продуценты лизина и треонина *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 и *B. flavum* ІМВ В-7446, соответственно. Отбор мутантов осуществляли по критериям ауксотрофности и стойкости к аналогам лизина и треонина (аминоэтилцистеина и β -гидроксинорвалина, соответственно). Исходную культуру и полученные мутантные штаммы проверили на чувствительность к антибиотикам с целью установления генетических маркеров. Мутантный штамм *Brevibacterium sp.* ІМВ В-7447 изменил чувствительность к антибиотику левомецетину, а штамм *B. flavum* ІМВ В-7446 – к тетрациклину. С целью определения стабильности полученных мутантных штаммов их пересекали в течение двух месяцев с интервалом две недели на твердую и жидкую среду с определением количества синтезируемого треонина и лизина. Показатель синтеза аминокислот не менялся от пересева к пересеву.

Количество лизина и треонина, которое синтезировали полученные с помощью химического мутагенеза N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином штаммы, не превышала их количество у исходных штаммов. Полученные розовые колонии возвращались к исходной желтой окраске, что

свидетельствует о неустойчивости мутации. Дальнейшие исследования мутантных штаммов, полученных таким способом, не проводили.

При проведении сравнительного анализа гена 16S рРНК мутантных штаммов с исходными штаммами и штаммами из базы данных "GenBank" было определено, что штаммы-продуценты из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ДУ «ИПБГ НАН Украины» принадлежат к трем группам. К первой относятся штаммы *Brevibacterium sp.* 90Н, *Brevibacterium sp.* FXJ8.052, *Brevibacterium casei* DY 40-62, *Brevibacterium ammoniilyticum* A1, к второй – *Brevibacterium sp.* E531, *Brevibacterium sp.* BS05, к третьей – *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* TUT и полученный мутантный штамм *Brevibacterium sp.* ИМВ В-7447. Установлено, что гомология нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК *Brevibacterium sp.* 90 и *Brevibacterium sp.* ИМВ В-7447 составляет 98%, а штаммы *B. flavum* TH7 и *B. flavum* ИМВ В-7446 относятся к виду *Corynebacterium glutamicum*. Определено, что мутантный штамм *Brevibacterium sp.* ИМВ В-7447 не имеет аналогов в базе данных «GenBank».

Показано, что оптимизация условий культивирования (рН 7,0, Т = 31 ± 1 °С, количество кислорода 3-4 гО₂/дм³/ч., срок культивирования 72 ч., источники углеводов – сахароза или меласса (8%), источники азота – сернокислый аммоний (4%), ростовые факторы – биотин, кукурузный или дрожжевой экстракт) штамма *Brevibacterium sp.* ИМВ В-7447 позволила повысить синтез лизина в 8 раз. Показано, что штамм *B. flavum* ИМВ В-7446 синтезировал в 6 раз больше треонина по сравнению с исходным штаммом за счет оптимизации условий культивирования (рН 7,0, температура 32 ± 1 °С, количество посевного материала 20%, количество кислорода 11 гО₂/дм³/ч., срок культивирования 72 ч., источники углеводов – сахароза или меласса, источники азота – сернокислый аммоний, определены оптимальные концентрации ростовых факторов в среде (г/дм³): пролина – 0,8; тиамин – 0,002; биотин – 2,0×10⁻⁴; дрожжевого экстракта – 1,0, подобрано оптимальную концентрацию смеси изолейцина и метионина (с содержанием 0,4 г/дм³ каждой аминокислоты). Полученные в работе штаммы *B. flavum* ИМВ В-7446 (*C. glutamicum*) и *Brevibacterium sp.* ИМВ В-7447 депонированы в «Национальном Депозитарии микроорганизмов» Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Последовательности гена 16S рРНК мутантных штаммов зарегистрированы в базе данных "GenBank" (регистрационные номера KT151946 и KT151948 соответственно).

Ключевые слова: *Brevibacterium*, штаммы-продуценты, лизин, треонин, мутагенез.

SUMMARY

Andriiash G.S. – Preparation of *Brevibacterium* strains with elevated levels of lysine and threonine synthesis. – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of the Candidate of Biological Sciences (PhD), speciality 03.00.20 – biotechnology. –Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis presents the results of research strains-producers of essential amino acids lysine and threonine genus *Brevibacterium*. An analysis of clonal strains producers of lysine and threonine. Established auxotrophy clones with the highest productivity of the targeted amino acids. Done mutagenesis strains *Brevibacterium sp.* 90H, *Brevibacterium sp.* 90, *Brevibacterium sp.* E531, *Brevibacterium flavum* TH7 using UV irradiation and obtain stable mutant strains producers of lysine and threonine *Brevibacterium sp.* IMV B- 7447 and *B. flavum* IMV B-7446 respectively. Quality of lysine and threonine, which received synthesized by chemical mutagenesis of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine strains did not exceed the number in the initial strains. When conducting a comparative analysis of 16S rRNA gene mutant strains with the original strains and strains from the database "GenBank" found that homology of nucleotide sequences of 16S rRNA gene *Brevibacterium sp.* 90 and *Brevibacterium sp.* IMV B-7447 is 98% and the strains *B. flavum* TH7 and *Brevibacterium flavum* IMV B-7446 relating to the species *Corynebacterium glutamicum*. It is shown that the optimization of culture conditions of the strain *Brevibacterium sp.* IMV B-7447 has improved lysine synthesis of 8 times. It is shown that the strain *B. flavum* IMV B-7446 synthesized 6 times more threonine compared with the original strain by optimizing cultivation conditions.

Keywords: *Brevibacterium*, strains-producers, lysine, threonine, mutagenesis.