

Г. Г. ЖАРИКОВА, Д. М. ХЕРАТ, В. Н. МАКСИМОВ, А. Б. СИЛАЕВ
**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТА ПРИ БИОСИНТЕЗЕ АНТИБИОТИКОВ
ЭСЕИНА И БРЕСЕИНА**

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 9 VII 1971)

В сообщениях (¹, ²) было показано, что S-вариант является колонияльно-морфологическим мутантом *Bac. brevis* var. G.-B., утратившим способность образовывать жгутики. По признаку жгутикования клетки S-варианта *Bac. brevis* принципиально отличаются от остальных трех вариантов этой культуры: R, R⁺ и R⁻.

В настоящей работе нами проведено изучение способности клеток S-варианта синтезировать антибиотические вещества — эсеин и бресенин, предприняты попытки повысить их выход путем применения метода математического планирования эксперимента.

Объектом исследования служили клетки S-варианта *Bac. brevis* var. G.-B. Культивирование бактерий проводили при 40° на трехъярусной подвешенной качалке с ~ 200 об/мин. Антибиотики извлекали этиловым спиртом из сухих бактериальных клеток. Определение количества антибиотиков проводили методом диффузии в агар, тест-организмом служила культура *Bac. subtilis* 720 (³). Очистку спиртовых экстрактов антибиотиков проводили активированным углем, при кислых значениях pH. Липиды удаляли путем обработки этиловым и петролейным эфирами. Выделенные антибиотики были изучены методами бумажной хроматографии, а также электрофореза на бумаге (⁴). Применяя метод математического планирования с использованием дробного факторного эксперимента (ДФЭ), мы пытались увеличить выход антибиотиков (⁵).

Хроматографическое изучение выделенных антибиотиков в различных системах (⁶, ⁷) показало, что по значению R_f антибиотики весьма близки между собой, а также к грамицидину С. Только в некоторых системах растворителей R_f антибиотиков заметно различались:

Система растворителей	Грамицидин С	Эсеин	Бресенин
Фенол — <i>n</i> -бутанол (1 : 2)	0,64	0,86	0,90
Фенол — хлороформ (4 : 1)	0,60	0,78	0,84
Фенол — эфир (4 : 1)	0,62	0,75	0,83
Фенол — метанол (4 : 1)	0,66	0,84	0,88

Результаты изучения электрофоретических свойств, образуемых S-вариантом антибиотиков (рис. 1), показывают, что при pH 1,7, при котором диссоциация —COOH-групп полностью подавлена, все три антибиотика

Таблица 1
Аминокислотный состав эсеина, бресенина и грамицидина С

Аминокислоты	Число аминокислотных остатков		
	в грамицидине С	в эсеине	в бресенине
Треонин	—	1	—
Серин	—	1	—
Валин	2	1	3
Орнитин	2	1	2
Глутаминовая кислота	—	1	—
Пролин	2	2	6
Изолейцин	—	2	—
Лейцин	2	2	6
Аспарагиновая кислота	—	4	—
Аланин	—	6	1
Глицин	—	8	1
Фенилаланин	2	—	1
Всего	10	29	22

мигрируют к катоду. Бресейн, как и грамицидин С, является основанием и при всех исследованных значениях pH мигрирует к катоду. Различия бресейна и грамицидина С четко выявляется при электрофорезе при pH 4,2 и 5,7: бресейн смещается на 7,5 и 4,0 см, грамицидин С — на 8,1

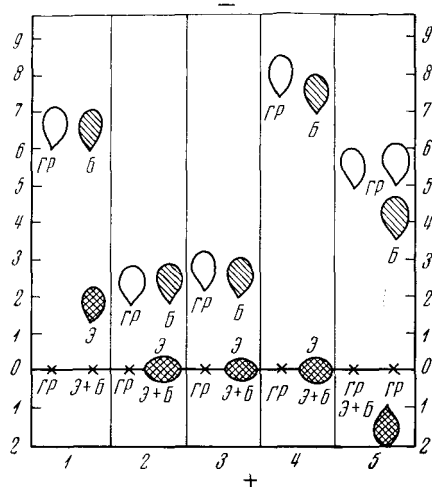


Рис. 1. Электрофорез на бумаге эсеина, бресейна и грамицидина С в 30% уксусной кислоте при pH 1,7 (1); 3,6 (2); 3,9 (3); 4,2 (4) и 5,7 (5)

5,6 см соответственно. Эсеин является амфотерным веществом. В сильной кислой области (pH 1,7) он мигрирует к катоду, в области pH 3,6—4,2 он остается на точке нанесения, при pH 5,7 — мигрирует к аноду. Следовательно, по электрофоретическим свойствам эсеин и бресейн отличаются друг от друга и оба — от грамицидина С.

Был исследован аминокислотный состав выделенных антибиотиков, который был определен после кислотного гидролиза кристаллических препаратов на аминокислотном анализаторе фирмы Хитачи (табл. 1). Эсеин и бресейн по качественному и количественному аминокислотному составу отличаются от грамицидина С. Полученные данные подтверждают ранее опубликованные данные (8).

После установления аминокислотного состава выделенных антибиотиков

мы приступили к изучению условий повышения их выхода в процесс биосинтеза методом математического планирования эксперимента. Первым шагом в исследовании явилось выяснение влияния различных источников углерода на биосинтез эсеина и бресейна. Было испытано 32 варианта

сред, в соответствии с планом ДФЭ 2⁷⁻², в котором варьировали концентрации глицерина, рафинозы, бутанола, маннита, сукцината, ацетата и молочной кислоты. Антибиотическая активность была обнаружена только в пяти вариантах и при этом ее максимум наблюдался в варианте, где единственным источником углерода был глицерин. В следующей серии опытов, поставленной по такому же плану, наряду с глицерином варьировали концентрации различных источников азота: мочевины, хлористого аммония, нитрата натрия и аминокислот — гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, которые входят в состав эсеина. Наибольшая антибиотическая активность была обнаружена в варианте, где в состав среды входили все три аминокислоты и хлористый аммоний. Эти четыре фактора и глицерин были включены в план ДФЭ 2⁵⁻¹, который показал, что для повышения антибиотиче

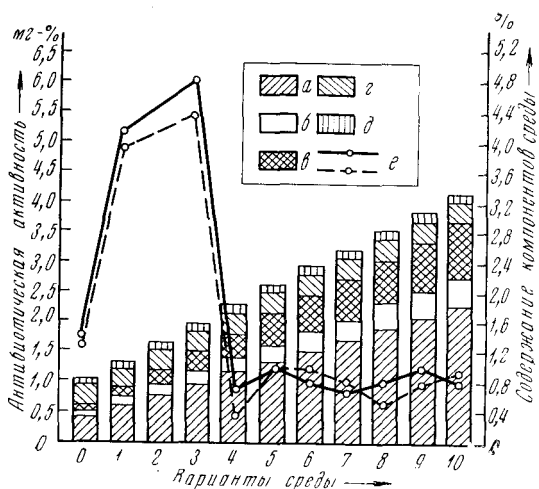


Рис. 2. Крутое восхождение по трем факторам: X_2 , X_4 , X_5 . а — хлористый аммоний, б — аспарагиновая к-та, в — глутаминовая к-та, г — гистидин, е — антибиотическая активность (в двух повторностях)

ской активности необходимо увеличить содержание в среде глютаминовой и аспарагиновой кислот и хлористого аммония. В серии опытов по крутому восхождению был найден вариант, в котором выход антибиотика достигал 6000 $\mu\text{г-}\%$, что примерно в 200 раз превышало количества антибиотика, отмечавшиеся в исходных опытах (рис. 2).

В результате проделанной работы была подобрана оптимальная среда, дающая возможность получить количества антибиотиков, достаточные для их более детального химического и биологического изучения.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
16 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Г. Я. Макарова, Г. Г. Жарикова, ДАН, 173, № 2, 447 (1967). ² Г. Я. Макарова, Г. Г. Жарикова, ДАН, 189, № 1, 196 (1969). ³ Г. В. Кочеткова, Антибиотики, 7, № 1, 80 (1962). ⁴ Р. А. Раджапов, Автореф. кандидатской диссертации, МГУ, 1967. ⁵ В. Н. Максимов, В. Д. Федоров, Применение методов математического планирования эксперимента. М., 1969. ⁶ Н. О. Блинов, А. С. Хохлов, Бумажная хроматография антибиотиков, «Наука», 1970. ⁷ N. Snell, K. Ijichi, I. C. Lewis, Appl. Microbiol., 14, 13 (1956). ⁸ Г. Г. Жарикова, Г. С. Катруха и др., В сборн. Биология *Vac. brevis* var. G.-B., М., 1968, стр. 45.