

УДК 579.222: 575.827: 575.224.2:577.112.386

С. Г. Каракіс, ст. наук. співроб., **О. Г. Драгоєва**, мол. наук. співроб.,
Т. І. Лавренюк, мол. наук. співроб., **В. А. Сагаріц**, наук. співроб.,
Л. М. Карпов, д-р біол. наук, зав. кафедри
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра фізіології людини та тварин,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

СЕЛЕКЦІЯ МУТАНТНИХ ШТАМІВ *SPIRULINA PLATENSIS* З ПІДВИЩЕНИМ ВМІСТОМ МЕТІОНІНУ В БІОМАСІ

Штам 198Б отримано із штаму дикого типу (ДТ) *Sp. platensis* за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу як наслідок декількох етапів добору на стійкість до DL-етіоніну. Вміст метіоніну в біомасі 198Б вищий, ніж у ДТ, в 2,2 рази, а в амінокислотній композиції — в 1,6 рази. На основі аналізу амінокислотного складу клітин ДТ, 198Б та проміжних штамів встановлено, що інтенсифікація процесів центрального метаболізму є необхідною умовою для виживання мутантів *Sp. platensis* з порушеннями окремих етапів біосинтезу метіоніну, які призводять до надсинтезу цієї амінокислоти.

Ключові слова: *Spirulina*, мутанти, селекція, надсинтез, метіонін.

Біомаса ціанобактерії *Spirulina platensis* знаходить широке застосування як білково-вітамінна харчова домішка. Білок цієї ціанобактерії добре збалансований за амінокислотним складом, однак у порівнянні з найкращими харчовими білками, такими як казеїн молока корів та яєчний альбумін, білок спіруліни має занижений вміст метіоніну [1, 2]. Нарасіма із співавторами [3] експериментально довели, що домішки екзогенного метіоніну в спірулінову дієту щурів значно поліпшують її біологічну цінність та утилізацію сирого протеїну. Проблему підвищення харчової якості біомаси спіруліни можна вирішити також шляхом отримання мутантних штамів, здатних до надсинтезу метіоніну та його накопичення в біомасі у підвищеній кількості.

Універсальним методом отримання мутантів мікроорганізмів, здатних до надсинтезу певних метаболітів, у тому числі й амінокислот, є отримання мутантів з порушеною регуляцією біосинтезу цих метаболітів шляхом застосування структурних аналогів як позитивних факторів селекції [4, 5]. Мутанти, стійкі до аналогів різних амінокислот та маючі порушення в системі регуляції біосинтезу амінокислот, були отримані серед ціанобактерій *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Spirulina platensis* [6, 7, 8]. У відомих нам роботах селекція мутантів ціанобактерій, стійких до аналогів амінокислот, проводилася з метою отримання продуцентів вільних амінокислот, тому доскональний аналіз амінокислотного складу біомаси в цілому та окремо білка не проводився. Праць по селекції штамів *Sp. platensis* з підвищеним вмістом метіоніну у біомасі та

інформації про такі мутантні штами в доступній літературі виявити не вдалося.

Мета цієї роботи — отримати мутантів *Sp. platensis* з підвищеним вмістом метіоніну у біомасі та з'ясувати зміни амінокислотного складу у кращих за цим показником мутантів, отриманих на різних етапах селекції.

Матеріали і методи дослідження

Аксенична культура *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. штам Моісе дикого типу (ДТ) була використана як батьківський штам. В якості ростового середовища використовували середовище Зарука [9]. В ході проведення селекції культури вирощували при температурі 28 °С та освітленні 0,5–1,0 клк в умовах періодичного культивування. Для порівняння фізіологічних та біохімічних особливостей штамів культури вирощували також при температурі 35 °С, освітленні 8 клк та барботуванні повітрям.

Мутагенез культур проводили в ранній стаціонарній фазі росту за допомогою N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ) у концентрації 100 мкг/мл з тривалістю дії 30–60 хв., як описано в [10].

Структурний аналог метіоніну — DL-етіонін був використаний як позитивний фактор селекції [11]. Відновлені після мутагенезу культури в ранній стаціонарній фазі росту в об'ємі 0,1 мл переносили на поверхню блоків із агаризованого середовища Зарука з домішками DL-етіоніну. Після появи на їх поверхні колоній аналогорезистентних мутантів останніх переносили за допомогою вельвету на свіжі агарові блоки середовища з аналогом. Після п'яти послідовних пересівів останній агаровий блок з колоніями мутантів занурювали у рідке середовище Зарука. В ранній лог-фазі росту культури піддавали клоонуванню. Для цього 0,1 мл рідкої культури шпателем розподіляли по поверхні агаризованого середовища. Потім під мікроскопом з поверхні середовища відокремлювали невеликі шматочки агару з одним трихомом, які переносили на стовпчики агаризованого середовища Зарука у пробірках та виставляли на світло. Впродовж 1–2 місяців із одиночних трихомів розвивались популяції ізогенних клонів мутантних ціанобактерій.

Якісне визначення вмісту вільних амінокислот в середовищі проводили в стаціонарній фазі росту штамів методом тонкошарової хроматографії на пластинах типа "Silufol" в системах розчинників пропанол-вода (7:3) і н-бутанол-уксусна кислота-вода (8:3:1), послідовно. Для визначення вмісту вільних амінокислот у біомасі готували їх екстракти із біомаси за методом, описаним С. Н. Кара-Мурзою із співавторами [12]. Якісне визначення вільних амінокислот в екстрактах здійснювали, як і при визначенні вільних амінокислот, у середовищі культивування. Кількісний вміст вільного метіоніну в екстрактах визначали нітропруссидним методом [13]. Загальний вміст метіоніну у біомасі визначали цим же методом з попереднім ферментативним гідролізом протеїнів біомаси [14].

Повний амінокислотний аналіз біомаси та з'ясування внутрішньоклітинного амінокислотного пула штамів з максимальним вмістом метіоніну, виявлених в ході поточного аналізу, здійснювали за допомогою амінокислотного аналізатора "Hitachi-836" у Московському університеті ім. М. В. Ломоносова та у Одеському селекційно-генетичному інституті. Для цього порошок біомаси гідролізували 6 N HCl у запаяних скляних ампулах при температурі 105 °C впродовж 24 годин. Екстракцію вільних амінокислот із порошку біомаси проводили 5%-м розчином саліцилової кислоти протягом 24 годин при 5 °C.

Результати дослідження та їх аналіз

Перед початком селекційної роботи нами було вивчено вплив різних концентрацій *DL*-етіоніну на ріст *Sp. platensis*. Встановлено, що *DL*-етіонін майже повністю інгібує ріст штаму дикого типу при концентрації 16 мкг/мл.

На першому етапі селекції після проведення штучного мутагенезу серед трихомів штаму ДТ відбирали мутантів, стійких до *DL*-етіоніну в концентрації 20 мкг/мл, внаслідок чого було отримано 184 мутантних клони. Ні один із них не був здатен виділяти будь-які амінокислоти у середовище росту в значній кількості. Кращим за вмістом метіоніну у біомасі був мутант 4.10. Як видно із даних, наведених у таблицях 1 та 2, вміст вільного метіоніну у біомасі цього мутанта у 3,6 рази був вищим, ніж у штаму ДТ, а загального метіоніну згаданий мутант містив більше на 25,7 %. Водночас загальний пул вільних амінокислот у мутанта 4.10. в 3,5 рази перевершував цей показник у штаму ДТ, а сумарний вміст амінокислот — на 10,6 %.

На другому етапі селекції із штаму 4.10. після нітрозогуанідинового мутагенезу отримано 400 клонів, стійких до *DL*-етіоніну в концентрації 500 мкг/мл та 105 клонів, стійких до 1000 мкг/мл цієї сполуки. Серед них вдалося виявити мутанта 30Б, у якого вміст вільного метіоніну у біомасі був більшим у 2,3 рази, ніж у мутанта 4.10., та у 8,2 рази — ніж у штаму ДТ (табл. 1). Водночас у мутанта 30Б мало місце зростання загального амінокислотного пула. Загальний вміст вільних амінокислот у мутанта 30Б дорівнював 5,5% від сухої біомаси, що у 2,1 рази перевищувало такий показник у штаму 4.10. та в 7,2 рази — у штаму ДТ. Однак, загальний вміст метіоніну та сумарний вміст амінокислот у біомасі мутанта 30Б були на рівні цих показників у мутанта 4.10. Порівняння вмісту амінокислот в амінокислотному складі біомаси штаму ДТ та мутантів 4.10. і 30Б показало відсутність істотної різниці між ними (табл. 3). На основі цього були зроблені припущення, що надсинтез метіоніну у штамів 4.10. і 30Б відбувається не за рахунок мутацій у шляхах біосинтезу метіоніну, а за рахунок мутаційних змін в шляхах центрального метаболізму, які постачають спільних для синтезу амінокислот попередників, і що по-даліша селекція на стійкість до більш високих концентрацій аналога дасть можливість отримати мутантів з порушеннями у шляхах біосинтезу метіоніну.

Таблиця 1

**Вміст вільних амінокислот у біомасі штамів *Spirulina platensis*
(мг % від сухої ваги)**

Аміно-кислота	Штами			
	Дикий тип	4.10.	30Б	198Б
asp	4,76 ± 0,69	150,95±2,68	319,78±56,85	317,27±10,81
thr	21,94 ± 3,87	109,49±0,28	268,59±20,90	345,21±6,48
ser	21,55±1,29	69,58±1,06	174,97±49,01	268,65±0,32
glu	329,89±33,49	650,91±43,14	1143,21±94,82	3043,47±407,69
gly	20,73±1,77	110,99±0,73	216,97±21,70	476,10±58,37
ala	72,94±8,50	273,06±2,76	520,44±26,21	789,73±109,00
cys	12,93±3,36	34,48±15,86	215,21±38,13	175,39±23,38
val	52,76±7,55	188,53±0,79	352,21±28,27	513,97±58,09
met	22,43±0,90	81,62±1,14	184,76±25,05	417,57±43,61
ile	24,77±2,55	140,85±6,76	311,00±31,76	386,71±45,88
leu	53,37±6,66	200,83±8,89	473,57±36,00	698,43±92,18
tyr	20,51±2,24	145,44±0,33	271,13±30,69	253,39±42,46
phe	26,36±3,24	112,06±0,22	239,73±14,02	392,82±54,36
lys	16,60±1,81	155,40±1,34	275,11±38,14	241,04±30,53
his	3,85±0,66	20,91±0,07	55,14±3,19	59,28±6,35
arg	26,32±3,01	41,73±2,35	207,02±35,20	173,64±22,95
pro	14,95±1,53	136,94±1,34	272,52±15,92	233,55±32,69
gln	14,26±1,04	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
trp	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	465,53±60,82
Сума	760,91±52,71	2623,84±74,60	501,34±449,04	9251,75±1105,33

Тому мутанта 30Б піддали НГ-мутагенезу та подальшій селекції на стійкість до підвищених концентрацій *DL*-етіоніну. Внаслідок цього було отримано 400 клонів, стійких до 2 мг/мл *DL*-етіоніну. Кращим за вмістом метіоніну у біомасі був мутант 198Б. Мутант 198Б, як і попередній мутант 30Б, вільних амінокислот у середовище росту не виділяв. Вміст вільного метіоніну в клітинах мутанта 198Б в 2,3 рази перевищував цей показник у штаму 30Б та у 18,6 рази — у штаму ДТ (табл. 1). Підвищення вмісту вільного метіоніну у мутанта 198Б супроводжувалось не тільки підвищенням вмісту всіх вільних амінокислот (9,2 % від сухої ваги біомаси), але й підвищенням відносного вмісту метіоніну в пулі вільних амінокислот (4,5 % від визначених амінокислот), чого не спостерігали у проміжних мутантів.

Вміст загального метіоніну у біомасі штаму 198Б був в 1,7 рази вищим, ніж у штаму 30Б, та у 2,2 разів вищим, ніж у штаму ДТ (табл. 2). На відміну від проміжних мутантів, підвищення вмісту метіоніну в біомасі мутанта 198Б супроводжувалося підвищенням його

вмісту в складі визначених амінокислот до 4,5 %, у той час як у штаму ДТ цей показник складав 2,9 % (табл. 3). Суттєве підвищення вмісту метіоніну в амінокислотному складі біомаси мутанта 198Б на фоні незначного підвищення загальної суми амінокислот у порівнянні з штамом 30Б дозволило припустити, що надсинтез метіоніну у цього мутанта забезпечується не тільки мутаціями в шляхах центрального метаболізму, але і мутаціями безпосередньо в шляхах біосинтезу метіоніну.

Таблиця 2

**Вміст амінокислот у біомасі штамів *Spirulina platensis*
(% від сухої ваги біомаси)**

Амінокислота	Штам			
	Дикий тип	4.10.	30Б	198Б
asp	4,97±0,14	6,14±0,46	6,15±0,22	7,28±0,05
thr	2,78±0,09	3,35±0,27	3,46±0,13	4,00±0,01
scr	2,75±0,06	3,37±0,17	3,26±0,09	3,57±0,01
glu	7,71±0,15	9,23±0,86	9,69±0,52	9,78±0,31
gly	2,68±0,09	3,25±0,33	3,54±0,23	3,66±0,01
ala	4,50±0,26	5,12±0,53	5,59±0,55	5,81±0,21
cys	0,40±0,06	0,77±0,02	0,66±0,02	-
val	3,00±0,21	3,68±0,45	3,62±0,30	3,70±0,10
met	1,48±0,12	1,86±0,14	1,89±0,02	3,20±0,06
ilc	2,43±0,18	3,23±0,34	3,33±0,51	3,65±0,16
leu	4,84±0,19	5,73±0,56	5,97±0,27	6,93±0,00
tyr	2,51±0,12	3,01±0,20	3,19±0,00	2,92±0,05
phe	2,47±0,11	2,87±0,32	3,23±0,13	3,36±0,25
lys	2,54±0,13	3,02±0,25	3,29±0,03	3,81±0,08
his	0,79±0,05	0,87±0,09	0,94±0,06	1,10±0,01
arg	3,62±0,15	4,27±0,21	4,65±0,16	5,42±0,10
pro	2,07±0,06	2,33±0,22	2,53±0,09	2,27±0,19
Сума	51,56±2,01	62,11±5,36	64,99±2,85	70,43±1,04

(-) — вміст амінокислоти не визначали.

Отже, в ході селекції етіонінрезистентних штамів *Sp. platensis* були отримані штами, здатні до надсинтезу метіоніну. При цьому не було отримано жодного мутанта, у якого б надсинтез метіоніну не супроводжувався надсинтезом інших амінокислот. Аналогічні результати були отримані за селекції етіонінрезистентних мутантів серед інших видів ціанобактерій [6]. Очевидно, ціанобактерії, здатні до надсинтезу метіоніну, пов'язаного з мутаціями в генах, що визначають шляхи біосинтезу безпосередньо цієї амінокислоти, не мають змоги вижити в присутності аналога без виникнення одночасних мутацій в шляхах центрального метаболізму.

Таблиця 3

**Вміст амінокислот в амінокислотному складі біомаси штамів
Spirulina platensis (% від ваги визначених амінокислот)**

Аміно-кислота	Штам			
	Дикий тип	4.10.	30Б	198Б
asp	9,72±0,14	10,02±0,14	9,57±0,08	10,33±0,08
thr	5,44±0,04	5,47±0,05	5,37±0,03	5,67±0,09
ser	5,38±0,14	5,50±0,20	5,06±0,09	5,07±0,05
glu	15,08±0,43	15,05±0,08	15,06±0,13	13,89±0,24
gly	5,23±0,04	5,29±0,07	5,50±0,12	5,19±0,09
ala	8,80±0,18	8,34±0,13	8,68±0,47	8,24±0,17
val	5,86±0,20	5,99±0,21	5,62±0,22	5,25±0,06
met	2,90±0,12	3,03±0,04	2,94±0,10	4,54±0,01
ile	4,74±0,16	5,26±0,09	5,16±0,56	5,18±0,14
leu	9,47±0,09	9,34±0,09	9,28±0,00	9,84±0,15
tyr	4,91±0,07	4,91±0,10	4,96±0,22	4,14±0,01
phe	4,84±0,03	4,67±0,11	5,03±0,02	4,77±0,43
lys	4,96±0,06	4,92±0,02	5,12±0,19	5,41±0,04
his	1,55±0,05	1,42±0,01	1,47±0,15	1,56±0,03
arg	7,08±0,09	6,98±0,27	7,25±0,57	7,70±0,03
pro	4,05±0,05	3,80±0,02	3,93±0,04	3,21±0,22
Сума	100	100	100	100

Висновки

1. На підставі отриманих даних можна припустити, що надсинтез метіоніну у мутантів *Sp. platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі та в амінокислотному складі забезпечується одночасно як мутаціями, що ведуть до підвищення активності ключових регуляторних ферментів на шляхах біосинтезу метіоніну, так і мутаціями, які активують ГС (глутамінсинтетаза; глутамат: аміак лігаза, ADP, КФ 6.3.1.2.)-ГОГАТ (глутамінсинтаза; глутамин: α -оксоглутарат — амінотрансфераза, КФ 1.4.7.1.) шлях і потік проміжних продуктів із циклу Кребса.
2. Інтенсифікація процесів центрального метаболізму є необхідною умовою для виживання мутантів *Sp. platensis* з порушеннями окремих етапів біосинтезу метіоніну, які призводять до надсинтезу цієї амінокислоти.
3. Отримані дані доповнюють сучасні уявлення про особливості метаболізму ціанобактерій і сприяють розробці технологій отримання ціанобактерій-суперпродуцентів цільових продуктів.

Література

1. Reed, R. H., Warr, S. R. C., Richardson, D. L., Moore, D. J. and Stewart, W. D. P. Blue-green algae (cyanobacteria): prospects and perspectives // Plant and Soil. — 1985. — V. 89. — P. 97–106.
2. Блок Р. и Боллинг Д. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов. — М.: Издательство иностранной литературы, 1949. — С. 368–371.
3. Narasima, D. L. R., Venkataraman, G. S., Duggal, S. K. and Eggum, O. Nutritional quality of the blue green alga *Spirulina platensis* Geitler. // J. Sci. Food Agric. — 1982. — V. 33. — P. 456.
4. Дебабов В. Г. Современные селекционно-генетические методы получения промышленных микроорганизмов // Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева. — 1982. — Т. 27, № 6. — С. 630–633.
5. Полодиенко О. Б., Чистосердов А. Ю., Тоцкий В. Н., Цыганков Ю. Д. Влияние аминокислот аспарагинового семейства на активность аспараткиназы и гомосериндегидрогеназы этионинрезистентных мутантов *Pseudomonas putida* // Микробиологический журнал. — 1991. — Т. 53, № 1. — С. 63–67.
6. Постнова Т. И., Романова Н. И., Воронова Г. В. и др. Мутагенез и отбор мутантов-продуцентов аминокислот по устойчивости к соответствующим аналогам на *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // Вестн. МГУ. — сер. 16. — Биология. — 1989. — № 1. — С. 35–39.
7. Riccardi G., Sora S., Ciferri O. Production of amino acids by analog-resistant mutants of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // Journal of Bacteriology. — 1981. — V. 147, № 3. — P. 1002–1007.
8. Hall G., Flick M. B., Jensen R. A. Approach to recognition regulatory mutants of cyanobacteria // J. Bacteriol. — 1980. — V. 143. — P. 981–988.
9. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. // Ph. D. Thesis, University of Paris. — 1966. — P. 85.
10. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — С. 116–117.
11. Alix J. Molecular aspects of the in vivo and in vitro effects of ethionine, an analog of methionine // Microbiol. Rev. — 1982. — V. 46. — С. 281–295.
12. Кара-Мурза С. Н., Тимохина Е. А., Жданова Н. И. Внутриклеточный фонд свободных аминокислот *Corynebacterium glutamicum* штамма дикого типа и его мутантов, продуцирующих лизин // Прикладная биохимия и микробиология. — 1981. — Т. 17, № 6. — С. 813–819.
13. Mc Carthy T. E., Sullivan M. X. A new and highly specific colorimetric test for methionine // J. Biol. Chem. — 1941. — V. 141, № 3. — С. 871–876.
14. Nomoto M., Narahashi Y., Murakami M. A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*. 6. Hydrolysis of protein by *Streptomyces griseus* protease // J. Biochem. (Japan). — 1960. — V. 48, № 4. — P. 593–602.

**С. Г. Каракис, Е. Г. Драгоева, Т. И. Лавренюк, В. А. Сагарец,
Л. М. Карпов**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра физиологии человека и животных,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

СЕЛЕКЦИЯ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *SPIRILINA PLATENSIS* С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ МЕТИОНИНА В БИОМАССЕ

Резюме

Штамм 198Б получен из штамма дикого типа (ДТ) *Sp. platensis* с помощью нитрозогуанидинового мутагенеза в результате нескольких этапов селекции

на устойчивость к DL-этионину. Содержание метионина в биомассе штамма 198Б выше, чем у штамма ДТ в 2,2 раза, а в аминокислотном составе — в 1,6 раз. На основе анализа аминокислотного состава биомассы ДТ, 198Б и промежуточных штаммов установлено, что интенсификация процессов центрального метаболизма является необходимым условием для сверхсинтеза метионина мутантами.

Ключевые слова: Spirulina, мутанты, селекция, сверхсинтез, метионин.

**S. G. Karakis, E. G. Dragoeva, T. I. Lavrenjuk, V. A. Sagaric,
L. M. Karpov**

Odessa National University, Department of Human and Animals Physiology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

SELECTION OF *SPIRULINA PLATENSIS* MUTANT STRAINS WITH INCREASED CONTENT OF METHIONINE IN BIOMASS

Summary

Strain 198B has been selected from the wild strain after nitrosoguanidine mutagenesis as a result of several selection stages on resistance to DL-ethionine. Methionine content in the biomass of strain 198B exceeds the same one in the wild strain in 2.2 times, in amino acid composition — in 1,6 times. Amino acid compositions of biomass of wild, 198B and intermediate strains have been analyzed. It was established that intensification of central metabolism processes is a necessary condition for realization of mutations leading to the oversynthesis of methionine in methionine biosynthesis pathway in *Spirulina platensis* mutants.

Keywords: Spirulina, mutants, selection, oversynthesis, methionine.