
ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

С.А. Бурцева, С.Н. Гараева, И.О. Растимешина, Н.В. Апостолюк, С.Д. Тофилат,
Г.В. Редкозубова, Г.В. Постолатий

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СКРИНИНГ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА У *STREPTOMYCES CANOSUS 71* И ЕГО ВАРИАНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПОСЛЕ γ - И КОМБИНИРОВАННОГО (γ - И УФ) ОБЛУЧЕНИЯ

*Институт микробиологии АН Молдовы,
ул. Академией 1, Кишинев, МД – 2028, Республика Молдова*

В последнее время различные аминокислоты (АК) находят широкое применение в медицине и народном хозяйстве для сбалансирования белкового питания, так как некоторые пищевые и кормовые продукты не содержат в своем составе необходимое количество незаменимых АК. Для ликвидации возможного дисбаланса АК их используют в чистом виде или вводят в состав комбинированных кормов, выпускаемых промышленностью. Поэтому основной сферой применения АК следует считать создание рационов, позволяющих понизить содержание растительных белков в кормах. На практике доказано, что искусственные смеси АК позволяют экономить расход естественных кормов [1].

С целью повышения белковой ценности кормовых продуктов, состоящих в основном из злаков, последнее время специалисты используют биомассу микроорганизмов, содержащую много белка. Из 20 АК, составляющих белок, незаменимыми для человека являются 8 – изолейцин, метионин, лизин, валин, триптофан, треонин, лейцин, фенил-аланин, для сельскохозяйственных животных дополнительно – гистидин и аргинин, а для молодняка птиц – пролин [2]. В настоящее время выделяют такие полунезаменимые АК, как глицин, цистеин, тирозин [3].

Весьма перспективным и экономически выгодным способом получения многих АК является микробиологический синтез. В процессе культивирования продуцентов АК непосредственно синтезируются L-АК. Одной из важных задач микробиологического синтеза АК является получение высокоактивных штаммов-продуцентов, в частности, с использованием методов генной инженерии. Именно таким способом в России был получен высокоактивный штамм продуцент треонина [1].

Микроорганизмы как источники кормового и пищевого белка в последнее время приобретают особое значение, так как по биологической ценности белки микроорганизмов приравниваются к белкам животного происхождения. Благодаря прямым и настойчивым запросам производства по поводу создания новых более производительных штаммов микроорганизмов широко разворачивается работа по созданию новых штаммов. Соответственно этому встал вопрос об искусственном повышении наследственной изменчивости, для чего успешно используются различные химические и физические мутагены. Успехи в селекции продуцентов антибиотиков явились сильным стимулом для проведения работы с продуцентами других биологически активных веществ. В этом отношении значительный интерес представляют актиномицеты, известные как продуценты не только антибиотиков, витаминов, ферментов, но и аминокислот [1, 4, 5].

Целью исследований является изучение АК состава биомассы музейного штамма стрептомицетов *Streptomyces canosus 71* и вариантов, полученных после воздействия γ - и комбинированного (γ + УФ) облучения, представляющих интерес в качестве возможных продуцентов полезных для человека биологически активных веществ различной химической природы, в том числе и белковой.

Методика эксперимента

Объектами исследований являлись музейный штамм *Streptomyces canosus 71* и 9 вариантов, полученных после воздействия на исходный штамм γ -излучения и комбинированного (γ и УФ) облучения.

Облучение проводили в Институте генетики АН РМ на радиационно-химической установке РХМ- γ -20 с активностью 12750 Ки и мощностью 0,67 Гр/с. Источником γ -лучей являлся радиоактивный Co^{60} . Были использованы дозы 2000 и 3000 Гр.

Для изучения влияния комбинированного облучения на рост, накопление биомассы и ее аминокислотный состав, сначала проводили облучение водной суспензии спор на радиационно-химической γ -установке, используя дозы 800 и 1000 Гр, а затем эту же суспензию спор облучали источником УФ-лучей в лаборатории оптоэлектроники факультета физики Молдавского Госуниверситета – лампой БУВ-15, которая давала 80% лучей с длиной волны 2537 Å. Использовали дозы $1,8 \cdot 10^{-4}$ и $5,4 \cdot 10^{-4}$ Дж/мм². Комбинированному облучению подвергали музейную культуру *Streptomyces canosus* 71 и два его варианта – 6 и 11, полученные после γ -облучения.

Культивирование стрептомицетов осуществляли на комплексной среде (основной источник углерода – кукурузная мука – 20 г/л) в колбах Эрленмейера на вибростоле в течение 5 суток при 27°C.

Для определения связанных АК подготовку образцов биомассы проводили с помощью метода кислотного гидролиза, а свободных – экстракцией спиртом [6]. Свободные, связанные АК, суммарный азот определяли на АК-анализаторе ААА-339 «Микротехна» (Чехия). Обработку данных проводили на ЭВМ, по результатам анализов составляли таблицы.

Результаты и их обсуждение

Для изучения влияния γ - и комбинированного облучения на рост, накопление биомассы и изменение ее аминокислотного состава исследовали пул свободных АК, а также аминокислотный состав белка биомассы стрептомицетов.

В табл. 1 представлены данные определения способности исходной музейной культуры *S. canosus* 71 и ее 9 вариантов накапливать биомассу при росте на жидкой комплексной среде.

Таблица 1. Биопродуктивность новых вариантов *S. canosus* 71, полученных после γ - и комбинированного (γ - и УФ) облучения

Варианты стрептомицетов	Доза облучения, Гр, 10^{-7} Дж/мм ²	Сухая биомасса		
		г/л	% к контролю	% к исходной культуре
<i>S. canosus</i> 71	Исходная культура	5,4	–	–
1-III-131	1000+1800	8,72	–	161,5
Вариант 6	2000 Гр	13,36	–	247,4
2-I-13	800+1800	20,6	154,8	381,4
2-IV-12	1000+5400	16,6	124,3	307,4
2-IV-17	1000+5400	28,7	215,7	531,4
Вариант 11	3000 Гр	9,85	–	182,4
3-I-9	800+1800	3,40	34,4	62,7
3-III-6	1000+1800	5,50	55,5	101,3
3-IV-13	1000+5400	6,65	67,5	123,1

Из табл. 1 следует, что варианты стрептомицетов, полученные при различных условиях облучения в большинстве своем превосходили *S. canosus* 71 по биомассе на 23,1–431,4% и только у варианта 3-III-9 количество биомассы было меньше, чем у *S. canosus* 71.

У исходной культуры и ее вариантов, полученных в результате облучения, был исследован внутриклеточный фонд АК. В табл. 2 приведены данные по процентному содержанию основных, в том числе и незаменимых АК в биомассе изучаемых стрептомицетов. Как видно из таблицы, по содержанию таких незаменимых АК, как валин – 5 вариантов, изолейцин – 3 варианта, лейцин – 8, фенилаланин, метионин и триптофан – 2 варианта, гистидин – 4 варианта из 9 изучаемых превосходили исходную культуру.

Так, например, после комбинированного облучения *S. canosus* 71 ($1000 \text{ Гр} + 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ Дж/мм}^2$) был отселекционирован штамм, вариант 1-III-131, в биомассе которого количество валина увеличилось в 2,5 раза, тогда как у других вариантов это увеличение составляло 11,0–4%. Незначительно увеличилось количество фенилаланина и изолейцина – на 5–3%, лейцина – в среднем на 19–92%, а у такого варианта, как I-III-131 – в 2,5 раза, а триптофана на 38–49%.

При сравнении биосинтетической активности двух вариантов – 6 и 11, полученных после γ -облучения, замечено, что они отличались от исходной культуры не только количеством образуемой ими биомассы, но и содержанием в ней отдельных АК, в том числе и незаменимых. Так, в биомассе варианта 6 таких АК, как глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин было больше у исходного штамма на 5,3; 23,5; 33,2% соответственно, тогда как биомасса варианта 11 отличалась от инициальной культуры по содержанию следующих АК: глутаминовой, пролина, глицина, аланина, валина, лейцина и тирозина на 30,1; 12,1; 17,6; 5,3; 17,1; 63,8 и 8,3% соответственно.

Комбинированное облучение *S. canosus* 71, на примере выбранных вариантов следующим образом повлияло на биосинтез АК: у варианта 1-III-131 АК состав отличался от такового у исходного по 3 АК, в том числе две незаменимые, вариант 2-I-13 по 5 и 3, 2-II-11 – по 4 и 2, 2-IV-17 – по 6 и 3, 3-I-9 – по 9 и 5, 3-III-6 – по 9 и 4, а вариант 3-III-13 – по 7 и из них 3 незаменимые АК.

Сопоставление количества особенно важных для высших организмов АК, содержащихся в биомассе новых вариантов стрептомицетов, с нормами, которые установлены ФАО (Продовольственный и сельскохозяйственный орган ООН) для так называемого «идеального белка» [7], выявило, что по процентному содержанию треонина отдельные штаммы превышали «идеальный белок» на 21,8 – 60,4%, валина на 11,2 – 152,4%, метионина на 15,0% (вариант 2-I-13) и на 352,7% (вариант 3-I-9), лейцина на 21,1% – 213,9%, тирозина на 8,2% (вариант 2-I-13) и 215,7% (вариант 3-I-9), триптофана – на (8,6 – 62,1%) (табл. 3).

Особо следует отметить, что после облучения *Streptomyces canosus* 71 удалось отселеccionировать варианты, которые характеризовались достаточно высокой разницей содержания отдельных незаменимых АК по сравнению с «идеальным белком»: у варианта 1-III-131 в биомассе количество валина составляло 252,4% и лейцина 313,9%; у варианта 2-I-13 метионина содержалось 115,0% , а лейцина – 170,4%; у варианта 3-I-9 количество метионина – 452,7 и тирозина – 315,7%, тогда как у варианта 3-IV-13 – треонина 132,8%, валина 147,1 % и лейцина 233,3% от количества соответствующей АК в «идеальном белке».

Для оценки качества белка биомассы стрептомицетов были определены показатели питательной ценности белка с использованием следующих коэффициентов; E/N – отношение суммы незаменимых АК к сумме заменимых; E/T – отношение суммы незаменимых АК к суммарному азоту; S/T – отношение суммы серосодержащих АК к суммарному азоту; Ar/T – отношение суммы ароматических АК к суммарному азоту.

Полученные данные сравнивали со стандартами, установленными ФАО и ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения) – белком куриного яйца и казеином. Анализируя результаты, представленные в табл. 3, можно отметить, что значения индекса S/T выше, чем у казеина и яичного белка у всех изучаемых штаммов. Самые высокие показатели были у вариантов, полученных после γ -облучения: вариант 6 – 629,2% и 321,3% и вариант 11– 395,8 и 202,1% соответственно при сравнении с казеином и яичным белком. Из новых вариантов, отселеccionированных после комбинированного облучения, наибольшими значениями индекса S/T отличались следующие варианты: 1-III-131 – 1033,3 и 527,6%, вариант 2-I-13 – 537,3 и 274,7%, вариант 2-IV-11 – 475,0 и 242,5%, вариант 2-IV-17 – 362,5 и 185,1%, и вариант 3-I-9 – 383,3 и 195,7% соответственно.

Что же касается индекса Ar/T, то он незначительно превышал уровень стандартов у вариантов 6, 11, 3-IV-13, 2-I-13, и 3-III-6 (на 9 – 33%), а у варианта 2-IV-17 полученного после комбинированного облучения (в дозах $1000 \text{ Гр} + 5,4 \cdot 10^{-4} \text{ Дж/мм}^2$), на 72,5%.

Известно, что большинство исследуемых штаммов микроорганизмов преимущественно накапливают аланин и глутаминовую кислоту, значительно меньше штаммов и в меньшем количестве образуют аспарагиновую кислоту, лейцин, изолейцин, валин [1]. Результаты проведенных нами исследований согласуются с широко распространенным мнением биотехнологов о том, что микробиологический синтез – перспективный и экономически выгодный способ получения многих АК с помощью новых штаммов или полученных в результате направленного мутагенеза, в частности, облучения, так как в наших опытах при культивировании на комплексной среде новые варианты стрептомицетов накапливают биомассу, в которой незаменимые АК составляют 31,6–42,9%, тогда как у музейных актиномицетов – 20–30% [8].

Сравнивая полученные результаты для изучаемых стрептомицетов с данными литературы о дрожжах [3, 9], следует отметить, что, например, содержание АК в биомассе пигментных дрожжей составляет 29–30%, уступая кормовым дрожжам (39%), в том числе и по содержанию незаменимых. Кроме того, пигментные и кормовые дрожжи дефицитны по метионину, тогда как в результате комбинированного облучения нам удалось повысить содержание этой АК в биомассе стрептомицетов, по сравнению с «идеальным белком» на 15,0 и 352,7% у вариантов 2-I-13 и 3-I-9 соответственно.

Таблица 2. Содержание основных незаменимых аминокислот в белке *Streptomyces canosus* 71 и его вариантов

Аминокислота	<i>lys</i> лизин	<i>tre</i> треонин	<i>val</i> валин	<i>met</i> метионин	<i>ile</i> изолейцин	<i>leu</i> лейцин	<i>fen</i> Фени- ланин	<i>tir</i> тирозин	<i>trp</i> триптофан
«Идеальный белок»	4,20	2,80	4,20	2,20	4,20	4,80	2,80	2,80	1,40
<i>S. canosus</i> 71	3,52	4,44	3,99	2,12	3,06	5,81	2,27	2,28	1,52
1-III-131	3,17	2,35	10,60	0,72	2,80	15,07	0,40	0,65	1,02
Вариант 6	2,72	3,41	3,79	0,82	3,78	7,73	2,23	2,04	1,18
2-I-13	1,65	3,90	3,69	2,53	2,13	8,18	1,80	1,96	1,45
2-IV-11	2,23	3,50	3,88	1,15	2,56	8,76	2,78	1,92	0,65
2-IV-17	3,00	2,99	2,36	0,94	3,24	6,92	1,97	2,09	2,27
Вариант 11	2,85	4,01	4,67	0,91	2,88	9,52	2,19	2,47	0,52
3-I-9	1,94	4,49	4,51	0,96	1,35	4,11	1,39	8,84	0,82
3-III-6	1,84	3,75	4,43	1,11	4,09	9,62	1,34	2,62	2,10
3-IV-13	1,59	3,72	6,18	0,92	2,63	11,20	2,30	3,03	0,33

Таблица 3. Характеристика питательной ценности белка биомассы стрептомицетов, выращенных на комплексной среде

Коэффициент	Казеин	Яичный белок	<i>S. canosus</i> 71	Варианты <i>S. canosus</i> 71								
				1-III-131	Вариант 6	2-I-13	2-IV-11	2-IV-17	Вариант 11	3-I-9	3-III-6	3-IV-13
E/N	0,75	1,00	0,78	0,75	0,47	0,45	0,48	0,46	0,74	0,55	0,55	0,60
E/T	2,90	3,70	2,79	3,16	2,38	2,35	2,44	2,27	2,53	2,62	2,61	2,58
S/T	0,24	0,47	0,52	2,48	1,51	1,29	1,14	0,87	0,95	0,92	0,78	0,56
Ar/T	0,80	0,80	0,81	0,57	0,89	1,00	0,86	1,38	0,94	0,87	1,08	0,89

Особое внимание привлекает тот факт, что у всех отселекционированных вариантов отмечалось увеличение количества такой аминокислоты, как цистеин. Так, у вариантов 6 и 11, полученных после γ -облучения *Streptomyces canosus 71* в дозах 2000 и 3000 Гр, количество этой АК составило 325,8 и 195,7 % к исходной культуре, а при комбинированном облучении *Streptomyces canosus 71* (1000 Гр + $1,8 \cdot 10^{-4}$ Дж/мм²) в биомассе отселекционированного варианта 1-III-131, эта аминокислота составляла 325,8 % к исходному штамму.

После комбинированного облучения вариантов 6 и 11 сравнивали содержание цистеина у 6 новых вариантов, отличающихся между собой и от исходной культуры по количеству образуемой биомассы. Оказалось, что хотя количество этой АК уменьшилось по сравнению с вариантами 6 и 11, однако осталось у этих вариантов более высоким, чем у исходного штамма. Три новых варианта из них, полученные после комбинированного облучения (1000 Гр + $5,4 \cdot 10^{-4}$ Дж/мм²), отличались по количеству биомассы – 307,4; 531,4 и 123,1% к инициальной культуре, а по содержанию в них цистеина – 235,4; 185,1 и 108,7% к исходному штамму *Streptomyces canosus 71* до облучения.

Таким образом, изучение особенностей аминокислотного состава биомассы новых вариантов стрептомицетов, полученных в результате γ - и комбинированного (γ - и УФ) облучения, показало, что, варьируя дозы облучения, можно отселекционировать варианты, отличающиеся не только повышенным выходом биомассы (на 23,1 – 431,4% в сравнении с исходным штаммом), но и содержанием в ней таких незаменимых аминокислот, как валин, метионин, лейцин, тирозин и триптофан. Кроме того, по содержанию дополнительно незаменимых аминокислот для сельскохозяйственных животных и птицы – цистеину, глицину, тирозину и пролину отдельные варианты существенным образом превышают исходную культуру. Полученные данные являются весьма важным показателем для сравнительной оценки качества биомассы актиномицетов, предлагаемых в виде биопрепаратов для добавки к рациону молодняка сельскохозяйственных животных и особенно птицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безбородов А.М. Аминокислоты // Промышленная микробиология. М., 1989. С. 338–353.
2. Воробьева Л.И. Техническая микробиология. М., 1987. С. 168.
3. Залашко М.В. Физиологическая регуляция метаболизма дрожжей. Минск, 1991. С. 332.
4. Петров Д.Ф. Ауксотрофные мутанты бактерий, как продуценты аминокислот // Селекция и генетика микробов. Новосибирск, 1971. С. 3–21.
5. Алиханян С.И., Анифьев А.П. Общая генетика. М., 1985. С. 41–48.
6. Sympson R.F., Reyberger M.R., Lin T.Y. Complete amino acid analysis of protein from single hydrolysis // J. Biol. Chem. 1986. V. 251. № 7. P. 1936.
7. Полупанов В.С. Внеклеточные белки микроорганизмов. Минск, 1986. С. 97.
8. Ковальчук Л.П., Ракова Т.Н., Качалов В.А., Бурцева С.А. Аминокислотный состав мицелия различных актиномицетов // Микробиология. 1977. № 4. С. 672–675.
9. Филиппова Т.В., Тюрина Ж.П. Питательная ценность биомассы дрожжей и их белка по химическим показателям // Известия АН МССР. Серия биол. и хим. науки. 1982. № 2. С. 38–39.

Поступила 05.09.2001

Summary

The biomass amino acids composition of initial museum strain *Streptomyces canosus 71* and its 9 variants, obtained as a result of γ - and combined (γ - and UV) irradiation was studied. It was showed, that, having varied the dozes of irradiation, it could be possible to select variants, distinguished not only by biomass synthesis to 23,1–431,1%, in compare with initial strain, but also by contents in it such irreplaceable amino acids as valine (47,1–152,4%), methionine (15,0–352,7%), tyrosine (215,7%), tryptophane (50,1–62,1%). The quantity of additional essential amino acids for agricultural animals and poultry such as cystine, glycine and proline in the biomass of some variants also exceeded the same in the initial strain.