

П. Н. Дімітрова

ОТРИМАННЯ МУТАНТІВ *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* — ПРОДУЦЕНТІВ ВІТАМІНУ B_{12} І ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Вивчали мутагенну дію супермутагена *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину на культуру *Pr. shermanii* 128. Визначено час експозиції з мутагеном — 30 і 60 хв. Отримані мутанти були первинно оцінені за їх здатністю накопичувати вітамін B_{12} . Ізольовано штам *Pr. shermanii* 1818, який синтезує до 45 мг/см³ вітаміну B_{12} .

Десять найпродуктивніших з усіх перевірених мутантів по вітаміноутворенню досліджено на ауксотрофічність. Наведено їх біохімічну характеристику.

Вступ. За допомогою постійного природного пересіву і відбору активних форм (автоселскцією) можна збільшити продуктивність пропіоновокислих бактерій у відношенні синтезу вітаміну B_{12} [5—7]. Проте індукований мутагенез і відбір культур зі зміненим генотипом розширює можливості отримання мутантів з підвищеним рівнем біосинтезу цього вітаміну [2—4, 6, 8, 10]. При багаторазовій дії хімічним мутагенним фактором і наступному відборі найпродуктивніших видів (клонів) накопичуються окремі біохімічні мутації і в результаті виникають форми мікроорганізмів, що відрізняються від початкових штамів цілим набором морфологічних і фізіологічних ознак.

Мета цієї розробки — отримання, ізоляція і біохімічна характеристика мутантів *Pr. shermanii* — продуцентів вітаміну B_{12} .

Матеріали і методи. Бактеріальні культури, середовища і умови росту. В експериментах використано мутантний штам *Pr. shermanii* 128, отриманий за допомогою індукованого мутагенезу з батьківського штама *Pr. shermanii* 15 [9].

Склад середовища для ізоляції і росту мутантів, а також посівні і ферментаційні середовища з метою випробування вітаміноутворюючої здатності описані в нашій попередній роботі [2]. Так, середовище на основі молочної сироватки використано для культивування та підтримування вихідних штамів.

Мінімальне диференційне середовище включає сім видів неорганічних солей і глюкозу як джерело вуглецю. Воно створене на основі вже відомих середовищ [1, 4, 11]. До його складу входять (%): глюкоза — 1,0; K_2HPO_4 — 0,1740; KH_2PO_4 — 0,1360; $(NH_4)_2SO_3$ — 1,60; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,001; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 0,003; $CoCl_2$ — 0,01.

В табл. 1 наведено фактори росту (вітаміни, амінокислоти, пуринові і піримідинові основи), які додавали до мінімального середовища в комбінаціях, що створювали 12 диференційних середовищ за схемою Холідея [11]. Останні використовували для визначення передбачених ауксотрофних мутантів.

Посівний матеріал отримували на синтетичному середовищі, яке містило (%): глюкозу — 1,0; гідролізат казеїну — 0,1; *Vacto-Tripton* — 0,15; дріжджовий екстракт — 0,5; біотин — 0,00003; пантотенат кальцію — 0,0004; NaH_2PO_4 — 0,16; K_3PO_4 — 0,16; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,04; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001; $CoCl_2$ — 0,0012.

Всі використані поживні речовини у середовищах стерилізували вологим паром під тиском при 121 °C протягом 15 хв. Завчасно було скориговано рН від 6,6 до 6,8.

Для біохімічної характеристики мутантів застосовували поживні середовища в ампулах, які містили стерильні субстрати в об'ємі 2 см³. Безперервне підтримування батьківського штама і мутантних культур здійснювали при температурі 4 °С на синтетичному середовищі в ліофілізованому стані. Мутанти культивували в середовищі на основі молочної сироватки і пересівали щотижня.

Всі штами розвивалися при 30 °С в анаеробних умовах. Рідкі середовища засівали інкулятом в кількості 12,5 % і, як правило, досягали стаціонарної фази росту за 40—48 год.

Мутагенна обробка. Бактерійну культуру *Pr. shermanii* 128 в логарифмічній фазі росту центрифугували при 4000 об/хв протягом 15 хв. Клітини відмивали фосфатним буфером і ресуспендували в тому ж буфері до концентрації з оптичною густиною $D=0,9-1,1$, яку визначали на ФЕК-56 при $\lambda=570$ нм і товщині кювети 10 мм. Розчин супермутагена N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину (НМНГ) готували в тому ж буфері і при температурі 0 °С додавали до клітинної суспензії, при цьому час експозиції з мутагеном складав 30 і 60 хв. Після видалення мутагенного фактора (центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 15 хв) клітини відмивали двократно і ресуспендували у фосфатному буфері. Культуру розбавляли фізіологічним розчином і використовували для посіву. Чашки Петрі з відповідними розбавленнями термостатували при 30 °С в анаеробних умовах. Видні колонії з'являлися на 7—10-ту добу від початку інкубації. Після цього вибрані візуально колонії переглядали під мікроскопом і, переконавшись у їх чистоті, пересівали на рідке середовище для наступних досліджень, методики яких описані в нашій роботі [2].

Умови культивування і характеристика мутантів. Отримані мутанти підлягали первинній оцінці за їх здатністю утворювати вітамін В₁₂. Ферментацію здійснювали в колбах об'ємом 500 см³ у середовищі, створеному на основі молочної сироватки. Культивування проводили періодичним способом при 30 °С протягом 84—108 год; на 40-й год від його початку додавали 5,6-диметилбензімідазол. Кількість синтезованого вітаміну В₁₂ визначали мікробіологічним методом [6].

Десять найпродуктивніших з усіх перевірених на вітаміноутворення мутантів досліджували на ауксотрофію. Клітини кожного штама, що росли на синтетичному середовищі до середини експоненційної фази, відділяли, ресуспендували у фосфатному буфері і пересівали на 12 діагностичних середовищ за схемою Холідея [11]. Ці середовища готували

Таблиця 1

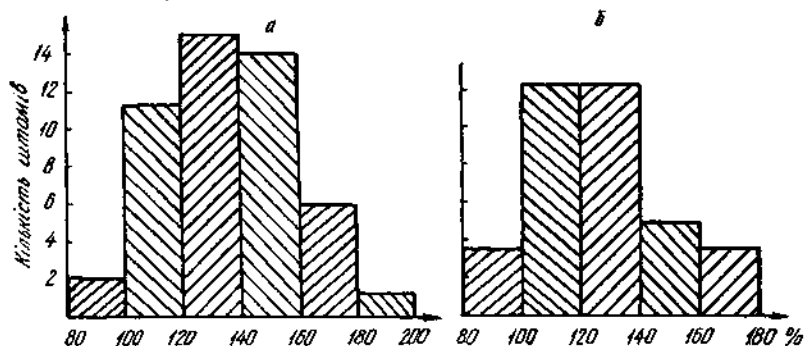
Фактори росту в діагностичних середовищах

| Фактор росту | Концентрація, мг/см ³ | Фактор росту | Концентрація, мг/см ³ |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Аланін | 1 | Піридоксин | 50 |
| Аргінін | 1 | Пролін | 1 |
| Аспарагінова кислота | 1 | p-Амінобензойна кислота | 1 |
| Аденін | 5 | Рибофлавін | 250 |
| Біотин | 1 | Серин | 1 |
| Валін | 1 | Тимін | 5 |
| Глутамінова кислота | 1 | Тирозин | 1 |
| Гуанін | 5 | Тіамін | 1 |
| Гліцин | 1 | Треонін | 1 |
| Ізолейцин | 1 | Триптофан | 1 |
| Інозит | 500 | Урацил | 1 |
| Лейцин | 1 | Фенілаланін | 1 |
| Лізин | 1 | Гістидин | 1 |
| Метіонін | 1 | Гілоксантин | 1 |
| Нікотинова кислота | 1 | Фоліева кислота | 50 |
| Тіосульфат натрію | 5 | Холін | 1 |
| Орнітин | 1 | Цитозин | 5 |
| Пантотенова кислота | 50 | Цистин | 1 |

завчасно у вигляді розчинів з відповідною концентрацією і кожний розчин добавляли до середовищ в кількості 1 %. Кожне із 12 тест-середовищ визначали як підтримуюче ріст окремих штамів, якщо вони продовжували рости після трьох пасажів у тому ж середовищі.

Десятьом мутантам надано також біохімічну характеристику.

Для визначення здатності бактерій розкладати вуглеводи і багатоміспирити використовували рідкі поживні середовища, які включали відповідний вуглевод та індикатор (так званий «строкатий» ряд).



Розподіл за продуктивністю вітаміну В₁₂ мутантів (% відносно батьківського штама), отриманих при експозиції з мутагеном протягом 30 (а) і 60 (б) хв

Після пересіву кожного штама і його інкубації при температурі 30 °С зміни в субстраті за відповідний строк (24—36 год) враховували візуально за кольором індикаторів.

Результати і обговорення. Отримання продуктивних штамів пропіоновоксилих бактерій залежить не тільки від вибору оптимальної дози мутагена, але і від терміну експозиції. Нашими попередніми дослідженнями [2] встановлено, що застосування високих концентрацій НМНГ (до 1000 мг/см³), призводить до утворення продуктивніших і стабільніших мутантів в порівнянні з обробкою меншими дозами.

В результаті впливу НМНГ на культуру *Pr. shermanii* 128 ізольовано 70 клонів, із них 40 — при експозиції з мутагеном протягом 30 хв і 30 — протягом 60 хв. При відборі високоактивних штамів всі культури в процесі культивування індивідуально оцінювали за кількістю синтезованого вітаміну В₁₂. Контролем служив батьківський штам, що накопичував до 25 мг/см³ вітаміну В₁₂.

Розподіл отриманих мутантів за продукуванням вітаміну виражали у відсотках відносно батьківського штама. Дані представлені на рисунку.

При дії НМНГ у концентрації 1000 мг/см³ і експозиції протягом 30 хв отримано 8 клонів з біосинтетичною активністю, вищою за 40 мг/см³. При експозиції з мутагеном протягом 60 хв число їх зменшилося до трьох. Штам *Pr. shermanii* 1818 накопичував у клітинах до 45 мг/см³ вітаміну В₁₂ і надалі його було використано як вихідну культуру для подальшого мутагенного впливу і поетапного відбору високоактивних продуцентів.

Результати первинної оцінки обґрунтовані методом математичної статистики. Було виділено штами, яким притаманна більш висока вітаміноутворююча активність, що характеризується як $\bar{x} \pm 3\sigma/\bar{x}$ (де \bar{x} — середня арифметична активність; σ — середнє квадратичне відхилення). У цих же мутантів було простежено біосинтетичну стабільність протягом чотирьох послідовних генерацій (табл. 2).

Експерименти показують, що у п'яти послідовних мутантів біосинтетична активність під час досліджуваного періоду зменшується. Одинадцять клонів зберігали високу вітаміноутворюючу здатність і були віднесені до плюсових варіантів. Негативні по біосинтезу коріноїдів варіанти клонів зберігають низьку активність в результаті повторних пересівів.

Аналіз морфологічних ознак клітин, а також культуральних властивостей колоній, що виростили із раніше оброблених мутагеном клітин *Pr. shermanii* 128, свідчить про те, що вони не відрізняються у позитивних варіантів клонів від їх початкового батьківського штаму. Негативні варіанти мутантів утворюють порівняно менші колонії жовтого або сірого кольору. Їх форма кругла, поверхня гладка з рівними рубцями. Вони характеризуються слабшим біосинтезом вітаміну B₁₂.

Вивчено також вплив терміну дії мутагена НМНГ на клітини пропіоновокислих бактерій для перевірки їх виживання. Показано, що воно зменшується із зростанням часу обробки. Ці результати збігаються з даними Воробйової та ін. [4]. Питома частина клітин, що вижили, при впливові НМНГ в концентрації 1000 мг/см³ протягом 30 хв складала 1,3 %, в той час як при експозиції 60 хв — тільки 0,5 %.

Аналіз 10 мутантних культур пропіоновокислих бактерій для визначення потреби у ростових факторах виявив їх аутокотрофну специфічність серед таких, які проявили високу вітаміноутворюючу активність. Штами, що несуть подібні маркери, можна легко ідентифікувати і селекціювати у майбутніх генетичних експериментах. Посіяні на 12 діагностичних середовищах штами містили різні концентрації і комбінації

Таблиця 2

Біохімічна активність мутантів, отриманих при дії на *Pr. shermanii* 128 супермутагена НМНГ

| Штам | Активність вітаміну B ₁₂ , мг/см ³ | | | | Штам | Активність вітаміну B ₁₂ , мг/см ³ | | | |
|------|--|------|------|------|------|--|------|------|------|
| | Номер дослідю | | | | | Номер дослідю | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1802 | 41,3 | 37,4 | 32,3 | 32,8 | 1821 | 32,2 | 31,9 | 32,8 | 31,5 |
| 1803 | 44,9 | 45,2 | 44,8 | 45,1 | 1822 | 42,8 | 40,4 | 42,9 | 41,3 |
| 1804 | 33,6 | 29,9 | 27,7 | 28,3 | 1511 | 35,0 | 32,3 | 34,6 | 36,0 |
| 1805 | 41,7 | 42,6 | 42,0 | 41,8 | 1510 | 31,4 | 32,1 | 30,3 | 31,0 |
| 1806 | 41,4 | 39,8 | 38,6 | 39,3 | 1520 | 44,5 | 42,0 | 39,9 | 40,4 |
| 1811 | 33,2 | 32,9 | 34,5 | 33,7 | 1514 | 41,1 | 41,6 | 42,8 | 42,4 |
| 1818 | 45,5 | 43,9 | 44,1 | 44,3 | 1519 | 35,0 | 36,5 | 34,9 | 35,7 |
| 1819 | 43,3 | 43,1 | 42,6 | 43,0 | 1525 | 43,9 | 39,0 | 35,0 | 35,7 |

Таблиця 3

Біохімічна характеристика мутантів *Pr. shermanii* 128 — продуцентів вітаміну B₁₂

| Органічне середовище | Мутант | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | П-1 | П-2 | П-3 | П-4 | П-5 | П-6 | П-7 | П-8 | П-9 | П-10 |
| Арабіноза | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Галактоза | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Сахароза | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Лактоза | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Мальтоза | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ± |
| Рамноза | + | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Трахалоза | + | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Глікоген | + | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Декстрини | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Інулін | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Адоніт | + | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Дульцит | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Маніт | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Саліцин | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Сорбіт | + | + | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| Желатин | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| На основі молочної сироватки | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Примітка. «+» — добре, «±» — слабо і «-» — зовсім не засвоює органічне джерело живлення.

вітамінів, амінокислот, пуринових і піримідинових основ. Незважаючи на мутагенну дію НМНГ, культури зберегли здатність синтезувати згадані речовини. Вони добре росли на всіх діагностичних середовищах при кількох пересівах. Всі мутанти виявилися прототрофами, що можуть рости на мінімальному середовищі без додавання ростових факторів.

Для доказу ідентичності 10 мутантних штамів було визначено їх аміло- і протеолітичні властивості (табл. 3).

В анаеробних умовах всі мутанти інтенсивно зброджують глюкозу з утворенням кислоти і газу. Засвоюють адоніт, інозит. Деякі з них слабо використовують рамнозу (*Pr. shermanii* П-10), інулін (*Pr. shermanii* П-4, П-8, П-9, П-10), декстрин, глікоген (*Pr. shermanii* П-8, П-10), маніт (*Pr. shermanii* П-3, П-9, П-10), сорбіт (*Pr. shermanii* П-5, П-10), саліцин (*Pr. shermanii* П-3, П-4, П-7). Штами *Pr. shermanii* П-5, П-6, П-10 не використовують саліцин. Штам *Pr. shermanii* П-10 не використовує дульцит і трегалозу. Всі досліджені штами розжижують желатин і ісптонізують молоко.

Результати проведених експериментів показали, що внаслідок впливу НМНГ на клітини *Pr. shermanii* 128 за умови різного терміну експозиції індуюються мутації і утворюються клони, здатні накопичувати вітамін В₁₂ у значно більшій кількості, ніж батьківський штам. При дії НМНГ у концентрації 1000 мг/см³ і експозиції протягом 30 хв ізольований і виділений штам *Pr. shermanii* 1818 синтезує до 45 мг/см³ вітаміну В₁₂, що перевищує по продуктивності батьківський штам на 83 %.

Десять тестованих бактерійних мутантів, що належать до плюс-варіантів з високою вітаміноутворюючою здатністю, зберегли батьківський генотип і щодо потреби у ростових факторах.

P. N. Dimitrova

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MUTANTS OF PROPIONIBACTERIUM SHERMANII OF PRODUCER OF VITAMIN B₁₂

Summary

N-methyl-N-nitro-N-nitrozoguanin effective on *Propionibacterium shermanii* 128. The time define for exposition with mutagenes 30 and 60 min. *Propionibacterium shermanii* 1818 sinthezies to 45 mg/cm³ vitamin B₁₂. Generation, isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Propionibacterium*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂.— М.: Изд-во МГУ, 1976.— 264 с.
2. Димитрови Н. Н., Мургов И. Д. Получаване на мутанти на *Propionibacterium shermanii* с повишен синтез на витамин В₁₂ // Науч. труды ВИХВП.— Пловдив, 1990.— Т. 37.— С. 205.
3. Олинская Н. Л. Хранение пропионовокислых бактерий // Прикл. биохимия и микробиология.— 1988.— 24, № 8.— С. 38.
4. Попова Я. Химия и технология на витамините.— Пловдив: Изд-во ВИХВП, 1972.— 351 с.
5. Пушкин А. В., Елисева А. А., Быховский В. Я. Взаимосвязь биосинтеза корринонов и глутамина у пропионовокислых бактерий // Прикл. биохимия и микробиология.— 1988.— 24.— С. 756.
6. Цанев Н., Митов Г. Ръководство за практически упражнения по микробиология.— София: Медицина и физкультура, 1978.— С. 179.
7. Battersby A. Synthetic and biosynthetic studies on vitamin В₁₂ // J. Natur. Products.— 1988.— 51.— P. 629.
8. Glats B. A., Hofherr L. Mutagenesis of strains of *Propionibacterium* to produce cold-sensitive mutants // J. Dairy Sci.— 1983.— 66.— P: 2482.
9. Glats B. A., Kathleen I. A. Isolation and characterization of mutants of *Propionibacterium* strains // Ibid.— 1988.— 71.— P. 1769—1776.
10. Glats B. A. Generation, isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Propionibacterium* // Ibid.— 1979.— 70.— P. 79.
11. Холидей Р. Сочетания аминокислот, витаминов, пуринов и пириимидинов, используемые для определения потребностей ауксотрофных штаммов в факторах роста // Сб. методик по генетике микроорганизмов.— М.: Медицина, 1970.— 239 с.

Вищий ін-т харчової і смакової промисловості, Пловдив

Одержано 21.03.95