

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Автор. свид. СССР № 922139, Бюлл. изобрет. № 15, 1982.
2. Африкии Э. К. Успехи микробиологии, 10, 142, 1975.
3. Гудий В. В., Теплякова Г. В., Иванов Г. М. Микроорганизмы, полезные для микробиометода. Новосибирск, 1981.
4. Константинова Н. Д. Автореф. канд. дисс., М., 1972.
5. Black S. H. J. Invertebr. Pathol., 12, 148—57, 1968.
6. Black S. H. ARREdondo M. I. Experientia, 22, 77—78, 1966.
7. Chosh B. I. S., Murray R. G. B. J. Bacteriol., 93, 1, 411—26, 1967.
8. Clstilow R. N., Sylvester Ch. J., Pepper R. E. Appl. Microbiol., 14, 161—69, 1966.
9. Fowler E. H., Harrison J. A. Bacteriol. Proc., 30, 1952.
10. Hanney C. L. J. Econom. Entomol., 9, 2, 285, 1961.
11. HEImpel A. M., Angus T. A. J. Insect. Pathol., 2, 4, 311, 1960.
12. Luthy P. Untersuchungen an Bacillus fribourgensis Wille, Zentrabl. fur Bakt., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., Bd. 122, 671—711, 1968.
13. Mitruka B. M., Costilow R. V., Black S. H., Pepper R. E. J. Bacteriol., 94, 759—65, 1967.
14. Reynolds E. S. J. Cell Biol., 17, 208—12, 1963.
15. Ryter A., Kellenberger E. Z. Naturforsch., 136, 597—605, 1958.
16. Steinkraus K. H., Tashiro H. Science, 121, 873—74, 1955.
17. Sylvester Ch. J. and Costilow R. N. J. Bacteriol., 87, 114—49, 1964.
18. Wyss Ch. Zentrabl. für Bakteriologie, Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg. Abt. 11, 126, 461—92, 1971.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 4, 1981

УДК 577.112.382:579.253.4:579.222.3

БИОСИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ DL-4-АЗАЛЕЙЦИНУСТОЙЧИВЫМИ МУТАНТАМИ SERRATIA MARCESCENS

А. О. АРМАНДЖЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Получено 100 нитрозогуанидининдуцированных DL-4-азалеицинустойчивых мутантов *Serratia marcescens*. Частота появления таких мутантов составляла 10^{-6} . Большинство аналогрезистентных мутантов синтезировало более 6 г/л l-валина. Приблизительно десятая часть мутантов синтезировала валин и лейцин одновременно, примерно в равных количествах. Полученные мутанты могут стать исходным материалом для селекции промышленных продуцентов l-валина и l-лейцина.

Ключевые слова: нитрозогуанидин, DL-4-азалеицин, аналогрезистентные мутанты, лейцин, валин.

Сложность и дороговизна химических методов синтеза оптически активных форм некоторых аминокислот диктуют необходимость разработки дешевых методов их биосинтеза с использованием активных штаммов-продуцентов. Наиболее эффективным способом селекции активных продуцентов является получение регуляторных мутантов с применением аналогов аминокислот [3, 6, 7].

В настоящей работе изучалась способность DL-4-азалеицинустойчивых мутантов *S. marcescens* (АЗЛ-Р) синтезировать аминокислоты с разветвленной цепью биосинтеза.

Материал и методика. В качестве исходной культуры использован дикий штамм *S. marcescens* ATCC 9986, способный продуцировать 9,5—1,0 г/д L-валина. Питательными средами для выращивания бактерий служили мясопептонный бульон (МПБ, МПА) и минимальная среда Девиса [5]. В качестве ферментационной служила модифицированная среда Кисуми [6]. Значение pH всех сред 7,0—7,3. В качестве аналога использовали DL-4-азалаейцин (фирма Serva). Водный раствор аналога готовился перед употреблением. В качестве мутагена использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ), растворяя в цитратном буфере перед употреблением [1].

Для определения уровня чувствительности исходного штамма к DL-4-азалаейцину культуру высевали на агаризованную среду Девиса [5] с добавлением различных концентраций DL-4-азалаейцина. Чашки инкубировали в термостате при 30° в течение 5 суток. Ингибирующей принималась концентрация аналога, при использовании которой отсутствовал рост культуры. DL-4-азалаейциностойчивые мутанты получали спонтанно или после индукции нитрозогуанидином. НГ-индуцированный мутагенез проводился по методу, описанному Миллером [1], с некоторой модификацией. После обработки мутагеном бактериальную суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин, ресуспендировали в свежей среде МПБ и аэрировали в течение 3 ч при 30°. Затем центрифугировали в среде Девиса для получения бактериальной суспензии с титром 10⁹ клеток/мл. Полученную бактериальную суспензию по 0,2 мл высевали на минимальную агаризованную среду Девиса, содержащую ингибирующие концентрации DL-4-азалаейцина, и инкубировали при 30° в течение 5 суток. Выросшие колонии отбирали путем многократных пересевов на той же среде для получения генетически чистых линий. Отобранные таким образом мутанты проверяли на устойчивость к DL-4-азалаейцину.

Способность полученных мутантов продуцировать аминокислоты определяли методом колбочной ферментации. Посевной материал выращивали на скошенном агаре в течение 20—24 ч при 30°. Ферментацию проводили в конических колбах, емкостью 250 мл при объеме ферментационной жидкости 10 мл, аэрацию обеспечивали качанием колб на поступательных качалках с частотой 140 колебаний в минуту при 30°, продолжительность ферментации—72 часа. Количественное определение аминокислот в культуральной жидкости (КЖ) осуществляли методом хроматографии на бумаге в системе Н-бутанол—уксусная кислота—вода в соотношении 4:1:5. В качестве проявителя использовали ингидрин. Пятна элюировали в системе этанол—вода—хлористый калий. Количество аминокислот определяли колориметрически при длине волны 540 мμ по предварительно составленным стандартным кривым [2, 4].

Результаты и обсуждение. Для отбора устойчивых к DL-4-азалаейцину мутантов первоначально было необходимо определить уровень чувствительности исходной культуры к аналогу. С этой целью бактериальная суспензия в логарифмической фазе роста высевалась на агаризованной среде Девиса, содержащей различные концентрации азалаейцина. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Уровень чувствительности исходной культуры *S. marcescens* к различным концентрациям DL-4-азалаейцина при 30°

Штамм	Рост культуры на средах								
	МПА	Девиса с добавлением DL-4-азалаейцина, мкг/мл							
		0	50	100	300	500	700	1000	5000
<i>S. marcescens</i> Исходная культура	3	3	3	3	3	3	2	1	0

Обозначение: 3—нормальный рост; 2, 1—слабо выраженный рост; 0—отсутствие роста.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что полное ингибирование роста культуры азалаейцином наблюдается при его концентрации в среде 5000 мкг/мл. При остальных использованных концентрациях наблюдается либо нормальный, либо слабо выраженный рост культуры. Исходя из этих результатов, отбор DL-4-азалаейцинрезистентных мутантов проводился на среде Девиса, содержащей 5000 мкг/мл аналога.

Выделение спонтанных и НГ-индуцированных мутантов проводили высевом бактериальной суспензии на среду Девиса, содержащей 5000 мкг/мл аналога, и отбором выросших колоний. Было выделено около 100 аналогрезистентных мутантов, частота встречаемости которых составляла 10^{-6} .

Данные об активности продукции аминокислот у выделенных мутантов приведены в табл. 2, согласно которой из 100 проверенных мутан-

Таблица 2
Биосинтетическая активность отобранных АЗЛ-Р мутантов *S. marcescens*

Группа мутантов	Количество мутантов	Накопление аминокислоты в КЖ	
		I-лейцин	I-валин
I	8	накапливают	накапливают
II	92	не накапливают	накапливают

тов 8 накапливают в культуральной жидкости I-валин и I-лейцин, при этом между валин- и лейцинпродуцирующей активностью культур наблюдается прямая корреляция: лейцин накапливается столько же, сколько валина. Остальные 92 мутанта накапливали только I-валин. Следует отметить, что некоторые мутанты одновременно продуцировали I-изолейцин в следовых количествах.

С целью определения уровня биосинтетической активности АЗЛ-Р мутантов была проведена серия ферментаций с использованием мутантов, продуцирующих только валин (табл. 3).

Таблица 3
Уровень биосинтеза I-валина у АЗЛ-Р мутантов *S. marcescens*

Класс мутантов	Количество мутантов	Доля мутантов, %	Накопление I-валина в КЖ, г/л
Активные	45	49	6,0—8,0
Среднеактивные	36	37	4,0—6,0
Малоактивные	13	14	2,0—4,0

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что устойчивые к DL-4-азалаейцину мутанты продуцируют значительное количество I-валина, при этом около половины мутантов накапливают в КЖ свыше 6 г/л I-валина. В качестве сопутствующих аминокислот в КЖ накапливаются следовые количества глутаминовой кислоты, изолейцина и лейцина.

На основании приведенных в настоящем сообщении данных можно заключить, что мутации устойчивости к DL-4-азалаейцину, как правило,

приводят к повышению способности штамма *S. marcescens* накапливать в КЖ валин, лейцин и небольшие количества изолейцина. Это свидетельствует о том, что получение DL-4-азалеуцинрезистентных мутантов является эффективным способом отбора активных продуцентов указанных аминокислот у *S. marcescens*. Некоторые из описанных в настоящей работе мутантов, обладающих высокой активностью, могут служить исходным материалом для селекции более активных промышленных штаммов и для разработки микробиологических методов получения валина и лейцина.

Армянский филиал Всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов
(филиал ВНИИгенетика)

Поступило 15.II 1983 г.

ԱՄԻՆԱՔԻԹՈՒՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԸ *SERRATIA MARCESCENS* DL -4-ԱԶԱԼԵՑԻՆԻ -ԿԱՅՈՒՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ս. Հ. ՀԱՐՄԱՆՅԱՆ, Մ. Գ. ՂՈՂԱՆՆԻՍՅԱՆ

Հետազոտությունների ընթացքում ստացվել են *S. marcescens* սպորանան և նիտրոզոգուանիդին մակածված 100 DL-4-ազալեյցինիկալուն մուտանտներ: Այդպիսի մուտանտների առաջացման հաճախականությունը կազմել է 10^{-6} : Անալոզոգուանիդին մուտանտների մեծ մասը սինթեզել է ազլեյի քան 6 գ/լ վալին: Մուտանտների մոտավորապես տասներորդ մասը սինթեզել է միաժամանակ վալին և լեյցին՝ մոտավորապես հավասար քանակություններով: Ստացված մուտանտները կարող են ելանյութ հանդիսանալ վալինի և լեյցինի արդյունաբերական պրոդուցենտների սելեկցիայի համար:

AMINOACID BIOSYNTHESIS BY *SERRATIA MARCESCENS* MUTANTS RESISTANT TO DL-4-AZALEUCINE

A. O. ARMANDJIAN, M. G. OGANESSIAN

DL-4-azaleucine resistant mutants of *Serratia marcescens* were isolated after either nitrosoguanidine or spontaneous mutagenesis. The frequency of appearance of mutants resistant to DL-4-azaleucin was approximately 10^{-6} . Most of these mutants had productivity of about 6g valine per liter. About one tenth of the total number of the mutants tested has produced leucine in approximately equal yield to valine. The obtained mutants could be used as the initial cultures for the selection of valine and leucine producing industrial strains.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
2. Пасхина Т. С. В сб.: Современные методы в биохимии, М., 1967.
3. Степанов А. И. Цитология и генетика, 4, 9, 365—371, 1975.
4. Хейс И. М., Мауек К. Хроматография на бумаге, М., 1962.
5. Davis B. D., Mingoli E. S. J. Bacteriol, 60, 17—18, 1950.
6. Genetics of Industrial Microorganisms, Academia, Prague, 267—287, 1973.
7. Tsuchida T., Ioshinaga F., Kubota K., Momose H., Oomura S. Agr. and Biol. Chem., 38, 1968. 1974.