

УДК 612.398:547.965

АУКСОТРОФНІСТЬ ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ

Г. С. Андріяш

Г. М. Заболотна

С. М. Шулга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 25.10.2011

Проведено дослідження штамів-продуцентів лізину з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України. Здійснено клоновий аналіз штамів після періодичного культивування продуцентів на м'ясо-середовищах. Встановлено, що *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. XI дають розщеплення колоній на два типи. Усі клони оцінено за біосинтетичною активністю щодо лізину. Перевірено ауксотрофність клонів до лейцину та амінокислот аспаратної родини. Відзначено мутаційні зміни в клонах, частина яких зберігала залежність від лейцину та набувала нової ауксотрофності до треоніну, метіоніну, триптофану, гомосерину та ізолейцину. Показано, що не всі клони стійкі до аналога лізину S-аміно-етил-L-цистеїну.

Для подальших досліджень з метою підвищення рівня біосинтезу лізину штамми-продуцентами *Brevibacterium* вибрано клони за біосинтетичною активністю стосовно цільової амінокислоти.

Ключові слова: амінокислоти, ауксотрофність, біосинтез, клони, лізин.

Незамінна амінокислота L-лізин є одним із джерел ацетил-КоА, складником простетичних груп ензимів та регуляторним чинником у метаболізмі інших амінокислот.

Лізин зареєстровано в Україні як субстанцію лікарських препаратів, як харчову та кормову добавку. Біологічні функції лізину в організмі пов'язані зі збільшенням об'єму м'язів та м'язової сили, поліпшенням короткотермінової пам'яті, запобіганням розвитку атеросклерозу, остеопорозу, рецидивам герпесу, сприянням секреції травних ензимів, формуванням еритроцитів та транспортуванням кальцію і фосфору в клітини. Уведення лізину до кормосумішей дає змогу зменшити витрати кормів у виробництві тваринницької продукції [1–3]. Промислове мікробіологічне виробництво лізину сягає 1 млн. т/рік. В Україні, на жаль, виробництво лізину повністю відсутнє.

Одним із головних чинників ефективності біотехнології лізину є штам-продуцент, основними властивостями якого є його продуктивність за цільовою амінокислотою, наявність мутаційних змін і потреба у факторах росту.

Більшість промислових штамів-продуцентів лізину є ауксотрофними мутантами [4, 5]. Їхня ауксотрофність пов'язана як зі змінами у відповідних генах, так і в ензиматичній регуляції біосинтезу лізину за принципом зворотного зв'язку.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень слугували ауксотрофні (лейцинозалежні) штамми-продуценти лізину *Brevibacterium* sp. 90 H, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. XI, продуцент треоніну *Brevibacterium flavum* TH-7, продуцент глютамінової кислоти *Corynebacterium glutamicum* з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України.

Умови культивування та середовища. Для вирощування штамів-продуцентів лізину використовували повноцінні живильні середовища (ПЖС) такого складу: м'ясопептонний агар (МПА) (г/дм³) — поживний бульйон — 23,0, агар — 30,0, вода дистильована, рН 7,0±0,1, та м'ясопептонний агар збагачений (МПАзб.) (г/дм³) — поживний бульйон — 23,0, глюкоза — 1,0, дріжджовий екстракт — 5,0, агар — 30,0, вода дистильована, рН 7,0±0,1.

Для отримання окремих клонів брали 0,2·10⁻³ дм³ та 1,0·10⁻³ дм³ культуральної рідини з розведень 10⁻⁶ та 10⁻⁷, відповідно, і переносили в чашки Петрі, в які потім заливали охолоджений до температури 45±3 °С МПАзб. Інкубацію здійснювали в термостаті за температури 31±1 °С протягом трьох діб. Усі колонії, які виростили на збагаченому МПА, було взято для перевірки біосинтезу

лізину. Найбільш продуктивні клони відібрали для подальших досліджень. Клони пересівали один раз на квартал і зберігали на МПАзб. за температури +4 °С.

Перевірку на чистоту культури та продуктивність проводили один раз на рік (музейні культури).

Для визначення ауксотрофності клонів бактерій відбирали дводобову культуру, яку розводили у стерильному фізіологічному розчині до концентрації $1,5 \cdot 10^{10}$ КУО/дм³, що відповідало 1,0 оптичної густини (ОГ). ОГ вимірювали в кюветах з $d = 5,0$ мм за довжини хвилі 440 нм фотоелектроколіориметром (модель КФК-3).

Отриманий інокулят переносили стерильно в: а) повноцінне середовище; б) мінімальне середовище (МС); в) МС із досліджуваною амінокислотою; г) мелясне середовище. Склад мелясного середовища (г/дм³): м'яса — 160,0; (NH₄)₂SO₄ — 15,0; KH₂PO₄ — 0,5; K₂HPO₄ — 0,5; MgSO₄ · 7H₂O — 0,25; FeSO₄ · 7H₂O — 0,01; MnSO₄ · H₂O — 0,01; ZnSO₄ · 7H₂O — 0,001; CuSO₄ — 0,2; NiCl₂ — 0,02; дріжджовий екстракт — 5,0. Після стерилізації додавали стерильну крейду в кількості 10 г/дм³ для створення буферності в процесі метаболізму бактерій. Культивування здійснювали в колбах Ерленмеєра об'ємом 0,25 дм³ з живильним середовищем об'ємом 0,03 дм³ за температури 30±1 °С при 240 об/хв у шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) протягом трьох діб.

Ріст штамів-продуцентів лізину оцінювали: на твердих живильних середовищах — візуально за наявністю росту та утворенням пігменту; на рідких — вимірюванням концентрації клітин в культуральній рідині (КР) за ОГ; зі зміною рН середовища — за допомогою цифрового рН-метра (рН-метр 150); з використанням цукрів — резорциновим методом [6]; з використанням амонійного азоту — методом з реактивом Неслера [7]. Кількість синтезованого лізину визначали у відцентрифугованій КР за допомогою тонкошарової хроматографії в системі ацетон:ізопропанол:аміак:вода (співвідношення 50:50:12:8), плями лізину елюювали 70% -м етанолом [8].

Дослідження ауксотрофності здійснювали згідно з методикою [4], модифікованою для потреб бактеріальних продуцентів та живильних середовищ. Як повноцінне живильне середовище і позитивний контроль використано МПАзб., як негативний контроль — МС (глюкоза або сахароза — 3,0%, (NH₄)₂SO₄ — 1,0%, K₂HPO₄ — 0,2%, MgSO₄ · 7H₂O — 0,04%). Глюкозу, сахарозу та

амінокислоти стерилізували окремо і вносили в мінімальне середовище. Розчини амінокислот (наважка амінокислоти масою 190 мг в 0,025 дм³ дистильованої води) стерилізували протягом 15 хв за 0,5 атм. Стерильні розчини амінокислот об'ємом 0,0004 дм³ додавали в розплавлене мінімальне середовище (0,05 дм³), перемішували та розподіляли на чашки Петрі. Інкубацію проводили за температури 31±1 °С протягом 2–3 діб.

Статистичну обробку даних було виконано за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 3 повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Біосинтез лізину в коріне- та бревібактерій здійснюється гліколітичним (через піруват, цикл Кребса та діамінопімелат) і пентозофосфатним шляхами за участю 60 ензимів, основними з яких є фосфоенолпіруваткарбоксилаза (*pyc*), гомосериндегідрогеназа (*hom*), аспартаткіназа (*lysC*), дигідропіколінатсинтаза (*dap A*) (рис. 1, а) [9, 10].

Схему синтезу лізину через α-діамінопімелінову кислоту наведено на рис. 1, б. Бактерії синтезують лізин з аспартату через діамінопімелат, який формує діамінопімелатні блоки пептидоглікану клітинної стінки корінебактерій [2]. Крім лізину, за розгалуженою схемою з аспартату синтезуються також метіонін, гомосерин, треонін та ізолейцин. Контроль біосинтезу амінокислот аспартатної родини здійснюється на рівні першого ензиму — аспартаткінази (АК) [5].

Біосинтез лізину від аспарагінової кислоти через діамінопімелінову кислоту має тільки один контрольований кінцевим продуктом етап — фосфорилування аспарагінової кислоти. Реакція каталізується АК, здатною у штамів дикого типу до полівалентного інгібування лізином і треоніном. Треонін пригнічує ензим АК, присутність лізину підсилює цей ефект. Треонін здатен репресувати також і дегідрогеназу напівальдегіду аспарагінової кислоти та гомосериндегідрогеназу (ГД), метіонін пригнічує ГД, а ізолейцин — треоніндегідрогеназу (ТД). Синтез залежить від активності ГД, що здатна до інгібування треоніном і репресії метіоніном. Спільний попередник у синтезі лізину та треоніну — напівальдегід аспарагінової кислоти — витрачається у корінебактерій переважно на синтез треоніну, оскільки активність ГД у 15 разів вища за активність дигідропіколінатсинтази.

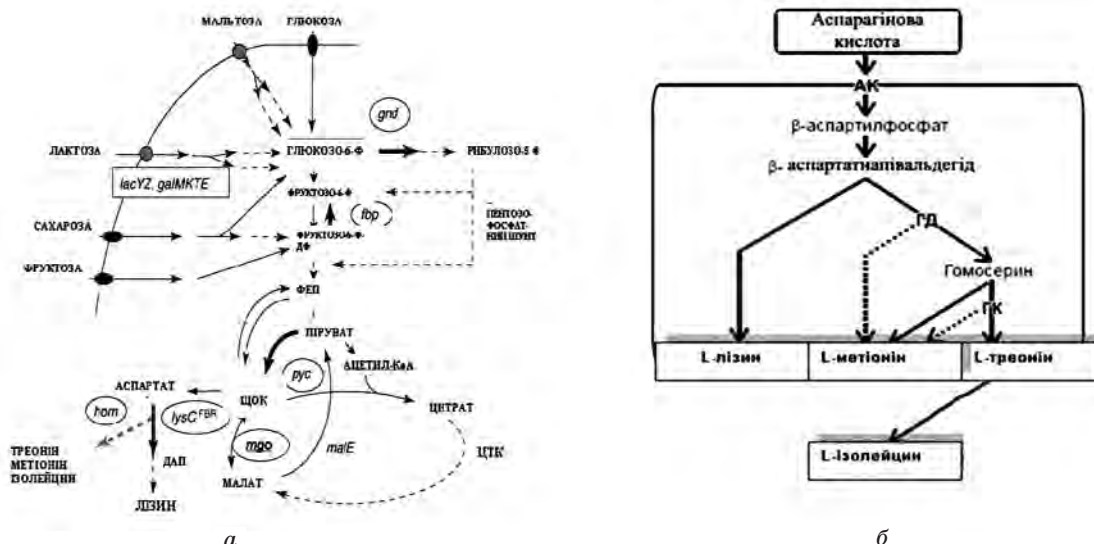


Рис. 1. Біосинтез лізину у бревібактерій:
 а — гліколітичним (через піруват та цикл Кребса та діамінопімелат) і пентозофосфатним шляхами;
 б — через α-діаміноімінолінову кислоту

Для підвищення синтезу лізину в клітинах корінебактерій передусім має бути усунено інгібування аспараткінази. Цього можна досягнути:

- зниженням внутрішньоклітинного вмісту треоніну;
- генетичною зміною АК, що полягає у втраті її чутливості до дії лізину та треоніну;
- блокуванням ГД;
- підвищенням активності дигідропіколінатсинтази.

Саме тому для мікробіологічного виробництва лізину використовують ауксотрофні штами-продуценти глутаматпродукуючих корінебактерій.

Відомі три основні класи ауксотрофних лізинпродукуючих мутантів:

- ауксотрофи за гомосерином з відсутністю активності АК або ауксотрофи за треоніном з відсутністю активності гомосеринкінази (ГК);
- метіонін- або треонінчутливі мутанти з низькою активністю ГД;
- аналогорезистентні прототрофні продуценти лізину, стійкі до аналога амінокислоти, у яких АК нечутлива до ретроінгібування лізином і треоніном.

Проведення клонового аналізу штамів-продуцентів лізину

Культивування *Brevibacterium* sp. 90 Н, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. XI, *Brevibacterium flavum* TH7, *Corynebacterium glutamicum* проводили в періодичних режимах упродовж 96 год на ензиматично-медиумі.

Основні показники культивування досліджуваних бактерій наведено в табл. 1. Зміна рН культуральної рідини показала, що в процесі росту відбувалось кислотоутворення, а присутність у середовищі крейди забезпечувала підтримання рН на нейтральному рівні. Загальне споживання цукру хоча й було різним для кожного продуцента, проте становило незначний відсоток. Додавання лейцину в ензиматичне мелясне середовище неістотно підвищило рівень синтезу біомаси, але суттєво не вплинуло на біосинтетичну активність штамів щодо лізину.

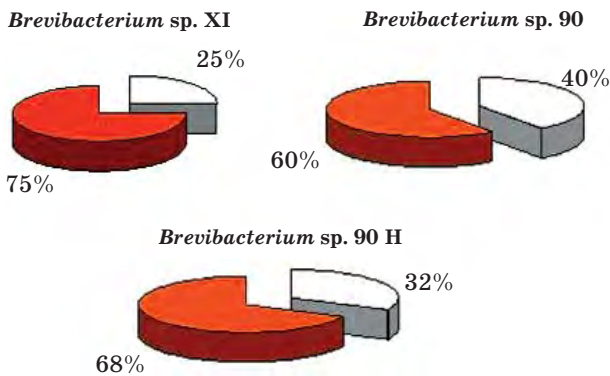
Нами було проведено перевірку ауксотрофності штамів щодо лейцину та інших амінокислот аспаратної родини для виявлення більш продуктивних штамів за цільовою амінокислотою. Для цього після культивування всі зразки культуральної рідини кожного продуцента було розсіяно на чашки Петрі зі збагаченим живильним середовищем, основним компонентом якого був МПБ. На цьому агаризованому середовищі виявили два типи колоній штамів *Brevibacterium* 90, 90Н та XI (типові колонії — випуклі, блискучі, жовтувато-лимонного кольору та колонії непігментовані). Штами *B. flavum* і *C. glutamicum* у процесі росту утворювали тільки окремі жовті колонії.

Розщеплення на два типи колоній для штамів *Brevibacterium* відбулось у співвідношеннях, наведених на рис.2.

Далі було здійснено перевірку клонів за продуктивністю синтезу лізину. Синтез проводили в періодичних умовах культивування за температури 31±1 °С та 250 об/хв.

Таблиця 1. Біосинтез лізину штамми-продуцентами

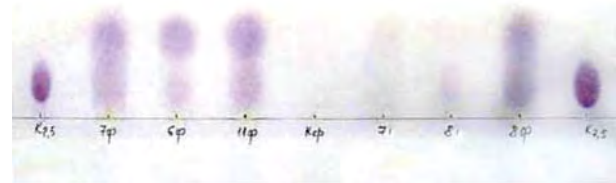
Продуценти	Показники культуральної рідини			
	pH	ОГ (1:10), λ_{440}	РР, %	Концентрація лізину, г/дм ³
<i>Brevibacterium</i> sp. 90 Н	7,42±0,12	1,4±0,1	5,6±0,3	5,9±0,5
<i>Brevibacterium</i> sp. 90 Н (+лейцин)	7,34±0,15	1,6±0,1	5,4±0,4	6,0±0,5
<i>Brevibacterium</i> sp. 90	7,16±0,18	1,2±0,1	5,2±0,4	5,1±0,4
<i>Brevibacterium</i> sp. 90 (+ лейцин)	7,14±0,14	1,3±0,1	5,3±0,4	5,2±0,4
<i>Brevibacterium</i> sp. XI	7,64±0,15	1,5±0,2	5,1±0,6	6,2±0,6
<i>Brevibacterium</i> sp. XI(+ лейцин)	7,46±0,13	1,6±0,1	5,4±0,4	6,2±0,6
<i>Brevibacterium flavum</i> ТН7	7,28±0,14	1,3±0,1	6,5±0,4	6,1±0,6
<i>Brevibacterium flavum</i> ТН7(+лейцин)	7,32±0,17	1,4±0,1	6,7±0,6	6,2±0,6
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7,20±0,15	1,3±0,1	6,3±0,4	6,1±0,4
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (+ лейцин)	7,35±0,13	1,4±0,1	6,9±0,6	6,1±0,5
Вихідне середовище	8,00±0,10	0,2±0,1	8,2±0,5	2,1±0,1

Рис. 2. Утворення двох типів колоній штамми *Brevibacterium*

Культивування здійснювали протягом 96 год. В інокуляційному середовищі на 24-ту год культивування у пробах 7і та 8і лізін практично відсутній, тобто протягом першої доби синтез його не відбувався (рис. 3). Це можна пояснити активним синтезом біомаси та витратою діамінопімелату на формування клітинних стінок.

Вміст лізину в КР кожного клону визначали після 24 год з інтервалом у 12 год протягом подальшого терміну культивування.

Як видно з рис. 4, жовті колонії *Brevibacterium* sp. 90 синтезують більше лізину, ніж білувато-сірі. Активне утворення лізину відбувається на другу добу і досягає максимальної величини на 60-ту год росту штамів. На 72-гу год культивування клітини активно споживали лізін, суттєво знижуючи його концентрацію в КР. Результати (термін культивування та рівень синтезу лізину), отримані під час дослідження *Brevibacterium*

Рис. 3. Синтез лізину *Brevibacterium*: К_{2,5}, К_{7,5} — стандартні розчини лізину з різною концентрацією; 7і, 8і — інокулят 7, 8 клонів після 24 год культивування; Кф — ензиматичне середовище без культури; 6ф, 7ф, 8ф, 11ф — КР після ферментації 6, 7, 8, 11 клонів

sp. 90Н і *Brevibacterium* sp. XI, були подібні за характеристиками та величинами, отриманими для *Brevibacterium* sp. 90, тому на рисунку наведено тільки дві діаграми.

З кожного типу колоній було отримано клони (номери згідно з табл. 2) і досліджено їхню продуктивність за лізином на 60-ту год культивування на ензиматичному мелясно-му середовищі.

На збагаченому середовищі у процесі ферментації протягом 60 год клони №2, №5, №8 (непігментовані колонії) та №6, №7, №11 (жовті) продукували. Вищезазначені клони відбрали для подальшого дослідження їхньої ауксотрофності.

Дослідження ауксотрофності штамів-продуцентів лізину

Згідно з методикою, наведеною в роботі [3], ауксотрофність спочатку визначали на твердому живильному середовищі.



Рис. 4. Накопичення лізину двома типами колоній штаму *Brevibacterium* sp.90 (жовті колонії — помаранчевий колір; непігментовані — без забарвлення)

Таблиця 2. Накопичення лізину на 60-ту годину культивування клонами штамів *Brevibacterium*

№ клону	Пігмент	Концентрація лізину, г/дм³
<i>Brevibacterium</i> sp.90 Н		
1	Жовтий	7,3±0,4
2	Непігментовані	8,7±0,5*
3	Жовтий	7,4 ±0,3
4	Жовтий	5,7±0,3
5	Непігментовані	9,4±0,5*
6	Жовтий	10,0±0,5*
<i>Brevibacterium</i> sp.90		
7	Жовтий	12,6±0,5*
8	Непігментовані	9,5±0,4*
9	Жовтий	6,5±0,3
10	Жовтий	4,5±0,3
<i>Brevibacterium</i> sp.XI		
11	Жовтий	11,7±0,5*
12	Жовтий	5,7±0,3
13	Непігментовані	6,3±0,3
14	Жовтий	4,5±0,3
15	Непігментовані	4,5±0,3
<i>Brevibacterium flavum</i>		
16	Жовтий	5,0±0,2
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
17	Жовтий	7,1±0,3

Примітка: * — найбільш продуктивні клони для подальших досліджень.

Позитивний контроль дослідів на повноцінному середовищі МПАзб, яке містило всі необхідні фактори росту, подано на рис. 5, а. Клоні, які росли на позитивному контролі, не росли на МС як з глюкозою, так і з сахарозою (рис. 5, б).

Негативний контроль в усіх подальших дослідях на середовищі МС був таким для клонів № 2, 5, 8, 7, 11. Виняток становив клон № 6, який не потребував факторів росту.

Для кожного клону проводили паралельні посіви на МС з амінокислотами. Як джерела вуглецевого живлення використовували глюкозу або сахарозу. На середовищі з глюкозою більшість клонів не виявляли ауксотрофності й не утворювали пігментації. Найвність росту всіх клонів на МС (джерело вуглецю — сахароза) з лейцином та гомосерином показано на рис. 6.

Бревібактерії на МС із сахарозою виявляли ауксотрофність стосовно ширшого кола амінокислот (табл. 3).

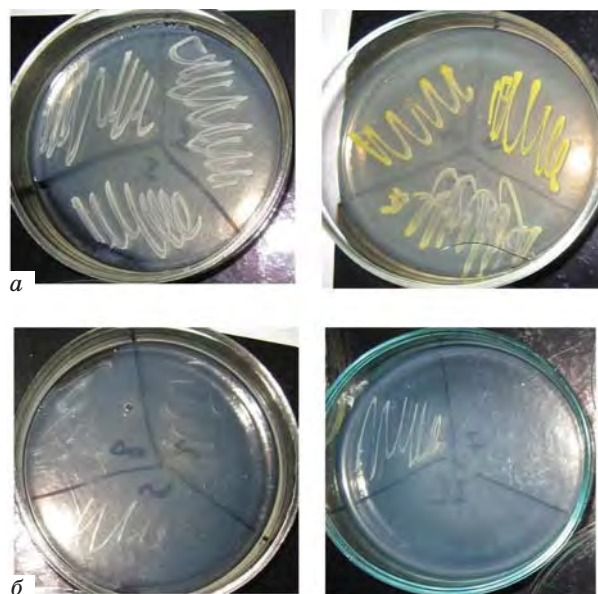
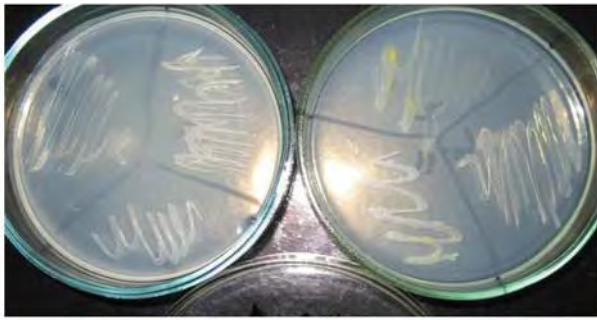
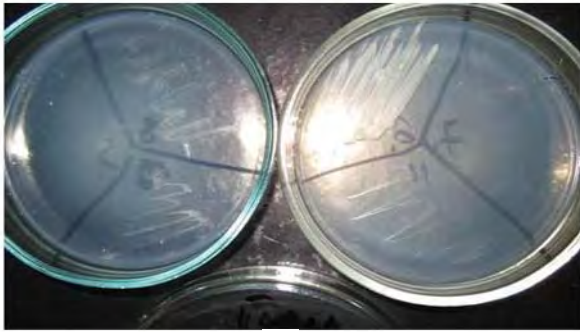


Рис. 5. Позитивний (а) та негативний (б) контроль дослідження ауксотрофності клонів *Brevibacterium*



а



б

Рис. 6. Ауксотрофність клонів на МС (джерело вуглецю — сахароза) з лейцином (а) та гомосерином (б)

За даними табл. 3, усі клони були лейцинозалежними і набули ауксотрофності до інших амінокислот, а саме метіоніну (№ 5, 7, 11), треоніну (№ 8, 11), ізолейцину (№ 8), триптофану (№ 2, 5, 11) та гомосерину (№ 8, 11). Для клону № 6 було виявлено позитивний результат на МС, оскільки він не потребував факторів росту. Це підтверджують дані, наведені на рис. 5, б та 6, б.

На наступному етапі досліджень було здійснено культивування на рідкому середовищі МС з амінокислотами тільки аспаратної родини (табл. 4). Серед усіх клонів досліджували три найбільш продуктивні за лізином та гомосеринзалежні — № 7, № 8, № 11 (табл. 2).

Для клону № 7 на рідкому МС із додаванням амінокислот аспаратної родини було підтверджено ауксотрофність за лейцином та метіоніном. На таких середовищах клон інтенсивно ріс, продукував пігмент, лізин та активно використовував цукор із середовища. На МС із треоніном та ізолейцином клон ріс, споживав цукор, проте не синтезував лізин. На МС із додаванням аспарагіну, триптофану, гомосерину клон не використовував цукор і не синтезував біомасу та лізин.

Для клону № 8 на рідкому МС із амінокислотами було підтверджено ауксотрофність за лейцином, ізолейцином, треоніном та гомосерином. На таких середовищах він

Таблиця 3. Визначення ауксотрофності клонів *Brevibacterium* на твердому МС із сахарозою

Середовища	Клони					
	2	5	6	7	8	11
Контроль ППС	+++	+++	+++	+++п	+++	+++п
Контроль МС	-	-	++	-	-	-
МС+Аспарагін	-	-	-	-	-	-
МС+Треонін	-	-	++	-	+	+
МС+Ізолейцин	-	-	+	-	+	-
МС+Лейцин	+++	+++	+++	+++п	+++	+++п
МС+Метіонін	-	+	++	п	-	+
МС+Триптофан	+	+	+++	-	-	+
МС+Гомосерин	-	-	+++	-	+	+

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

інтенсивно ріс, продукував лізин і активно використовував цукор із середовища. На МС із додаванням треоніну й ізолейцину клон ріс, споживав цукор, проте не синтезував лізин, на МС з аспарагіном, триптофаном, метіоніном — не використовував цукор і не синтезував біомасу та лізин.

Клон № 11 виявив ауксотрофність за лейцином, треоніном та триптофаном. Цей клон інтенсивно ріс і утворював пігмент на МС із вищезазначеними амінокислотами, виявляв ауксотрофність також і до гомосерину, проте не утворював пігмент. Найбільше споживання цукру відзначено на МС із додаванням гомосерину, треоніну, лейцину. Клон № 11 на МС з аспарагіном, ізолейцином, метіоніном не використовував цукор і не синтезував біомасу та лізин.

Ріст клонів на МС із додаванням лізину свідчить про відсутність пригнічення кінцевим продуктом. Тому клони № 7, 8, 11 перевірили на стійкість до аналога лізину — S-аміноетил-L-цистеїну (АЕЦ). Було одержано підтвердження стійкості клонів № 7 і 11 до АЕЦ.

Таким чином, відібрані окремі клони оцінено стосовно синтезу лізину. Найбільш продуктивні за лізином клони перевірено на ауксотрофність щодо амінокислот аспаратної родини. Досліджені клони зберігали ауксотрофність за лейцином і набули нової ауксотрофності до треоніну, метіоніну, триптофану та гомосерину. Найбільш продуктивні за лізином клони можна віднести і до аналогорезистентних ауксотрофів. Отримані експериментальні дані щодо ауксотрофності свідчать, що для продуцентів лізину ауксотрофність пов'язана з блокуванням гомосериндегідрогенази та зміною активності аспараткінази.

Таблиця 4. Вплив амінокислот аспаргатової родини на біосинтез лізину клонами № 7, 8, 11

Середовище	Показники КР, одиниці вимірювань			
	pH	ОГ (1:10), λ_{440}	РР, %	Синтез лізину
Контроль — МС	7,85	0,10	3,0	—
Клон №7				
МС+Аспарагін	7,80	0,14	2,9	—
МС+Лізин	6,83	0,42	1,9	+
МС+Лейцин	6,81	0,64 +П	1,3	+
МС+Ізолейцин	7,00	0,38	1,9	—
МС+Треонін	6,84	0,40	1,9	—
МС+Метіонін	6,80	0,42 +П	1,4	+
МС+Триптофан	7,20	0,32	2,6	—
МС+Гомосерин	7,90	0,14	2,8	—
Клон №8				
МС+Аспарагін	7,78	0,20	2,8	—
МС+Лізин	6,81	0,34	2,0	+
МС+Лейцин	6,62	0,50	1,4	+
МС+Ізолейцин	7,73	0,30	2,2	+
МС+Треонін	7,28	0,36	1,7	+
МС+Метіонін	6,95	0,25	2,7	—
МС+Триптофан	7,48	0,20	2,8	—
МС+Гомосерин	7,00	0,40	1,5	+
Клон №11				
МС+Аспарагін	7,92	0,12	3,0	—
МС+Лізин	7,03	0,42	1,9	+
МС+Лейцин	7,05	0,40 +П	1,5	+
МС+Ізолейцин	7,33	0,25	2,5	—
МС+Треонін	7,01	0,56 +П	1,3	+
МС+Метіонін	7,00	0,20	2,0	—
МС+Триптофан	7,05	0,52 +П	1,4	+
МС+Гомосерин	7,10	0,42	1,3	+

Примітка: + — присутність амінокислоти в культуральному середовищі; — — відсутність амінокислоти в культуральному середовищі; +П — жовтий пігмент.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
2. Лысак В. В. Л88 Микробиология: Уч. пособие. — Минск: БГУ, 2007. — 469 с.
3. Підгорський В. С., Іутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка. — 2010. — 328 с.
4. Федоренко В. О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів: Навч. посіб. — Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2006. — 279 с.
5. Дебатов В. Г., Лившиц В. А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. — М.: Высш. школа. — 1988. — 208 с.
6. Польшалина Г. В. Технохимический контроль спиртового и ликеро-водочного производств. — М.: Колос, 1999. — 336 с.
7. КНД 211.1.4.030-95. Охорона навколишнього природного середовища та раціональне використання природних ресурсів. Методика фотометричного визначення амоній-іонів з реактивом Неслера в стічних водах. — К., 1995. — 17 с.
8. Шульга С. М., Ткаченко А. Ф., Тигунова Е. А. и др. Влияние компонентов энзиматической среды на биосинтез триптофана // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 51–55.
9. Ohnishi J., Mitsuhashi S., Hayashi M. et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 58. — P. 217–223.
10. Ohnishi J., Katahira R., Mitsuhashi S. et al. A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* // FEMS Microbiol. Lett. — 2005. — V. 242. — P. 265–274.

**АУКСОТРОФНОСТЬ ПРОДУЦЕНТОВ
ЛИЗИНА**

*А. С. Андрияш
Г. М. Заболотная
С. М. Шульга*

ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики» НАН Украины,
Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Проведено исследование штаммов-продуцентов лизина из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины. Осуществлен клоновый анализ штаммов после периодического культивирования продуцентов на меласных средах. Установлено, что штаммы *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. XI дают расщепление колоний на два типа. Все клоны оценены по биосинтетической активности относительно лизина. Отмечены мутационные изменения в клонах, часть которых сохраняли зависимость от лейцина и получали новую ауксотрофность к треонину, метионину, триптофану, гомосерину и изолейцину. Показано, что не все клоны устойчивы к аналогу лизина S-амино-этил-L-цистеину. Отобраны клоны по биосинтетической активности относительно целевой аминокислоты для дальнейших исследований с целью повышения уровня биосинтеза лизина штаммами продуцентами *Brevibacterium*.

Ключевые слова: аминокислоты, ауксотрофность, биосинтез, клоны, лизин.

**AUXOTROPHITY OF PRODUCENTS
OF LYSIN**

*G. S. Andriyash
G. M. Zabolotna
S. M. Shulga*

State organization «Institute of Food
Biotechnology and Genomics» of National
Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

The investigation of lysine producer strains of «Collections of microbial strains and plant lines for food and agricultural biotechnology» of the State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics» of National Academy of Sciences of Ukraine was carried out. Clonal analysis of the strains was done after batch fermentation of producers on molasses medium. It was found that *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, and *Brevibacterium* sp. XI strains gave colonies scission into two types. All the clones were estimated by biosynthetic activity relatively lysine. Mutational changes were observed in the clones some of which remained dependent on leucine and get a new auxotrophity for threonine, methionine, tryptophan, isoleucine and homoserine. It was shown that only some clones were resistant to S-aminoethyl-L-cysteine — analogue of lysine. Clones on biosynthetic activity relative to the target amino acid were selected for further research with the aim to improve lysine biosynthesis by *Brevibacterium* producer strains.

Key words: amino acids, auxotrophity, biosynthesis, clones, lysine.