

ТИГУНОВА О.О., АНДРІЯШ Г.С., БЕЙКО Н.Є., ШУЛЬГА С.М.✉

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: Shulga5@i.ua

✉ Shulga5@i.ua, (044) 463-15-55

## ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ, ТРЕОНІНУ ТА БУТАНОЛУ

Інтенсифікації біосинтезу органічних сполук можна досягнути за рахунок створення штамів-продуцентів із підвищеною продуктивністю і/або шляхом розширення спектра використання субстратів, оптимізацією умов культивування та вдосконаленням технологічного обладнання [1–5]. Одним із методів одержання високопродуктивних штамів мікроорганізмів є мутагенез із наступною селекцією мутантних клонів, а правильне визначення видової приналежності штамів відкриває можливості оптимізації умов культивування та генетичних маніпуляцій. Для підтвердження таксономічного положення отриманих штамів одним із методів є визначення послідовності гена 16S рРНК та порівняння його філогенетичного положення в межах найбільш споріднених штамів відповідного роду з бази даних «GenBank». Серед промислових продуцентів незамінних амінокислот близько 90 % належить до роду *Brevibacterium*. Їх видова ідентифікація базувалася на морфолого-культуральних та біохімічних ознаках. Останнім часом ідентифікація прокариот базується на основі аналізу розбіжностей або спорідненості послідовностей гена 16S рРНК [6, 7].

Промислове виробництво розчинників відбувається з використанням запатентованих клостридіальних штамів-продуцентів [8]. Таксономія цих мікроорганізмів досить важка і складна. Більшість клостридій, що продукують розчинники, були віднесені до *Clostridium acetobutylicum*, але лише у декількох із них було детально вивчено біохімічні, генетичні та фізіологічного особливості.

Метою роботи було визначити та підтвердити таксономічне положення штамів-продуцентів лізину (*Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447) і треоніну (*B. flavum* ІМВ В-7446), отриманих після ультрафіолетового (УФ) опромінення, та виділеного з ґрунту штаму-продуцента бутанолу (*C. acetobutylicum* ІМВ В-7407) з «Колекції штамів мікроорганізмів та

ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (далі Колекція) за послідовністю гена 16S рРНК штамів-продуцентів та провести їх філогенетичний аналіз взаємовідносин зі штамми роду *Brevibacterium* та *Clostridium* з бази даних «GenBank» [9].

### Матеріали і методи

У роботі використовували штами *Brevibacterium flavum* ТН-7 (вихідний штам), *Brevibacterium* sp. УКМ Ас-674 (*Brevibacterium* sp. 90 – вихідний штам), *Brevibacterium* sp. ІМВ Ас-5004 (*Brevibacterium* sp. 90Н), *Brevibacterium* sp. УКМ Ас-675 (*Brevibacterium* sp. E531), *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447, *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7446 та *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407 (ІФВГ С6Н) з Колекції.

**Реактиви.** Для виділення та аналізу геномної ДНК використовували: набір реагентів із протоколами для виділення вищезазначених ДНК («Fermentas», Литва), а також агарозу, бромід етидію (базовий розчин концентрацією 10,0 г/дм<sup>3</sup>) та бромфеноловий синій – все «Sigma» (США) [10, 11].

**Виділення ДНК.** Для виділення ДНК клітини бревібактерій відбирали з однідобової культури, отриманої на МПБзб. (збагаченому м'ясо-пептонному бульйоні) за температури 31±1°C та аерації за кількості обертів 220 хв<sup>-1</sup>. Культивування клостридій для виділення ДНК проводили на МПБзб. за температури 37±1°C протягом доби. ДНК виділяли за стандартною процедурою для грампозитивних бактерій [12]. Виділену ДНК досліджували за допомогою горизонтального електрофорезу (для встановлення чистоти ДНК та розділення на амплікони) та ПЛР (для збільшення копійності) [13–15]. Електрофоретичне розділення виділеної ДНК проводили в 1 %-му агарозному гелі в Трис-ацетатній буферній системі [13].

Умови проведення ПЛР. Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали за допомогою універсальних бактеріальних праймерів 27f та 907r (27F 5'-AGA GTT TGA TGG CTC AG-3'; 907r 5'-CCG TCA ATT CCA TTT GAG TTT-3') та 27f і 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, США) з термостатованою кришкою. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера з сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів (до фрагмента 16SRNA з 27-го по 907-й нуклеотид або з 27-го по 1492-й нуклеотид), 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотид-трифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази (Fermentas, Литва), 2,0 мМ хлориду магнію, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 20 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 [16]. Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ампліфікації проводили в Трис-ацетатному буфері. Отриманий фрагмент виділяли з агарозного гелю за допомогою набору «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» згідно з інструкцією фірми-виробника та секвенували на автоматичному секвенаторі «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems). Результуючий контиг секвенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотнокомплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних «GenBank» [9].

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей: з бази даних «GeneBank» було відібрано послідовності гена 16S рРНК різних представників родини бревібактерій та клостридій. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей у програмі ClustalW [17] та побудовано дендрограми філогенетичних зв'язків. Філогенетичний аналіз проводили в програмі MEGA6 [18, 19].

### Результати та обговорення

У роботі [4] в результаті УФ-опромінення було отримано штам-продуценти з підвище-

ним накопиченням лізину (*Brevibacterium* sp. IMB B-7447) та треоніну (*B. flavum* IMB B-7446).

Для визначення таксономічного положення отриманих мутантних штамів-продуцентів лізину *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 та треоніну *B. flavum* IMB B-7446 проведено аналіз гена 16S рРНК та філогенетичний аналіз взаємовідносин зі штамми роду *Brevibacterium* та *Corynebacterium* з бази даних «GenBank».

На основі отриманих послідовностей генів 16S рРНК побудовано філогенетичне дерево для штамів *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 та *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 з Колекції та таксономічно близьких до них представників роду *Brevibacterium* (рис. 1).

Молекулярно-філогенетичний аналіз здійснено за допомогою методу максимальної правдоподібності (maximum likelihood) з використанням моделі Тамура-Неї (Tamura-Nei) для оцінки еволюційної відстані. Кількість повторів (bootstrap) – 1000. Філогенетичне дерево представлено з найвищим значенням логарифма подібності (log-likelihood value) – 2018,5. Усього було використано 18 нуклеотидних послідовностей, і в рамках кожної філогенетичної групи рівень подібності складав 98 % і більше. Філогенетичне дерево, побудоване методом приєднання сусідів (Neighbor-joining), мало таку ж топологію.

Визначено, що штамми з Колекції належать до трьох груп. До першої відносилися штамми *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. FXJ8.052, *Brevibacterium casei* DY 40-62, *Brevibacterium ammoniilyticum* A1, до другої – *Brevibacterium* sp. E531, *Brevibacterium* sp. BS05, до третьої – *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. TUT та отриманий УФ опроміненням штам *Brevibacterium* sp. IMB B-7447. Показано, що *Brevibacterium* sp. 90 ідентичний до *Brevibacterium* sp. gene for 16S rRNA на 100 %, *Brevibacterium* sp. 90H ідентичний *Brevibacterium* sp. FXJ8.052 на 100 % і *Brevibacterium* sp. E 531 ідентичний *Brevibacterium* sp. BS05 на 100 %. Встановлено, що гомологія *Brevibacterium* sp. 90 та *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 склала 98 %. Підтверджено належність отриманого в результаті УФ опромінення штаму *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 до роду *Brevibacterium* та встановлено, що він не мав аналогів у базі даних «GenBank».

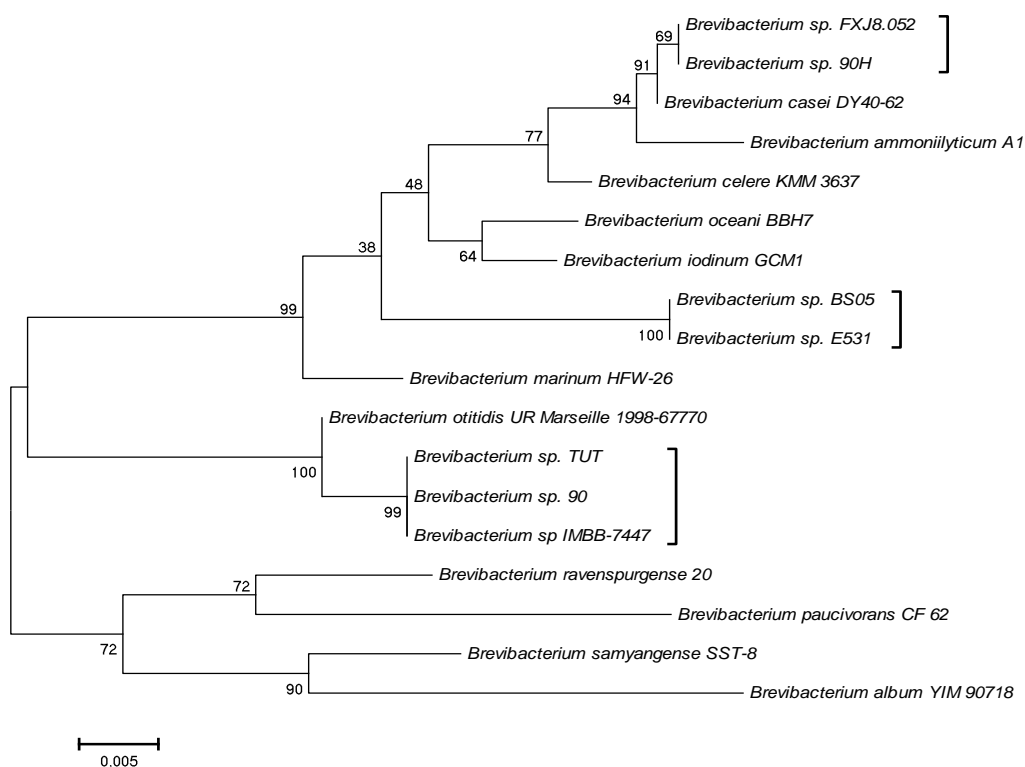


Рис. 1. Дендрограма філогенетичних взаємовідносин деяких представників роду *Brevibacterium*.

Досліджено дендрограму філогенетичних зв'язків штамів *B. flavum* TH7 і *B. flavum* IMB B-7446 з Колекції та філогенетично близьких представників родів *Brevibacterium* і *Corynebacterium*. Нижче наведено філогенетичне дерево з найвищим значенням логарифма подібності (log-likelihood value) – 2171,38, побудоване за допомогою методу максимальної правдоподібності з використанням моделі Тамура-Неї (рис. 2). Кількість повторів (bootstrap) – 1000.

Досліджені штами на дендрограмі (рис. 2) знаходилися в одній групі з типовими штамми виду *C. glutamicum*. Ця група виділена зі 100 % вірогідністю (Bootstrap аналізу) від іншої групи, утвореної представниками родів *Brevibacterium* і *Kocuria*. Таким чином, проведений аналіз показав, що штами *B. flavum* TH7 та *B. flavum* IMB B-7446 відносяться до виду *C. glutamicum*. Вміст нуклеотидів (G + C) для штамів *C. glutamicum* знаходився в інтервалі від 53 до 58 % mol. Вміст нуклеотидів (G + C) штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 склав 53,8 % mol., вміст (G + C) для штаму *B. flavum* IMB B-7446 склав 55,4 % mol.

Невідповідність при ідентифікації, виявлену на основі комплексу мікробіологічних даних і аналізу секвенування гена 16S рРНК, можна пояснити, виходячи із нещодавно

опублікованої рекласифікації деяких видів *Brevibacterium* як *Corynebacterium* [6]. У подальшому, на нашу думку, необхідно провести додатковий аналіз штамів для остаточної ідентифікації.

Виділений із ґрунту штам-продуцент бутанолу [20] також потребував підтвердження філогенетичного положення. Аналіз визначеної нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК штаму *C. acetobutylicum* IFBG C6H показав, що отримано новий штам-продуцент бутанолу. Для встановлення філогенетичних зв'язків між штамом IFBG C6H та іншими представниками роду *Clostridium* було здійснено філогенетичний аналіз на основі порівняння послідовностей гена 16S рРНК з бази даних «GenBank». Філогенетичне дерево, побудоване за допомогою методу приєднання сусідів, показано на рис. 3. За допомогою методу максимальної правдоподібності отримано подібні результати.

Дендрограма підтвердила належність IFBG C6H до роду *Clostridium*, а подібність секвенованих фрагментів гена 16S рРНК штаму IFBG C6H з фрагментами *C. pasteurianum* ATCC 6013 склала 99 %. Таким чином, встановлено, що виділений із ґрунту штам належить до виду *C. pasteurianum*. За фізіологічними та культурально-морфологічними властивостями штам

IFBG С6Н було віднесено до виду *C. acetobutylicum* і депоновано в «Національному депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України як *C. acetobutylicum* IMB В-7407. Враховуючи складність таксономії

кlostридій [21–23] та невідповідність культурально-морфологічних та фенотипічних особливостей штаму з молекулярно-філогенетичним аналізом, штам *C. acetobutylicum* IMB В-7407 (IFBG С6Н) було рекласифіковано на *C. pasteurianum* IFBG С6Н.

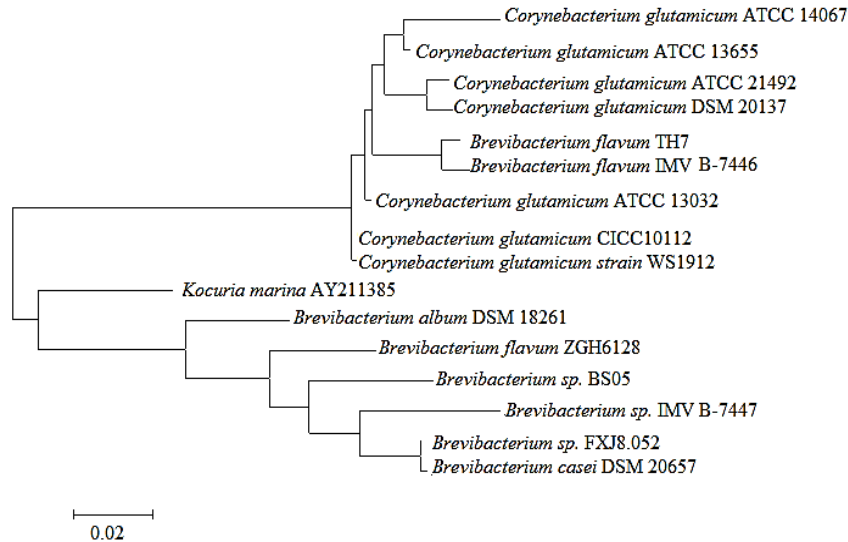


Рис. 2. Філогенетичне положення штамів *B. flavum* TH7 та *B. flavum* IMB В-7446 серед представників родів *Brevibacterium*, *Kocuria* та *Corynebacterium* на основі послідовності гена 16S рРНК.

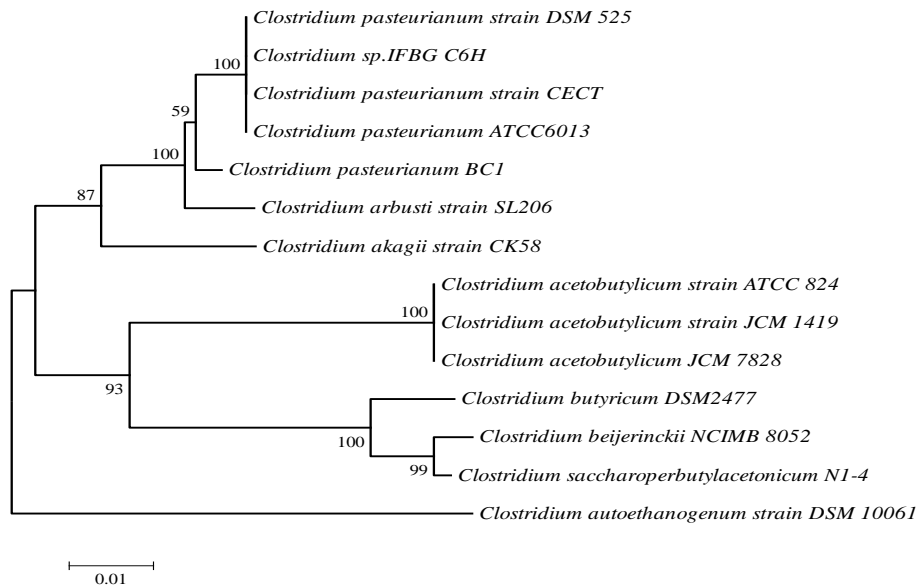


Рис. 3. Дендродіаграма філогенетичних зв'язків штаму IFBG С6Н.

### Висновки

Встановлено, що гомологія *Brevibacterium* sp. 90 та *Brevibacterium* sp. IMB В-7447 склала 98 %, а штами *B. flavum* TH7 та *B. flavum* IMB В-7446 віднесено до виду *C. glutamicum* при проведенні порівняльного аналізу генів 16S рРНК штамів, отриманих УФ опроміненням, з вихідними штамами та штамами з бази даних

«GenBank». Штам *C. acetobutylicum* IMB В-7407 (IFBG С6Н) рекласифіковано на *C. pasteurianum* IFBG С6Н. Послідовності генів 16S рРНК штамів *Brevibacterium* sp. IMB В-7447, *B. flavum* IMB В-7446 (*C. glutamicum*) та *C. pasteurianum* IMB В-7407 (IFBG С6Н) зареєстровано в базі даних «GenBank» (реєстраційні номери КТ151946, КТ151948 та KU682660 відповідно).

## Література

1. Debabov V.G. The threonine story // *Biochem. Engineer. Biotechnol.* – 2003. – V. 79. – P. 113–136.
2. Hermann T. Industrial Production of amino acid by coryneform bacteria // *J. Biotechnol.* – 2003. – V. 104. – P. 155–172.
3. Pometto A., Shetty K., Paliyath G., Levin R.E. Food biotechnology. – US, Second Edition, Taylor Francis Inc. – 2005. – 655 p.
4. Андріяш Г.С., Заболотна Г.М., Шульга С.М. Ауксотрофність продуцентів лізину *Brevibacterium* sp. // *Biotechnology Acta.* – 2012. – Т. 4, № 1. – P. 70–77.
5. Шульга С.М., Тігунова О.О., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Є., Андріяш Г.С., Прийомов С.І. Інтенсифікація біосинтезу треоніну // *Біотехнологія.* – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 97–102.
6. Vertes A., Inui M., Yukawa H. *Corynebacterium glutamicum*: Biology and Biotechnology: The biotechnological potential of *Corynebacterium glutamicum*, from *Umami* to *Chemurgy*. – Berlin: Heldelberg: Springer-Verlag, 2013. – P. 1–51.
7. Jonson L.J., Toth J., Santiwatanakul S., Chen J.S. Cultures of “*Clostridium acetobutylicum*” from Various Collections Comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and two other Distinct Types Based on DNA-DNA Reassociation // *Int. J. of System. Bact.* – 1997. – V. 47, № 2. – P. 420–424.
8. Аблаев А.П. Большая нефть и биотопливо // *Біотехнологія.* – 2011. – № 3. – P. 8–14.
9. GenBank (Base sequences of DNA) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
10. Федоренко В.О., Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів: видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. – 279 с.
11. Мартиненко О.І. Методи молекулярної біотехнології: Лабораторний практикум – К.: Академперіодика, 2010. – 231 с.
12. Колоян А.О., Овсепян А.С. Оптимизация условий ферментационной среды для биосинтеза L-аргинина штаммом – продуцентом *Brevibacterium flavum* НК-19А // *Биол. Журн. Армении.* – 2009. – Т. 3, № 61. – С. 38–44.
13. Freidberg E.C. Walker G.C., Siede W. DNA repair and mutagenesis. – Washington: ASM Press, 1995. – 698 p.
14. Edwards K., Logan J., Saunders N. Real-time PCR: An essential guide. – UK: Horizon Bioscience, 2004. – 346 p.
15. Griffith A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. An introduction to genetic analysis. 7<sup>th</sup> edition. – N.Y.: W.H. Freeman, 2008. – 864 p.
16. Guttel R., Larsen N., Woese C. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective // *Microbiol. Review.* – 1994. – V. 8, № 1. – P. 10–24.
17. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 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. – V. 22, № 22. – P. 4673–4680.
18. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol. Biol. Evol.* – 1993. – V. 10. – P. 512–526.
19. Tamura K., Stecher G., Peterson D. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.
20. Андріяш Г.С., Заболотна Г.М., Шульга С.М. Мутантні штами продуцентів лізину та треоніну // *Biotechnologia Acta.* – 2014. – V. 7, № 3. – P. 95–101.
21. Tigunova O., Shulga S. New producer strains of biobutanol. I. Isolation and identification // *Biotechnologia Acta.* – 2013. – V. 6, 1. – P. 97–104.
22. Keis S., Bennett C.F., Ward K.V., Jones D.T. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia // *J. of System. Bacteriol.* – 1995. – V. 45, № 4. – P. 693–705.
23. Wilkinson S.R., Young M., Goodacre R., Morris J.G., Farrow J.A.E., Collins M.D. Phenotypic and genotypic differences between certain strains of *Clostridium acetobutylicum* // *FEMS Microbiology letters.* – 1995. – 125. – P. 199–204.

## TIGUNOVA O.O., ANDRIYASH G.S., BEYKO N.E., SHULGA S.M.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: Shulga5@i.ua*

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF LYSINE, THREONINE AND BUTANOL STRAIN-PRODUCERS

**Aim.** Identify and confirm the taxonomic position of the obtained mutant strains *Brevibacterium* sp. IMB B-7447, *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 and *Clostridium acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG C6H). **Methods.** A fragment of genomic DNA from agarose gel using «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» was isolated according to the instructions of the producer and sequenced. Comparative analysis using the program «BLAST-online» was done. Phylogenetic dendrograms using methods Neighbour joining and Maximum likelihood were created. **Results.** Dendrograms of phylogenetic relationships of studied strains and related strains of databases «GenBank» were constructed. **Conclusions.** Found that homology of *Brevibacterium* sp. 90 and *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 is 98 %, and stains *B. flavum* TH7 and *B. flavum* IMB B-7446 classified to species *C. glutamicum*. Strain *C. acetobutylicum* IMB B-7407 (IFBG C6H) been reclassified to *C. pasteurianum* IFBG C6H.

**Keywords:** genes 16S rRNA, dendrogram, stains-producers.