

УДК 579.222

МУТАНТНИЙ ШТАМ *Bacillus subtilis* IFBG МК-1 З ПІДВИЩЕНИМ СИНТЕЗОМ ТРИПТОФАНУ

А. Ф. Ткаченко
Н. Є. Бейко
А. І. Хоменко
О. О. Тігунова
С. І. Приймоч
С. М. Шульга

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 17.06.2013

Дослідження з біотехнології незамінних амінокислот спрямовано як на створення оптимальних умов культивування продуцентів і підбір економічно доцільної сировини, так і на одержання більш продуктивних штамів мікроорганізмів, здатних екстрацелюлярно продукувати амінокислоти.

Для успішного проведення мікробіологічного синтезу слід досконало знати метаболізм відповідної культури та слідкувати, щоб у складі середовища росту не було репресуючих речовин.

Проведено скринінг мікроорганізмів — продуцентів триптофану із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України. У результаті було відібрано продуцент триптофану *Bacillus subtilis*, який накопичував найбільшу кількість цієї амінокислоти в культуральній рідині. Знайдено оптимальні умови культивування продуцента. Методами мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовним ступінчастим відбором одержано мутантний штам *Bacillus subtilis* IFBG МК-1, який продукував майже на 50% більше триптофану (13,9 г/л), ніж вихідний штам.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, біосинтез, триптофан.

Одним із методів одержання незамінних амінокислот є мікробіологічний синтез. У промисловому виробництві амінокислот питання економічного споживання вуглецевого субстрату, зниження витрат у процесі мікробіологічного синтезу, а також максимальної повної трансформації субстрату у цільові метаболіти набувають особливої актуальності. Вирішення цих проблем потребує використання нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів, які здатні екстрацелюлярно продукувати цільові амінокислоти. Вивчення фізіологічних та біохімічних властивостей нових штамів, принципів регуляції їх біосинтезу уможлиблює реалізацію біотехнологічних процесів з високою ефективністю [1–5].

В останні роки в селекції продуцентів амінокислот почали активно застосовувати методи генної інженерії, які підвищують дозу генів біосинтезу амінокислот шляхом клонування у плазмідах, а також індукованого мутагенезу і штучного відбору [6].

Унікальні біосинтетичні властивості мають бактерії виду *Bacillus subtilis*. Ці мікроорганізми використовують як пробіо-

тики, окрім того вони синтезують низку метаболітів: ензимів, вітамінів, амінокислот. *Bacillus subtilis* є найпоширенішим об'єктом класичної генетики і дуже зручним для генно-інженерних маніпуляцій. Штами *Bacillus subtilis* мають високий ступінь толерантності й можуть рости в широкому діапазоні значень температури, рН та інших важливих технологічних параметрів [7–9].

Метою роботи було знаходження умов максимального синтезу триптофану *Bacillus subtilis* і підвищення біосинтетичної активності продуцента методом мутагенезу.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були мікроорганізми *Candida utilis* ЛК-5, *Corynebacterium glutamicum* Т-3 і *Bacillus subtilis* із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України.

Бактеріальні культури зберігали на м'ясопептонному агарі (МПА — м'ясопептонний бульйон з 2% агару), дріжджову

культуру — на солодовому агарі (солодове сусло з 2% агару).

Культивування бактерій проводили на збагаченому МПА (склад: м'ясопептонний бульйон — 0,1 л, глюкоза — 0,1 г, дріжджовий екстракт — 0,5 г, агар — 2 г) за температури 35 °С протягом доби, після чого переносили клітини із розрахунку $1 \cdot 10^8$ колонієутворювальних одиниць (КУО)/мл середовища в стерильні колби об'ємом 0,1 л з 0,03 л такого складу (г/л): пептон — 5,0, NaCl — 3,0, глюкоза — 40, дріжджовий екстракт — 0,5.

Для визначення ефективності використання альтернативних середовищ — синтетичного (1), з молочною сироваткою (2), з додаванням меляси (3) використовували живильні середовища такого складу, % :

1) глюкоза — 6,0; гідролізат казеїну — 0,05; KH_2PO_4 — 0,05; K_2HPO_4 — 0,05; MgSO_4 — 0,05; CaCl_2 — 0,03; NaCl — 0,005; сечовина — 0,5;

2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 14; дріжджовий екстракт — 1,0; глюкоза — 25,0; біотин — 0,0004; молочна сироватка — 100,0;

3) меляса — 16,0; дріжджовий екстракт — 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,5; K_2HPO_4 — 0,05; KH_2PO_4 — 0,05.

Для визначення впливу джерел азоту досліджували мінеральні солі: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, які вносили кожну окремо в середовище в кількості 0,15% за азотом.

Культивування бактерій проводили протягом 48 год в шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) при 240 об/хв за температури 35 °С.

Інтенсивність росту визначали після трьох діб ферментації за допомогою фотокolorиметра із зеленим світлофільтром, центральна довжина хвилі $\lambda = 533$ нм, у кюветках об'ємом 0,01 л, з вихідним середовищем як стандартом для порівняння. Кількість мікроорганізмів в 0,01 л середовища вираховували за кривою градування, яку було побудовано на основі визначення одиниць оптичної густини бактеріальних суспензій.

Після культивування протягом трьох діб культуральну рідину центрифугували і визначали триптофан методом тонкошарової хроматографії на пластинках Силуфол UV — 254 (Чехія). Усі досліди проводили в трьох повтореннях.

Для вивчення впливу УФ-опромінення на мікроорганізми використовували популяції на однаковій стадії життєвого циклу (спороутворення). Під час роботи з мутагеном забезпечували рівномірний його розпо-

діл в середовищі з клітинами та швидке припинення дії.

Виконуючи роботи з мутагенезу, застосовували різну тривалість УФ-опромінення для досягнення летального або мутагенного ефекту. Із цією метою використовували лампу БУФ-30 з максимумом опромінення ($\lambda = 257$ нм). Суспензію спор мікроорганізмів опромінювали протягом різних проміжків часу — від 1 до 5 хв. Контролем слугували неопромінені суспензії спор.

Для проведення процесу опромінення суспензію культури готували так (рис. 1). Культуру *Bacillus subtilis* висівали на штрихові пластини із МПА (м'ясопептонний бульйон — МПБ — 0,1 л, агар — 3 г), вирощували в термостаті за температури 30 °С упродовж двох діб. За цей час у *Bacillus subtilis* було утворено 98–99% спор. Готували суспензію спор у стерильній воді (титр — 10^6 КУО/мл спор в 1 мл). Суспензію центрифугували (5 хв за 7 тис. об/хв). Супернатант зливали, спори ресуспендували в розчині NaCl (5г/л). Готували десятикратні розведення суспензії й висівали по 0, 1 мл з розведення 10^4 – 10^6 на чашки зі збагаченим МПА для визначення титру життєздатних мікроорганізмів (по 3 чашки на кожне розведення). Потім суспензію (10 мл) заливали в чашку Петрі, ставили під УФ-лампу на відстані 30 см, відкривали чашку та за постійного перемішування опромінювали

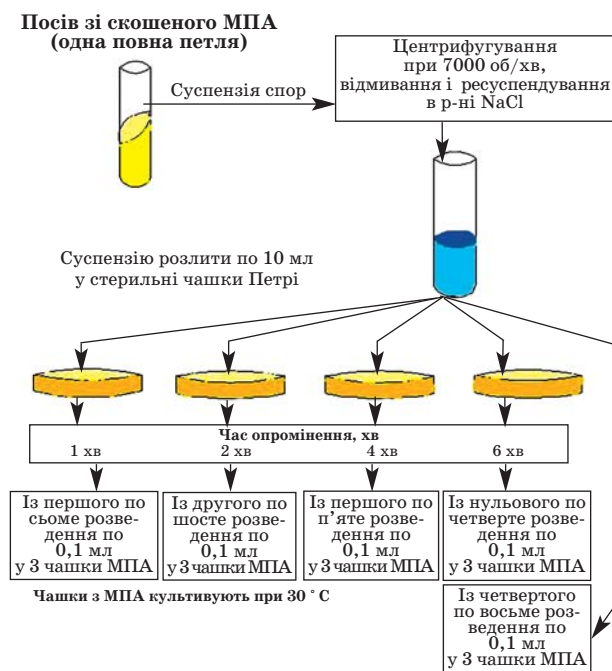


Рис. 1. Схема дослід з визначення дії ультрафіолетового опромінення на культуру продуцента триптофану

суспензію. Після певного часу опромінення відбирали пробу з чашки, робили десятикратні розведення відібраної проби й висівали в чашки Петрі з МПА. Суспензії розсівали, культивували і після закінчення культивування підраховували відсоток життєздатних клітин.

Для оцінювання результатів опромінення клони, що залишилися життєздатними за максимальної дози опромінення, відсівали для подальшого аналізу. Контролем слугували неопромінені суспензії.

Відібрані мутантні клони, які відрізнялися за морфологією колоній, досліджували на ауксотрофність і стійкість до антибіотиків за методиками, наведеними в роботі [9].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною за $P < 0,05$ (достовірність позначали зірочкою *, контролем слугував найнижчий рівень синтезу).

Результати та обговорення

Проведено скринінг культур — продуцентів триптофану за рівнем синтезу триптофану. В результаті скринінгу для подальших досліджень як найбільш перспективну культуру відібрано *Bacillus subtilis*.

Біосинтез метаболітів мікроорганізмами пов'язаний з умовами, які впливають на ріст і розвиток культури, передусім зі складом ензиматичного середовища [10–11].

Головним джерелом енергії для мікроорганізмів є вуглецеві сполуки — вуглеводи. У процесі вирощування культури *Bacillus subtilis* встановлено, що найкращим джерелом вуглецю для росту культури була сахароза (рис. 2).

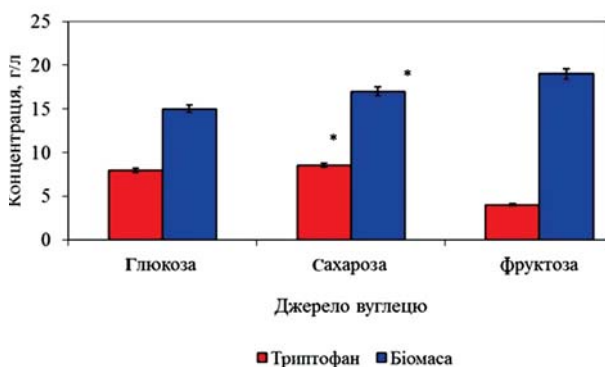


Рис. 2. Синтез триптофану штамом *Bacillus subtilis* на різних джерелах вуглецю (тут і далі * — $P < 0,05$ порівняно з контролем)

На середовищі із сахарозою продуцент *Bacillus subtilis* синтезував більшу кількість триптофану (7,2 г/л) порівняно з глюкозою і фруктозою. У подальших дослідженнях як джерело вуглецю застосовували сахарозу.

Як джерела азоту при культивуванні *Bacillus subtilis* використовують різні мінеральні речовини [11]. Для визначення впливу джерел азоту на синтез триптофану було досліджено декілька таких речовин (табл. 1).

Таблиця 1. Синтез штамом *Bacillus subtilis* біомаси і триптофану на середовищах з різним джерелом азоту

Джерело азоту	Концентрація триптофану, г/л	Біомаса, г/л
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$7,5 \pm 0,2$	$16,5 \pm 0,5^*$
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	$7,2 \pm 0,5^*$	$16,0 \pm 0,2^*$
NH_4Cl	$6,8 \pm 0,8^*$	$14,0 \pm 0,9$
NaNO_3	$6,0 \pm 0,3$	$15,0 \pm 0,8$

Як впливає з табл. 1, усі джерела азоту забезпечували конструктивний обмін, культура накопичувала біомасу з концентрацією від 14 до 17,5 г/л і триптофану — 5,8–7,5 г/л. Кращим джерелом азоту для досліджуваної культури були $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, які активізували синтез біомаси і триптофану.

Подальші експерименти з культивування *Bacillus subtilis* показали, що під час культивування процес біосинтезу залежав від рН середовища (рис. 3).

Кількість клітин збільшувалась із підвищенням початкового значення рН від 4,0 до 7,0. За цих умов одночасно зростала кількість синтезованого триптофану. Подальше

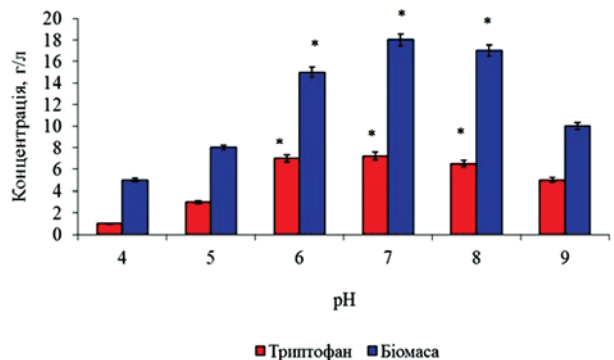


Рис. 3. Синтез триптофану штамом *Bacillus subtilis* залежно від рН середовища

підвищення рН негативно впливало на біосинтез. Оптимальним значенням для продукування біомаси і триптофану було рН 7,0.

Одним із чинників, що впливав на ріст і фізіологічну активність мікроорганізму, була температура культивування. Досліджено процес синтезу біомаси і триптофану залежно від температури культивування (рис. 4).

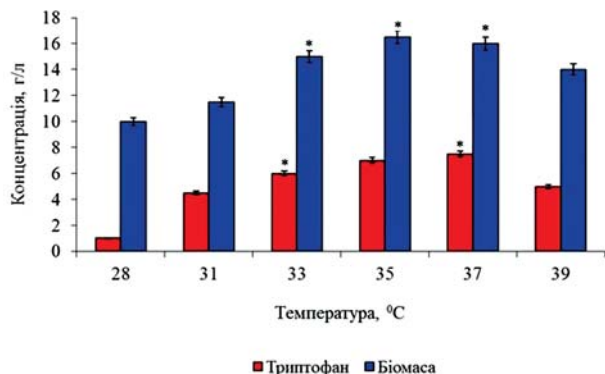


Рис. 4. Синтез триптофану штамом *Bacillus subtilis* за різних температур культивування

Дослідження впливу температури на процес біосинтезу показало, що оптимальна температура для синтезу біомаси становить 35 °C. Підвищення температури культивування до 37 °C супроводжувалось уповільненням синтезу біомаси, однак кількість триптофану зростала. Це можна розглядати як прояв захисних функцій у відповідь на стресові умови. Окрім того, цілком можливо, що температурний оптимум для ензимів, які беруть участь в утворенні триптофану, відрізняється від оптимуму для ензимів, використовуваних для синтезу біомаси [12].

Застосування альтернативних субстратів (відходів харчової, масложирової, цукрової і молочної промисловості) — це постійна актуальна й нагальна потреба для біотехнологічних процесів. Нами було проведено дослідження з використання альтернативних субстратів для культури *Bacillus subtilis* (рис. 5)

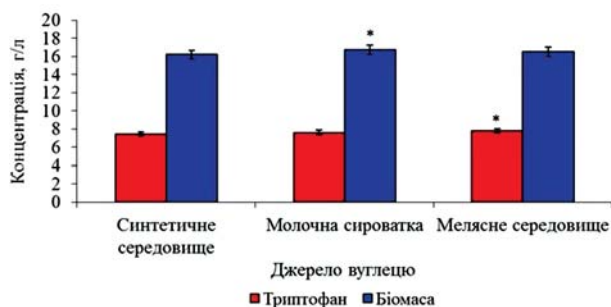


Рис. 5. Синтез триптофану штамом *Bacillus subtilis* на альтернативних субстратах

Найбільшу активність синтезу триптофану було визначено на середовищі з мелясою та молочною сироваткою, хоча синтез біомаси на всіх середовищах практично однаковий. Таким чином, для синтезу триптофану штамом *Bacillus subtilis* можна використовувати комплексні середовища (відходи цукрової і молочної промисловості), що зробить процес більш економічним.

У результаті проведених досліджень впливу умов культивування на синтез триптофану штамом *Bacillus subtilis* було оптимізовано склад середовища і технологічні параметри культивування. Це дало змогу підвищити синтез триптофану на 4%.

Одним з найефективніших способів інтенсифікації синтезу метаболітів є використання високопродуктивних штамів-продуцентів, а одним із методів одержання нових штамів мікроорганізмів з підвищеною продуктивністю є селекція мутантних клонів. Спонтанні мутанти бактерій зазвичай виявляють із частотою 10^{-6} – 10^{-8} . Можна суттєво збільшити цю частоту, обробивши клітини мутагенами. Мутагени індукують мутації в дозах, які одночасно спричиняють летальний ефект.

Види бактерій, а також штами одного виду можуть відрізнятися за чутливістю до мутагенів. Передусім слід було встановити, як різні дози впливають на виживання спор після опромінення. Залежність життєздатності культури *Bacillus subtilis* від часу опромінення подано на рис. 6.

Умови досліду (відстань між УФ-лампою та поверхнею чашки з культурами, їхній фізіологічний стан, хімічний склад та рН середовища) були незмінними, тому біологічні ефекти від опромінення залежали лише від його тривалості. Для *Bacillus subtilis* LD₅₀ (доза, що зумовлює виживання 50% клітин) дорівнювала 1 хв, а найбільший мутагенний ефект у дозах, за яких виживання клітин становило від 0,1 до 1% (гине

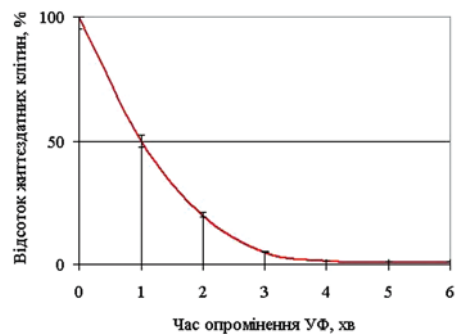


Рис. 6. Залежність життєздатності культури *Bacillus subtilis* від тривалості УФ-опромінення

99,0–99,9%), було зафіксовано за часу опромінення 4 хв.

Частота мутацій загалом збільшувалась лінійно зі зростанням дози УФ-опромінення (у нашому випадку до 4 хв). Подальше збільшення тривалості опромінення (до 5–6 хв) не супроводжувалося зміною показника життєздатності.

Після визначення летальної дози опромінення у *Bacillus subtilis* і розсівання на повноцінне середовище з найбільшого розведення (10^7) відібрали 5 колоній (табл. 2.), які відрізнялися за морфологічними ознаками. Такі колонії були менші за розміром, а край колонії — фестончастий.

Колонії з морфологічними відмінностями відсіяли й перевірили на здатність синтезувати триптофан, що й стало критерієм відбору (рис. 7). Найбільший показник синтезу триптофану був у клону № 3.

Клон № 3 було відібрано для подальших досліджень, перевірено на ауксотрофність (табл. 3) і стійкість до антибіотиків (табл. 4).

Таблиця 2. Життєздатність бактеріальної культури після опромінення

Розведення	Вихідна культура, КУО/мл	Опромінена культура	
		Життєздатні колонії, КУО/мл	Мутантні колонії, КУО/мл
10^{-6}	$1450 \pm 0,23$	$580 \pm 0,9$	$49 \pm 0,3^*$
10^{-7}	$150 \pm 0,23^*$	$60 \pm 0,9$	$5 \pm 0,3$

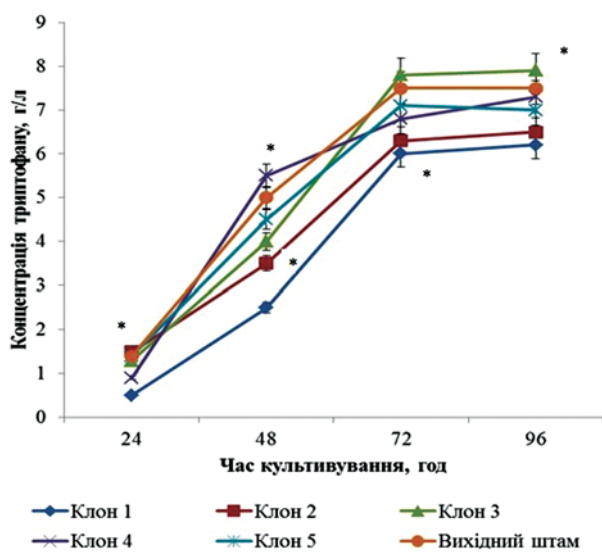


Рис. 7. Синтез триптофану після першого етапу опромінення

Дослідження ауксотрофності показали, що клон № 3 є ауксотрофом, на відміну від вихідного штаму, який є прототрофом, і потребує для свого росту наявності лейцину, аргініну та цистину.

Результати досліджень стійкості до антибіотиків клону № 3 свідчать про те, що він відрізнявся від вихідної культури стійкістю до тетрацикліну і чутливістю до азитроміцину.

Таблиця 3. Ауксотрофність мутантного штаму № 3

Середовище культивування	Показник росту
МПА	+++*
МС	–*
Аспарагін	–
Гістидин	–
Валін	–
Метіонін	–
Аланін	–
Лейцин	++
Ізолейцин	++
Аргінін	+
Треонін	–
Цистеїн	–
Тирозин	–
Гліцин	–
Цистин	++
Глютамінова кислота	–
Триптофан	–
Гомосерин	–

+, ++, +++ інтенсивність росту; – відсутність росту.

Таблиця 4. Стійкість до антибіотиків вихідної культури та клону № 3

Найменування антибіотиків	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> клон №3
Азитроміцин	+*	*
Амоксицилін	+/-*	+/-
Цефтріаксон	+/-	+/-
Бензилпеніцилін	+/-	+/-
Гентаміцин	+	+
Ніфуроксазид	–	–
Тетрациклін	–	+
Еритроміцин	+	+

+ не чутливі; +/- слабо чутливі; – чутливі.

Із клітин клону № 3 було одержано спори, які піддали повторному опроміненню протягом 4 хв зі збереженням усіх умов попереднього етапу. Після опромінення було отримано чотири колонії, які виростили на чашках Петрі з тетрацикліном із розведення 10^{-8} . Ці колонії культивували протягом двох діб і отримали спори, які піддавали опроміненню в тому самому режимі, що й на першому етапі. Рівень синтезу триптофану у відібраних клонів показано на рис. 8. Як видно, найбільшу кількість триптофану синтезував клон № 5.

Із клоном № 5 провели таку саму процедуру з опромінення, як і на перших двох етапах. У цьому разі із трьох відсіяних колоній найкращі результати синтезу було встановлено для клону № 2. Концентрація триптофану в культуральній рідині становила 9,6 г/л (рис. 9).

Із клоном № 2 було проведено ще два етапи опромінення з наступним послідовним селективним відбором, отримано дві колонії (клони № 1 та № 1А) з найбільшого розведення (10^{-8}) і визначено кількість синтезованого триптофану. Синтез триптофану мутантними клонами № 1 та № 1А показано на рис. 10.

За рівнем синтезу триптофану клони № 1 та № 1А майже не відрізнялись. Концентрація становила 13,98 і 13,85 г/л, відповідно.

Клон № 1А передали в колекцію для зберігання, а мутантний клон (МК) № 1 пересівали протягом 4 міс (з інтервалом у 2 тижні) на тверде та рідке середовища з наступним визначенням морфологічних ознак і кільк-

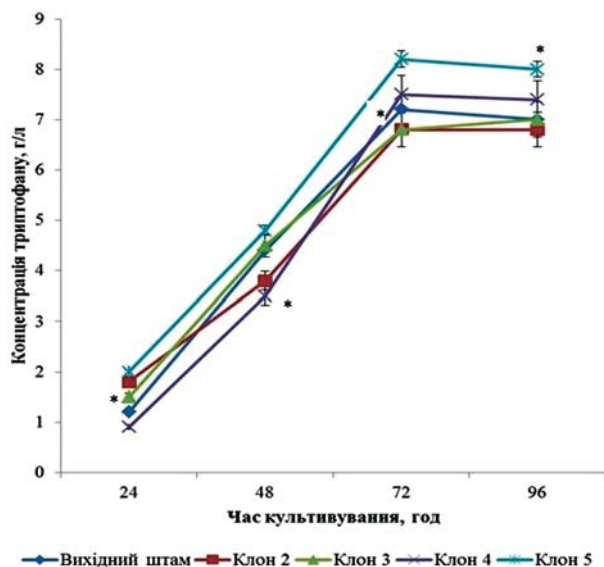


Рис. 8. Синтез триптофану після другого етапу опромінення

кості синтезованого триптофану. Показник синтезу триптофану під час пересіву був майже однаковим — від 13,87 до 13,98 (табл. 5), морфологічні ознаки залишалися незмінними.

У результаті дії УФ-опромінення на спори *Bacillus subtilis* було отримано мутантний штам *Bacillus subtilis* ІФВ МК-1, який за морфологічними ознаками і біосинтетичною активністю достовірно відрізнявся від вихідної культури за синтезом триптофану.

Таким чином, у результаті скринінгу культур із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільсько-

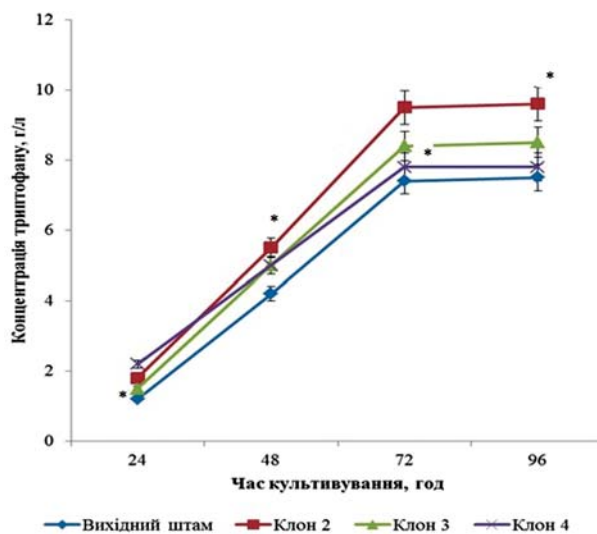


Рис. 9. Синтез триптофану після третього етапу опромінення

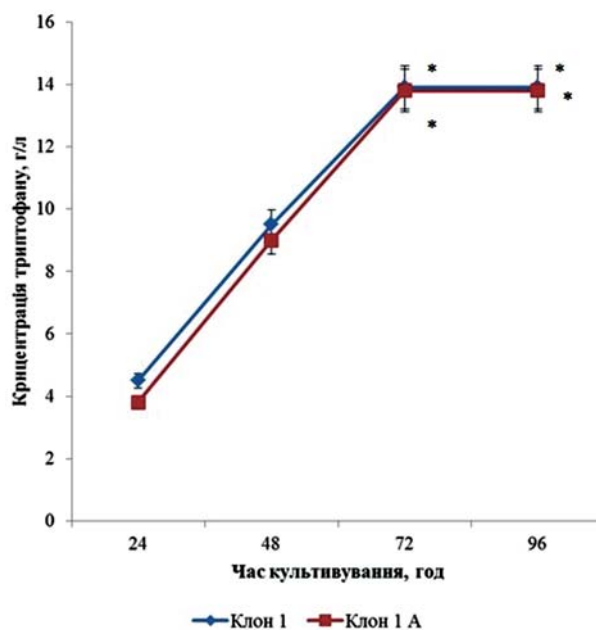


Рис. 10. Синтез триптофану мутантними клонами 1 та 1А

Таблиця 5. Синтез триптофану *Bacillus subtilis* МК-1 протягом 2 місяців зберігання

Пересіви	Технологічні показники			
	pH, од	Сухі речовини, %	Біомаса, г/л	Триптофан, г/л
1	6,68 ± 0,05	11,4 ± 0,1	15,4 ± 0,02	13,87 ± 0,01
2	6,63 ± 0,05	11,25 ± 0,1	15,43 ± 0,03*	13,89 ± 0,03*
3	6,65 ± 0,05*	11,3 ± 0,1*	15,42 ± 0,01*	13,91 ± 0,01*
4	6,68 ± 0,05	11,31 ± 0,1	15,4 ± 0,04	13,92 ± 0,02*
5	6,64 ± 0,05*	11,3 ± 0,1*	15,45 ± 0,01*	13,97 ± 0,01
6	6,63 ± 0,05	11,27 ± 0,1	15,49 ± 0,02	13,97 ± 0,01
7	6,67 ± 0,05*	11,31 ± 0,1	15,4 ± 0,04	13,89 ± 0,02*
8	6,67 ± 0,05*	11,33 ± 0,1	15,44 ± 0,03*	13,98 ± 0,02

господарської біотехнології» було відібрано штам-продуцент *Bacillus subtilis*, який накопичував найбільшу кількість триптофану в культуральній рідині. Дослідження впливу температури на процес біосинтезу показали, що оптимальна температура для синтезу біомаси була 35 °С. Підвищення температури культивування до 37 °С супроводжувалось уповільненням синтезу біомаси, а кількість триптофану зростала. Знайдено оптимальні

умови культивування продуцента, що дало змогу підвищити синтез триптофану. Методами мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовним ступінчастим відбором одержано мутантний штам *Bacillus subtilis* IFBG МК-1, який продукував майже на 50% більше триптофану (13,9 г/л), ніж вихідний штам. Для культивування мутантного штаму було розроблено середовище з урахуванням усіх потреб у поживних речовинах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Umbarger H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation // Annu. Rev. Biochem. — 1978. — V. 47. — P. 533–606.
2. Lessard P., Guillouet A. S., Willis L. B., Sinskey A. J. Corynebacteria, brevibacteria // The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. — 1999. — V. 2, N. Y. — P. 729–740.
3. Ribeiro M. D. M., Alves S. S., Regalo Da Fonseca M. M. Kinetics of L-Tryptophan Production from Indole and L-Serine Catalyzed by Whole Cells with Tryptophanase Activity // J. Biosci. Biotechnol. — 2004. — V. 97, N 5. — P. 289–293.
4. Тигунова Е. А., Ткаченко А. Ф., Бейко Н. Е. и др. Влияние компонентов ферментационной среды на биосинтез триптофана // Материалы VI Моск. междунар. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, 21–25 марта 2011 г. — С. 376–377.
5. Marzieh D. S., Fooladi J., Seyedeh Z. M.-N. L-tryptophan production by *Escherichia coli* in the presence of Iranian can molasses // JPS. — 2010. — V. 1, N 2. — P. 19–24.
6. Koch A. K., Reiser I., Kappeli O., Fiechter A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production // Nat. Biotechnol. — 1988. — V. 6. — P. 1335–1339.
7. Глазунов А. В., Акишина Р. И., Серебренников В. М. Изучение периодического культивирования *Bacillus subtilis* — продуцента рибофлавина // Биотехнология. — 2001. — № 4. — С. 85–91.
8. Arbige M. V., Bulthuis B. A., Schultz J., Crabb D. Fermentation of *Bacillus*: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetic // D. C.: American Society of Microbiology. — 1993. — P. 871–895.
9. Priest F. G. Production from bacillus // Handbooks of Biotechnology. — 1989. — N 4. — P. 293–315.
10. Федоренко В. О., Остап Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Навч. посібник для біологічних факультетів університетів. — 2007. — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. — 280 с.
11. Тигунова Е. А., Ткаченко А. Ф., Бейко Н. Е. и др. Влияние компонентов энзиматической среды на биосинтез триптофана // Биотехнология. — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 51–55.
12. Detsch C., Stulke J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB // Microbiology (UK). — 2003. — V. 149. — P. 3289–3297.

**МУТАНТНЫЙ ШТАММ *Bacillus subtilis*
IFBG МК-1 С ПОВЫШЕННЫМ СИНТЕЗОМ
ТРИПТОФАНА**

*А. Ф. Ткаченко
Н. Е. Бейко
А. И. Хоменко
Е. А. Тигунова
С. И. Прийомов
С. М. Шулга*

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Исследования по биотехнологии незаменимых аминокислот направлены как на создание оптимальных условий культивирования продуцентов и подбор экономически целесообразного сырья, так и на получение более продуктивных штаммов микроорганизмов, которые способны экстрацеллюлярно продуцировать аминокислоты.

Для успешного проведения микробиологического синтеза необходимо в совершенстве знать метаболизм соответствующей культуры и следить за тем, чтобы в составе среды для роста не было репрессирующих веществ.

Проведен скрининг микроорганизмов — продуцентов триптофана из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины. В результате был отобран продуцент триптофана *Bacillus subtilis*, который накапливал наибольшее количество этой аминокислоты в культуральной жидкости. Подобраны оптимальные условия культивирования продуцента. Методами мутагенеза с использованием УФ-облучения и последовательным ступенчатым отбором получен мутантный штамм *Bacillus subtilis* IFBG МК-1, который продуцировал почти на 50% больше триптофана (13,9 г/л), чем исходный штамм.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, биосинтез, триптофан.

**MUTANT STRAIN OF *Bacillus subtilis*
IFBG MC-1 WITH INCREASED
TRYPTOPHAN SYNTHESIS**

*A. F. Tkachenko
N. E. Beyko
A. I. Khomenko
O. O. Tigonova
S. E. Priyomov
S. M. Shulga*

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Scientific research of essential amino acids biotechnology is directed both to create optimum conditions for producer's cultivation and economically viable raw materials selection for these technologies, so as breeding the more productive microorganisms strains capable of extracellular producing amino acids.

For successful microbial synthesis it is necessary to have an excellent crop's metabolism knowledge and ensure that the composition of growth medium have no repressing substances.

Bacterial cultures from «Collection microorganism's stains and plants line for food and agriculture biotechnology» from Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine have been studied. Tryptophan producer *Bacillus subtilis* have been selected, which accumulated the greatest amount of this amino acid in the cultivation liquid. The optimal culture producer conditions were selected. Using selection methods, namely mutagenesis with UV irradiation and sequential stepwise selection, mutant strain *Bacillus subtilis* IFBG MC-1 were obtained which produced nearly 50% more tryptophan (13.9 g/l) than the parent strain.

Key words: *Bacillus subtilis*, biosynthesis, tryptophan, stain.