

## **ЗНАЧЕННЯ ОБ'ЄКТА, ЩО СТАНОВИТЬ НАЦІОНАЛЬНЕ НАДБАННЯ В НАУКОВОМУ ПРОЦЕСІ**

**В. І. КОРХОВИЙ**, кандидат біологічних наук

*Державна установа «Інститут харчової біотехнології*

*та геноміки НАН України»*

*E-mail: korkhovy\_v@ukr.net*

***Анотація.** У статті узагальнено основні результати молекулярно-генетичних та біотехнологічних досліджень, в яких були використані штами мікроорганізмів, що входять до «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».*

***Ключові слова:** мікроорганізми, видова ідентифікація, мутагенез, незамінні амінокислоти, біосинтез, продуценти бутанолу, продуценти ліпідів, ліофілізація*

Базовою тематикою досліджень ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України» передбачено використання різних штамів мікроорганізмів, генетичних конструкцій та ліній рослин. Протягом багатьох років роботи науковцям Інституту вдалося зібрати унікальну за своїм складом колекцію, яку в 2009 році було внесено до Державного реєстру наукових об'єктів, що становлять національне надбання.

До складу «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» належать:

1) штами мікроорганізмів: продуценти ліпідів, харчового білку, ароматичних речовин, харчових органічних кислот, полісахаридів (каротину, ергостерину), спиртів (етанолу, бутанолу), ферментів глюкоамілазного комплексу, продуценти незамінних амінокислот, продуценти для виробництва вина, для виробництва пива, хлібопекарські і кормові дріжджі;

2) штами *Escherichia coli* та *Agrobacterium tumefaciens*, що несуть плазмідні вектори, які містять конструкції з господарсько цінними генами і використовуються для робіт із генетичної трансформації рослинних об'єктів;

3) лінії рослин, отримані в результаті експериментів із трансформації, соматонального ембріогенезу, дії різноманітних мутагенів, а також отримані з інших колекцій, наприклад арабідопсис (*Arabidopsis thaliana*), суспензійна культура тютюну (*Nicotiana tabacum*) тощо.

Основним завданням колекції є надійне збереження об'єктів. Для цього необхідно проводити ряд заходів, що включає постійний моніторинг стану мікроорганізмів та ліній рослин, їх видову ідентифікацію, плановий пересів на свіжі середовища, своєчасні пасажі, а також підбір середовищ для вирощування, відпрацювання методик для закладання на тривале зберігання, перевірку життєздатності та збереження характеристик мікроорганізмів після довготривалого зберігання. Одним із важливих завдань є поповнення колекції новими об'єктами, вивчення їх характеристик, створення паспортів ново виділених із природних екологічних ніш штамів мікроорганізмів та передання їх на депонування та зберігання до Української колекції мікроорганізмів при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Об'єкти колекції інтенсивно використовуються в науково-дослідних роботах. Так, зокрема проводяться роботи з видової ідентифікації з метою визначення та підтвердження таксономічного положення мікроорганізмів. Одна з таких робіт – це визначення філогенетичних зв'язків мікроорганізмів роду *Brevibacterium* [1]. Представники роду *Brevibacterium* виступають основними продуцентами незамінних амінокислот [2]. Одним із напрямів здешевлення та підвищення ефективності виробництва є пошук та отримання продуктивних штамів, в тому числі і з використанням мутагенезу [3]. Для з'ясування філогенетичних зв'язків було використано нуклеотидні послідовності 16S РНК штамів-продуцентів лізину *Brevibacterium* sp. 90 Н, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. Е 531 та мутантного штаму *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447 із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та

сільськогосподарської біотехнології». Автори констатують філогенетичну гетерогенність досліджених штамів бревібактерій - вони розподілились на три групи. Подібність послідовності гена 16S рРНК мутантного штаму *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447 до вихідного штаму *Brevibacterium* sp. 90 складає 98 % і, крім цього, ця послідовність не має аналогів у базі даних GenBank [1].

Потужним інструментом отримання нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів є мутагенез із використанням ультрафіолетового (УФ) опромінення. З метою отримання нових штамів було використано метод мутагенезу з використанням УФ-опромінення і послідовним ступінчастим відбором одержано мутантний штам *Bacillus subtilis* ІFBG МК-1, який продукував майже на 50 % більше триптофану (13,9 г/л), ніж вихідний штам [7]. Також проведені дослідження штамів мікроорганізмів - продуцентів незамінних амінокислот аспаратної родини: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 за біосинтетичною активністю лізину і треоніну [3]. Проводили УФ-опромінення вегетативних клітин бревібактерій та коринебактерій та відбір з використанням генетичних маркерів найбільш продуктивних мутантних штамів незамінних амінокислот. В результаті отримали мутантні штами *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 (продуцент треоніну) та *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447 (продуцент лізину), ефективність синтезу яких була відповідно в 4 і майже в 5 разів вищою порівняно з вихідним штамом. Отримані штами-продуценти депоновано в Депозитарії непатогенних мікроорганізмів при Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Треонін є однією з незамінних амінокислотою, тому, зважаючи на це, проводились роботи із селекції штаму-продуцента треоніна серед бактеріальних культур із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології», в результаті чого було відібрано продуцент *Brevibacterium flavum* ТН-7, який накопичував найбільшу кількість цієї амінокислоти в культуральній рідині [10]. Скринінг середовищ

показав, що найвища активність синтезу спостерігається на сахарозовмісному середовищі. Визначено концентрацію посівного матеріалу (20 %), необхідну для повноцінного синтезу треоніна. Встановлено, що додавання гомосерину не стимулює синтез треоніну. В той же час визначено, що додавання суміші ізoleyцину та метіоніну в концентрації 0,4 г/дм<sup>3</sup> кожної підвищило кількість треоніну в культуральній рідині до 7,3 г/дм<sup>3</sup>. В результаті клонового аналізу штамів продуцентів лізину після періодичного культивування продуцентів на м'ясових середовищах встановлено, що *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. XI дають розщеплення колоній на два типи [4]. Всі клони були перевірені щодо їх ефективності синтезу лізину та відібрано найбільш продуктивні з них для подальших досліджень. Відселектовані клони були перевірені на ауксотрофність щодо лейцину та амінокислот аспаратної родини. Досліджені клони зберігали ауксотрофність за лейцином і набули нової ауксотрофності до треоніну, метіоніну, триптофану та гомосерину.

Крім цього, науковцями Відділу промислової та харчової біотехнології було проведено скринінг різноманітних видів дріжджових культур, які продукують ліпіди та відібрано штам *Rhodotorula gracilis* SK\_4 з найвищими показниками синтезу ліпідів [11]. Були досліджені різні середовища та підібрані умови культивування, що дозволило підвищити жировий коефіцієнт цього штаму до 17,5–18,1. Водночас встановлено, що кисень, який потрапляв до культурального середовища виступав лімітуючим синтез ліпідів фактором. Серед переваг отримання ліпідів з використанням мікробіологічного синтезу є можливість швидкої зміни складу жирних кислот шляхом спрямованого культивування, використання відносно дешевої сировини та технологічність культивування продуцента [8].

Значна увага приділяється створенню технології синтезу цінних незамінних амінокислот – триптофану, треоніну та лізину. З цією метою було виконано відбір штаму-продуцента триптофану серед бактеріальних культур «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології». Відселектований штам *Corynebacterium*

*glutamicum* T-3 накопичує 4 г/дм<sup>3</sup> триптофану в культуральній рідині [12]. Для вдосконалення технології синтезу триптофану було випробувано різні джерела вуглецю та деяких його попередників. Встановлено, що найвища активність синтезу спостерігалась за використання меляси, яка містить в достатній кількості не лише джерело вуглецю, але й попередників синтезу триптофану – індол, серин, аланін. Роботи з об'єктами колекції виконувались не лише в напрямі удосконалення способів культивування та варіювання компонентами середовищ.

Одним з важливих завдань функціонування колекції є поповнення новими об'єктами. Так, в результаті виконання проекту в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина» (“Біопалива”) було виділено та селектовано з ґрунтів та мулів водойм міста Києва перспективні штами- продуценти біобутанолу [5]. В результаті вивчення морфофізіологічних властивостей виділених штамів їх вдалося ідентифікувати як *Clostridium acetobutylicum*, *C. tyrobutylicum*, *C. butylicum*. В подальшому проводились роботи із визначення родової та видової спорідненості вітчизняних штамів-продуцентів, здійснення порівняльного за продуктивністю скринінгу штамів-продуцентів бутанолу, проведення ферментації з використанням цукрів, які входять до складу відновлювальної лігноцелюлозної сировини, та визначення умов підвищення виходу бутанолу нововиділених штамів *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG C6H), IFBG C4B та IFBG C7P [6]. В результаті досліджень вдалося встановити, що штами IFBG C7P та IFBG C6H у разі культивування окремих складових лігноцелюлозних субстратів зброджували усі цукри, які входять до складу геміцелюлоз. Під час порівняння цих штамів із подібними інших колекцій було встановлено, що IFBG C7P та IFBG C6H є більш продуктивними і їх можна використовувати для вдосконалення технології виробництва бутанолу. За рахунок оптимізації умов культивування – підвищення температури до 36 °C і рН 5–7, тривалості культивування протягом 3-х діб та застосування технологічного прийому (використання культуральної рідини після

біоконверсії лігноцелюлозної сировини як додаткового субстрату до ензиматичного середовища) вдалося отримати підвищення виходу бутанолу.

Актуальною проблемою на сьогодні є і довготривале зберігання об'єктів колекції. Один із надійних методів – це ліофілізація мікроорганізмів, яка дозволяє значною мірою зберігати властивості організмів після довготермінового зберігання. В результаті виконаного пошуку вдалося оптимізувати умови культивування, склад захисного середовища, визначити найсприйнятливішу фазу росту для культури *Pichia anomala*, що дозволило отримати максимальний відсоток збереження клітин після ліофілізації – 95 % [9].

Таким чином «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» має вирішальне значення в науковому процесі. Штами мікроорганізмів інтенсивно використовуються в дослідженнях мутагенезу, видовій ідентифікації з використанням молекулярно-генетичних методів, селекції з використанням генетичних маркерів, розробці біотехнологій біосинтезу незамінних амінокислот, ліпідів, біобутанолу. Колекція поповнюється новими штамми за рахунок пошуку і відбору з природних екосистем. Широко використовується метод ліофілізації для закладання штамів на довготермінове зберігання та продовжуються роботи над його вдосконаленням.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андріяш Г. С. Філогенетичний аналіз штамів-продуцентів лізину порівнянням послідовностей гена 16S рРНК / [Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, В. С. Бондаренко, С. М. Шульга] // Біотехнологія. – 2014. – 7, №6. – С. 40-45.
2. Андріяш Г. С. Регулювання та шляхи інтенсифікації біосинтезу лізину / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – 4. – С. 6-17.

3. Андріяш Г. С. Мутантні штами мікроорганізмів - продуцентів лізину та треоніну / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга // Біотехнологія. – 2014. – 7, №3. – С. 95-101.
4. Андріяш Г. С. Ауксотрофність продуцентів лізину / Г. С. Андріяш, Г. М. Заболотна, С. М. Шульга // Біотехнологія. – 2012. – 5, №1. – С. 70-77.
5. Тігунова О. О. Нові штами-продуценти біобутанолу. I. Виділення та ідентифікація / О. О. Тігунова, С. М. Шульга // Біотехнологія. – 2013. – 6, №1. – С. 97-104.
6. Тігунова О. О. Нові штами-продуценти біобутанолу. II. Ферментація лігноцелюлозної сировини / О. О. Тігунова, С. М. Шульга // Біотехнологія. – 2014. – 7, №4. – С. 54-60.
7. 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. Прийомов, С. М. Шульга] // Біотехнологія. – 2013. – 6, №6. – С. 105-112.
8. Ткаченко А. Ф. Липиды микроорганизмов как источник биотоплива / А. Ф. Ткаченко, Е. А. Тігунова, С. М. Шульга // Цитология и генетика. – 2013. – 47, № 6. – С. 22-29.
9. Вплив ліофілізації на життєздатність дріжджів *Pichia anomala* / [С. М. Шульга, О. О. Тігунова, А. Ф. Ткаченко, Н. Є. Бейко, А. І. Хоменко] // Біотехнологія. – 2011. – 4, №4. – С. 80-86.
10. Інтенсифікація біосинтезу треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7 / [С. М. Шульга, О. О. Тігунова, А. Ф. Ткаченко, Н. Є. Бейко, Г. С. Андріяш, С. Г. Прийомов] // Біотехнологія. – 2011. – 4, №5. – С. 97-102.
11. Біосинтез липидов дрожжами *Rhodotorula gracilis* / [С. М. Шульга, А. Ф. Ткаченко, Н. Е. Бейко, А. И. Хоменко, А. Андріяш] // Биотехнология. – 2010. – 3, №3. – С. 58-65.
12. Вплив компонентів ензиматичного середовища на біосинтез триптофану / [С. М. Шульга, А. Ф. Ткаченко, О. О. Тігунова, Н. Є. Бейко, А. І. Хоменко] // Біотехнологія. – 2011. – 4, №3. – С. 51-55.

## ЗНАЧЕНИЕ ОБЪЕКТА, СОСТАВЛЯЮЩЕГО НАЦИОНАЛЬНОЕ ДОСТОЯНИЕ В НАУЧНОМ ПРОЦЕССЕ

**В. И. Корховой**

*Аннотация.* В статье изложены основные результаты молекулярно-генетических и биотехнологических исследований, в которых были использованы штаммы микроорганизмов, входящих в «Коллекцию штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины».

*Ключевые слова:* микроорганизмы, видовая идентификация, мутагенез, незаменимые аминокислоты, биосинтез, продуценты бутанола, продуценты липидов, лиофилизация

## VALUE OF THE OBJECT, THE NATIONAL PROPERTIES, IN THE SCIENTIFIC PROCESS

**V. I. Korkhovoy**

*Abstract.* The article presents the main results of molecular genetic and biotechnological research that has used strains of microorganisms that belong to the "Collection of microorganisms and plant lines for food and agricultural biotechnology " GI "Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine."

*Key words:* microorganisms, species identification, mutagenesis, essential amino acids, biosynthesis, producers of butanol, producers of lipids, lyophilization