

УДК 612.398:577.121.3

Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»
2а, вул. Осиповського, 04123, Київ-123, Україна, тел.: +38 (044) 434 45 77,
e-mail: Shulga5@i.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМУ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* ІМВ В-7446 ТА ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСИНТЕЗУ ТРЕОНІНУ

Мета. Ідентифікація та оптимізація процесу біосинтезу мутантного штаму-продуцента треоніну *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446. **Методи.** Штам *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 досліджували за допомогою стандартних мікробіологічних та біохімічних методів. Фрагмент геномної ДНК виділяли з агарозного гелю за допомогою набору «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» згідно з інструкцією фірми-виробника та сиквенували. Порівняльний аналіз здійснено методом оцінки статистичної значимості вирівнювань нуклеотидних послідовностей з використанням програми ClustalW. Філогенетична дендрограма створена з використанням методів поєднання найближчих сусідів та максимальної подібності. **Результати.** Досліджено вплив різних технологічних параметрів культивування на синтез треоніну мутантним штамом *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 та його стабільність. Оптимізацію синтезу було досягнуто за рахунок внесення ростових факторів у середовище культивування. Побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків досліджуваних штамів та споріднених з ними штамів бревібактерій із бази даних «GenBank». **Висновки.** Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК з послідовностями, включеними до бази даних GenBank, показав, що вихідний та мутантний штами мають належати до роду *Corynebacterium*. Мутантний штам мав найвищий відсоток подібності (98%) з видом *C. glutamicum*. Проведено оптимізацію середовища для культивування продуцента та визначено оптимальні параметри культивування (температура, рН, кількість розчиненого кисню, кількість внесеного інокуляту, ростових факторів, різні джерела вуглецю). В оптимізованих умовах культивування штам продукував треонін у кількості 11,9 г/дм³.

Key words: *Brevibacterium flavum*, треонін, 16S рРНК, мутантний штам, оптимізація біосинтезу.

L-треонін (α -аміно- β -гідроксимаєляна кислота), в основному, отримують мікробіологічним способом, тому інтенсифікація процесу біосинтезу може здійснюватися за рахунок підвищення продуктивності штамів-продуцентів або оптимізації процесу біосинтезу [3, 4, 10].

Інтенсифікацію біосинтезу можна досягнути як за рахунок безпосереднього впливу на штами-продуценти, для створення штамів з підвищеною продуктивністю, так і шляхом розширення спектру використання субстратів,

© Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга, 2015



оптимізацією умов культивування, вдосконаленням масообмінних процесів та технологічного обладнання [3,13].

Одним із методів одержання високопродуктивних штамів мікроорганізмів є селекція клонів при дії різних мутагенів [1, 15]. Спонтанні мутанти зазвичай виявляють з частотою 10^{-6} – 10^{-8} , яку можна суттєво підвищити, обробивши клітини мутагенами.

Для одержання продуцентів треоніну із родини корінебактерій використовують селекцію регуляторних мутантів, у яких гомосериндегідрогеназа не чутлива до треоніну. Як селективний агент використовують аналог треоніну β -оксинорвалін (2-аміно-3-оксивалеріанова кислота). Мутанти *Brevibacterium flavum*, стійкі до β -оксинорваліну, мають дві регуляторні мутації, які порушують ретроінгібування як гомосериндегідрогенази, так і аспартаткінази. У таких штамів одночасно виділялися у середовище і треонін, і лізин. Дуже рідко вдається виділити мутанти, у яких десенсибілізована тільки гомосериндегідрогеназа і які накопичують у середовищі 10–12 г/дм³ треоніну без домішок лізину [3].

Метою дослідження була ідентифікація мутантного штаму-продуцента треоніну та визначення оптимальних параметрів культивування. Завдання: провести аналіз нуклеотидних послідовностей за геном 16S рРНК та філогенетичний аналіз мутантного штаму з використанням методів поєднання найближчих сусідів та максимальної подібності; дослідити вплив різних технологічних параметрів культивування (температури, рН, кількості розчиненого кисню, кількості внесеного інокуляту, ростових факторів, різних джерел вуглецю) на синтез треоніну мутантним штамом та його стабільність.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були вихідний штам *Brevibacterium flavum* ТН7, з якого отримано мутантний штам *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 [1] з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України (далі Колекція).

Для вирощування вихідного та отриманого штамів-продуцентів використовували повноцінні поживні середовища м'ясо-пептонний агар (МПА) та м'ясо-пептонний агар збагачений (МПА зб.) [1]. Ідентифікацію проводили за результатами культурально-морфологічного та фізіолого-біохімічного аналізу згідно [2].

Для визначення накопичення треоніну культивування проводили на м'ясному середовищі: (г/дм³): м'яса – 160,0, кукурудзяний екстракт – 40,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15,0; KH_2PO_4 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; біотин – $3,0 \times 10^{-4}$; лейцин – $2,0 \times 10^{-4}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; CuSO_4 – 0,2; NiCl_2 – 0,02.

Після стерилізації вносили стерильну крейду в кількості 10 г/дм³ для створення буферності середовища в процесі метаболізму бактерій. Глибинне культивування здійснювали в колбах Ерленмейєра об'ємом 0,25 дм³ з поживним середовищем об'ємом 0,03 дм³ за температури $31 \pm 1^\circ\text{C}$ при 240 хв⁻¹



в шейкері-інкубаторі “BIOSAN” ES-20 протягом трьох-чотирьох діб. Процес культивування контролювали безпосередньо за допомогою мікроскопії живих препаратів та біохімічних аналізів культуральної рідини (КР) та оцінювали на рідких поживних середовищах вимірюванням концентрації клітин в культуральній рідині за оптичною густиною (ОГ); за зміною рН середовища, за використанням цукрів – резорциновим методом [12]. Кількість синтезованих цільових амінокислот визначали за допомогою амінокислотного аналізатору «AAA-400» (Ingos, Чехія).

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 мг/дм³; тіаміну HCl 1–5×10⁻³ г/дм³; біотину 1–5×10⁻⁴ г/дм³; дріжджового екстракту 0,5–2,5 г/дм³; ізoleyцину та метіоніну від 0,1 до 0,5 мкг/дм³. Розчини амінокислот (наважка амінокислоти масою 0,19 г в 0,025 дм³ дистильованої води) стерилізували протягом 15 хв за тиску 0,5 атм.

Для визначення ефективності альтернативних джерел вуглецю використовували бурякову мелясу, молочну сироватку і синтетичне середовище. Бактерії вирощували на поживному м'ясному середовищі (% на 0,1 дм³ водопровідної води): м'яса – 16,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,5; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; дріжджовий екстракт (ДЕ) – 0,25; а також сироватковому середовищі (% на 100 мл молочної сироватки): глюкоза – 8,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,5; пептон – 0,1; ДЕ – 0,25.

В середовища додатково вносили амінокислоти у кількості 2,5 мкг/0,1 дм³: метіонін, лізин, ізoleyцин, або біотин в кількості 200 мкг на 0,1 дм³.

У роботі використано набір незамінних амінокислот (Shanghai Seebio Biotech. Inc., КНР). Приготування реагентів для біохімічних та електрофоретичних досліджень здійснювали на основі очищеної деіонізованої води «DIRECT Q3», Millipore, США. Виділення ДНК проводили відповідним набором реагентів GeneJET Genomic DNA Purification Kit (cat.No 0721) «Fermentas», Литва-США. Для електрофорезу використовували агарозу, бромід етидію (базовий розчин у концентрації 10 г/дм³) та бромфеноловий синій (всі реактиви виробництва «Sigma», США).

Для виділення ДНК клітини бактерій брали з одностодової культури, отриманої на МПБ зб. за температури 31±1 °С в умовах аерації за 220 хв⁻¹. ДНК виділяли за стандартною процедурою для грампозитивних бактерій [14]. Для ефективнішого лізису клітин додавали 1% лізоциму (10 мг/мл). Виділену ДНК досліджували за допомогою горизонтального електрофорезу та ПЛР [6]. 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 як маркери 1kb – ДНК маркер (1kb Fermentas SM1163).

Ампліфікацію гену 16S рРНК здійснювали за допомогою універсальних бактеріальних праймерів 27f та 1492r (27F 5'-AGA GTT TGA TGG CTC AG-3'; 1492r 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). ПЛР проводили на ампліфікаторі «Mastercycler personal 5332» (Eppendorf, Велика Британія). 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, Литва-США), 2,0 мМ хлориду магнію, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 200 мкл.

Умови ампліфікації: початкова денатурація за $T=95^{\circ}\text{C}$ – 3 хв; 32 цикли ампліфікації ($T=94^{\circ}\text{C}$ – 30 с, $T=57^{\circ}\text{C}$ – 45 с, $T=72^{\circ}\text{C}$ – 30 с); кінцева елонгація відбувалася за $T=72^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв [7]. Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ампліфікації проводили в тріс-ацетатному буфері. Отриманий фрагмент виділяли з агарозного гелю за допомогою набору «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» згідно з інструкцією фірми-виробника та сиквенували послідовності на автоматичному сиквенаторі «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США). 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» [5].

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей. Філогенетичний аналіз. З бази даних «GenBank» було відібрано послідовності гена 16S рРНК різних представників родини бревібактерій, що мають найбільший рівень нуклеотидної подібності до сиквенованих фрагментів гена 16S рРНК досліджуваних штамів-продуцентів лізину. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей в програмі ClustalW [11] та побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків. Філогенетичний аналіз був проведений в програмі MEGA6 [9].

Статистичне опрацювання даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 3 повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Штам-продуцент треоніну *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446, який здатний накопичувати треонін в 4 рази більше ніж вихідний штам *Brevibacterium flavum* ТН7, був отриманий за допомогою УФ опромінення [1]. Для підтвердження таксономічного положення отриманого мутантного штаму проведено аналіз його культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних особливостей.

Отриманий мутантний штам (після 24 годин росту на МПА) виявився аеробом, грампозитивним мікроорганізмом і мав вигляд аспорогенних, часто розташованих під кутом паличок розміром (0,7–1,0 x 2,0–4,0) мкм. Клітини з часом вкорочувались до коковидних. При рості на МПА колонії були круглі, блискучі, непрозорі, жовтого кольору.

Штам засвоював азот у вигляді солей амонію. Утворював кислоту в середовищі з глюкозою, арабінозою і манітом. На середовищі різного складу, де джерелом вуглецю була глюкоза або сахароза клітини, штам синтезував треонін. Ріст клітин відбувався за температури від 20 до 40 °C ($T^{\circ}_{\text{опт.}} 31 \pm 1^{\circ}\text{C}$), при рН від 4 до 9 ($\text{pH}_{\text{опт.}} 7,0$).



Для підтвердження таксономічного положення отриманого мутантного штаму визначили послідовності гену 16S рРНК штамів-продуцентів треоніну з Колекції та встановили їх філогенетичне положення в межах найбільш споріднених штамів роду *Brevibacterium* з бази даних «GenBank» [5].

Ампліфікацію гену 16S рРНК здійснювали з використанням універсальних бактеріальних праймерів 27f та 1492r з подальшим сиквенуванням.

Для визначення родинних зв'язків був проведений філогенетичний аналіз і побудовано філогенетичне дерево. Мірою відповідності набору вирівняних послідовностей даної топології вважається міра (критерій), заснована на принципі найбільшої правдоподібності. Була досліджена дендрограма філогенетичних зв'язків штамів *B. flavum* TH7 (вихідний штам), *B. flavum* IMV 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 (maximum likelihood) з використанням моделі Tamura-Nei для оцінки еволюційної відстані. Кількість повторів (bootstrap) – 1000 (рис. 1). Філогенетичне дерево, побудоване іншим статистичним методом – приєднання сусідів (Neighbor-joining), мало таку саму топологію.

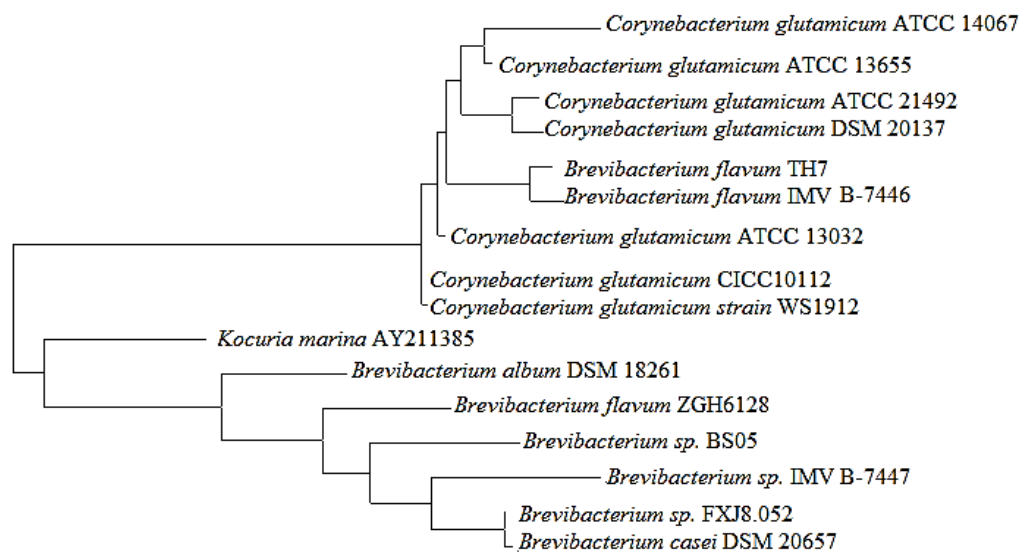


Рис. 1. Філогенетичне положення штамів *Brevibacterium flavum* TH7 та *Brevibacterium flavum* IMV B-7446 серед представників родів *Brevibacterium*, *Kocuria* та *Corynebacterium* на основі послідовності гену 16S рРНК

Fig. 1. Phylogenetic position of *Brevibacterium flavum* TH7 and *Brevibacterium flavum* IMV B-7446 strains among representatives of *Brevibacterium*, *Kocuria* and *Corynebacterium* genera on the basis of 16S rRNA gene nucleotide sequences

Досліджувані штами знаходяться на дендрограмі 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 *Brevibacterium flavum* TH7 та *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 мають бути віднесені до виду *Corynebacterium glutamicum*.

Необхідно звернути увагу, що штами, які відносилися до родів *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* або *Artroracter*, та ін., *Brevibacterium chang-fua*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium glutamigenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium seonmiso*, *Brevibacterium sp.*, *Brevibacterium taipei*, *Brevibacterium thiogenitalis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium herculis*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Microbacterium sp.*, *Micrococcus maripunicenus*, *Artroracter sp.*, після чисельних таксономічних досліджень виявилися в кластері *Corynebacterium glutamicum* [13].

Важливо відзначити, що жоден з продуцентів амінокислот, виду *Brevibacterium*, не є справжнім членом роду *Brevibacterium* [8]. Отже, численні штами були перекласифіковані як *C. glutamicum*. Вміст нуклеотидів (G + C) для штамів *C. glutamicum* знаходиться в інтервалі від 53 до 58% mol. Вміст нуклеотидів (G + C) штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 склав 53,8% mol., вміст (G + C) для мутантного штаму *B. flavum* IMB B-7446 склав 55,4% mol.

Невідповідність, виявлену в ідентифікації на основі комплексу культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних особливостей та аналізування сиквенування гену 16S рРНК можна пояснити здійсненою нещодавно рекласифікації деяких видів *Brevibacterium* як *Corynebacterium* [8]. Таким чином, в подальшому має бути проведений більш детальний аналіз (повний сиквенс) для точної ідентифікації отриманого штаму.

Оптимізація умов культивування мутантного штаму

Для забезпечення підвищення накопичення амінокислот в процесі синтезу необхідно змінити систему регуляції обміну. Для цього потрібно або стимулювати споживання субстрату в деяких шляхах біосинтезу і виділення амінокислот в середовище або пригнічувати побічні реакції і процеси деградації амінокислот [3].

При оптимальних умовах культивування швидкість накопичення біомаси та швидкість утворення продуктів життєдіяльності залежать від кількості інокуляту. Тому було вивчено вплив концентрації посівного матеріалу на приріст бактеріальної популяції та на синтез треоніну (рис. 2). Встановлено, що найвищі показники відносної швидкості синтезу біомаси та треоніну спостерігалися при внесенні у середовище 20% інокуляту.



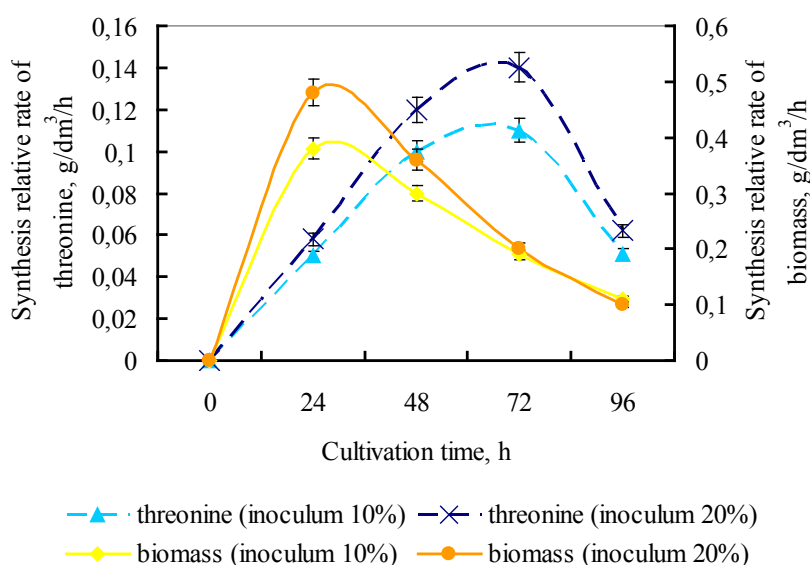


Рис. 2. Відносна швидкість синтезу біомаси та треоніну

Fig. 2. Synthesis rate of biomass and threonine

Одним із факторів, що впливає на ріст мікроорганізмів та їх фізіологічну активність, є температура культивування мікроорганізмів. Накопичення біомаси та синтез треоніну штамом *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) в залежності від температури культивування показано на рис. 3.

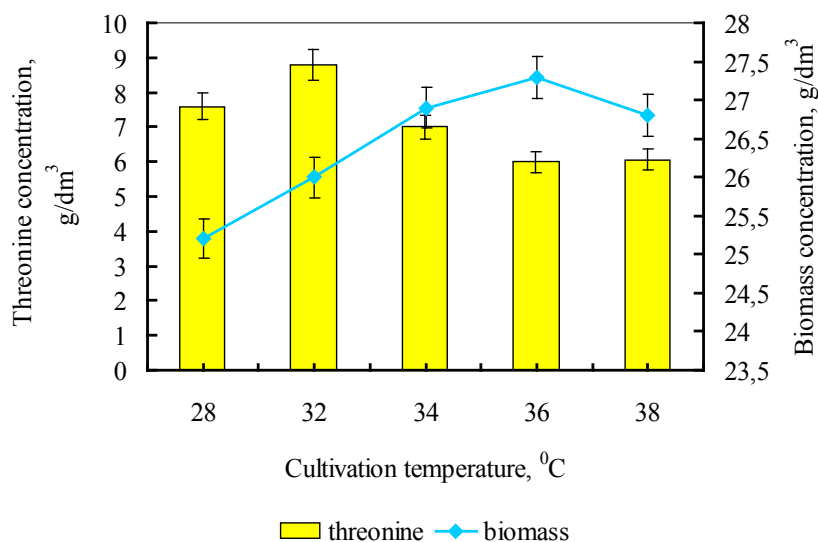


Рис. 3. Вплив температури культивування на синтез біомаси та треоніну

Fig. 3. Temperature cultivation effect on the synthesis of biomass and threonine



Підвищення температури з 28 до 36 °С збільшувало накопичення біомаси. Подальше підвищення температури до 38 °С зменшувало накопичення біомаси. Синтез треоніну при зміні температури з 28 до 32 °С зростав до 8,8 г/дм³, з подальшим зростанням температури синтез знижувався до 6,0 г/дм³. Подальші дослідження проводили за температури 32 °С.

Суттєвий вплив на накопичення біомаси та синтез треоніну має рН середовища [3]. Для стабілізації рН при синтезі треоніну використовували буферний агент Na₂CO₃. Культивування продуценту треоніну проводили при рН 7.

Динаміка утворення біомаси та треоніну бактеріями *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) залежно від зміни швидкості розчинення кисню представлена на рис. 4. Максимальне накопичення біомаси відбувалося при швидкості розчинення кисню 10 г_{O₂}/дм³/год, а максимальна кількість накопичення треоніну при 11 г_{O₂}/дм³/год. Збільшення швидкості розчинення кисню пригнічувало ріст біомаси та треоніну. В подальших дослідженнях використовували швидкість розчинення кисню 11 г_{O₂}/дм³/год.

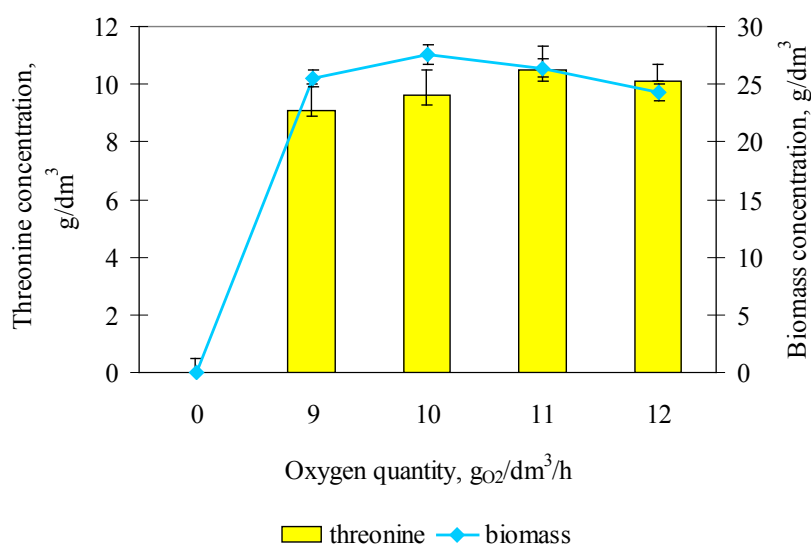


Рис. 4. Вплив швидкості розчинення кисню на синтез біомаси та треоніну

Fig. 4. Influence of oxygen on the dissolution rate of biomass accumulation and threonine synthesis

Для оптимізації умов культивування досліджували залежність концентрації треоніну від внесених у середовище різних ростових факторів. Було знайдено їх оптимальні концентрації (г/дм³): проліну – 0,8; тіаміну – 0,002; біотину – 2,0·10⁻⁴; дріжджового екстракту – 1,0; суміші ізолейцину та метіоніну (0,4 г/дм³ кожної амінокислоти).

Досліджено вплив альтернативних джерел вуглецю (бурякова меляса, молочна сироватка, синтетичне середовище) на синтез треоніну. Кращі по-

казники синтезу були на комплексному мелясовому середовищі порівняно з синтетичним та сироватковим. Процес культивування отриманого мутантного штаму за умов визначених оптимальних параметрів проводили на мелясовому середовищі з додаванням макроелементів (табл. 1).

Таблиця 1

Синтез цільової амінокислоти

Table 1

The synthesis of target amino acid

Продуценти	Показники культуральної рідини				
	pH	ОГ (1:10), λ_{440}	Концентрація сахарози, %	Концентрація треоніну, г/дм ³	Конверсія цукру в цільову амінокислоту, %
Вихідне середовище (без продуценту)	7,0±0,1	0,2±0,1	8,2±0,5	0,9±0,1	-
<i>B. flavum</i> TH 7 (<i>C. glutamicum</i>)	6,6±0,1	1,1±0,1	5,4±0,2	2,0±0,2	3,92±0,1
<i>B. flavum</i> IMB B-7446 (<i>C. glutamicum</i>)	6,7±0,1	1,4±0,1	1,4±0,3	11,9±0,3	16,2±0,2

Вихідний штам мав низький рівень синтезу треоніну на мелясовому середовищі і в незначній кількості споживав цукор (конверсія – 3,92%) (табл. 1). Мутантний штам при культивуванні продукував у 6 разів більше треоніну на мелясових середовищах ніж вихідний та інтенсивно споживав цукор (конверсія – 16,2%).

Таким чином, порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК з послідовностями, включеними до бази даних GenBank, показав, що вихідний та мутантний штами мають належати до роду *Corynebacterium*. Мутантний штам мав найвищий відсоток подібності (98%) з видом *C. glutamicum*, хоча надалі необхідно провести додатковий аналіз (повний сиквенс) для визначення точної видової приналежності. Проведено оптимізацію середовища для культивування продуцента та визначено оптимальні параметри культивування (температура 32 °С, pH 7,0, кількість розчиненого кисню – 11 Г_{О₂}/дм³/год, кількість внесеного інокуляту 20%), ростові фактори, джерело вуглецю. В оптимізованих умовах культивування мутантний штам продукував треонін у кількості 11,9 г/дм³.



УДК 612.398:577.121.3

А.С. Андрияш, Г.М. Заболотная, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,
ул. Осиповского, 2а, Киев-123, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *BREVIBACTERIUM FLAVUM* IMB B-7446 И ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ТРЕОНИНА

Реферат

Цель. Идентификация и оптимизация процесса биосинтеза мутантного штамма-продуцента треонина *Brevibacterium flavum* IMB B-7446. **Методы.** Штамм *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 исследовали с помощью стандартных микробиологических и биохимических методов. Фрагмент геномной ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» согласно инструкции фирмы-производителя и секвенировали. Сравнительный анализ осуществляли методом оценки статистической значимости выравненных нуклеотидных последовательностей с использованием программы ClustalW. Филогенетическая дендрограмма создана с использованием методов сочетания ближайших соседей и максимального сходства. **Результаты.** Исследовано влияние различных технологических параметров культивирования на синтез треонина мутантным штаммом. Интенсификацию синтеза достигнуто за счет внесения ростовых факторов в среду культивирования. Построена дендрограмма филогенетических связей исследуемых штаммов и родственных им штаммов бревибактерий из баз данных «GenBank». **Выводы.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рДНК с последовательностями, включенными в базу данных GenBank, показал, что исходный и мутантный штаммы могут принадлежать к роду *Corynebacterium*. Мутантный штамм имел высокий процент сходства (98%) с видом *C. glutamicum*. Проведена оптимизация среды для культивирования продуцента и определены оптимальные параметры культивирования (температура, pH, количество растворенного кислорода, количество внесенного инокулята, ростовых факторов, различные источники углерода). В оптимизированных условиях культивирования штамм производил треонин в количестве 11,9 г/дм³.

Ключевые слова: треонин, 16S рРНК, мутантный штамм, оптимизация.

УДК 612.398:577.121.3

G.S. Andriiash, G.M. Zabolotna, A.F. Tkachenko, S.M. Shulga

State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics»
of National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osypovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine,
tel.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

THREONINE MUTANT STRAIN-PRODUCER *BREVIBACTERIUM FLAVUM* IMB B-7446 CHARACTERISTICS AND OPTIMIZATION PROCESS OF ITS BIOSYNTHESIS

Summary

Aim. Identification and optimization process of biosynthesis threonine of mutant strain-producer *Brevibacterium flavum* IMB B-7446. **Methods.** The strain



Brevibacterium flavum IMB B-7446 was studied using standard microbiological and biochemical methods. A fragment of genomic DNA isolated from agarose gel using a set of «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» according to the instructions of the manufacturer and sequenced. A comparative analysis was done by evaluation of statistical significance adjustment nucleotide sequences using the program ClustalW. Phylogenetic dendrogramm was created using a combination of techniques nearest neighbors and maximum likelihood. **Results.** The influence of different process parameters on the synthesis of cultivation threonine mutant strain and stability. Intensification synthesis was achieved by introducing growth factors in the culture medium. Powered dendrogramm of phylogenetic relationships investigated the strains and related the strains of *Brevibacterium* databases «GenBank». **Conclusions.** Comparative analysis of nucleotide sequences of gene 16S rRNA sequences included in the database GenBank, showed that the mutant and parent strains may belong to the genus *Corynebacterium*. Mutant strain had a high percentage of similarity (98%) with a species *C. glutamicum*. Optimization of the medium for culturing and producing the optimal cultivation parameters (temperature, pH, dissolved oxygen, the amount of inoculation, growth factors, various carbon sources) was established. Threonine strain was produced 11,9 g/dm³ by optimized cultivation conditions.

Key words: threonine, 16S rRNA, mutant strain, optimization.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрияш Г.С., Заболотна Г.М., Шульга С.М. Мутантні штами-мікроорганізми – продуценти лізину та треоніну // *Biotechnology Acta.* – 2014. – Т. 7, № 3. – С. 95–101.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.
3. Debabov V.G. The threonine story // *Biochem. Engineer. Biotechnol.* – 2003. – V. 79. – P. 113–136.
4. Dong X., Quinn P.J., Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – P. 1–13.
5. GenBank (Base sequences of DNA) URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
6. Griffith A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. An introduction to genetic analysis. – N.Y., W.H. Freeman. – 2000. – 306 p.
7. Guttel R., Larsen N., Woese C. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective // *Microbiol. Review.* – 1994. – 8 (1). – P. 10–24.
8. Liebl W. *Corynebacterium* taxonomy. In: Eggeling E., Bott M. *Handbook of Corynebacterium glutamicum: Chapter 2. Corynebacterium taxonomy.* US, Boca Raton, Florida: CRC Press. – 2005. – P. 9–37.
9. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – 30. – P. 2725–2729.



10. Tessaeraud S., Everaert N., Boussaid-Om Ezzine S., Collin A., Metayer-Coustard S. and Berri C. Manipulating tissue metabolism by amino acids // *World's Poultry Sci. J.* – 2011. – Vol. 67. – P. 382–385.

11. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – 22(22). – P. 4673–4680.

12. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasukuki, Arildo José Braz de Oliveira, Emerson Dechechi Chambó and Sheila Mara Sanches Lopes. Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees: Reducing sugar determination. In: Dr. Jamal Uddin (Ed.), *Macro to Nano Spectroscopy: Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees*. InTech. – 2012. – P. 269–290.

13. Vertes A., Inui M., Yukawa H. The biotechnological potential of *Corynebacterium glutamicum*, from Umami to Chemurgy. In: Yukawa H, Inui M.. *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology: The biotechnological potential of Corynebacterium glutamicum, from Umami to Chemurgy*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. – 2013. – P. 1–51.

14. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Current protocol in Mol. Biol.* – 2001. – 2.4.1–2.4.5.

15. Yetti M.I., Pudjiraharti S. Strain improvement of *Brevibacterium sp* ATCC 21866 for L-lysine production using ultra violet irradiation // *Technology Indonesia*. – 2004. – № 27. – P. 9–16.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2015 р.

