

*На правах рукописи*

**ДЕРБИКОВ Денис Дмитриевич**

**АСПАРТАТ-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ БАКТЕРИЙ: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ  
КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ С ИЗМЕНЕННЫМИ КАТАЛИТИЧЕСКИМИ  
СВОЙСТВАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

Специальность 03.02.07.- генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва-2017

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной биотехнологии №22 Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук, профессор

**ЯНЕНКО Александр Степанович**, заведующий Лаборатории молекулярной биотехнологии №22 Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва.

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, доцент

**ЕГОРОВ Сергей Николаевич**, сотрудник Кафедры молекулярной биологии, Биологический факультет МГУ им. Ломоносова, г. Москва

Кандидат химических наук

**РОЖКОВА Александра Михайловна**, старший научный сотрудник лаборатории Биотехнологии ферментов, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина» Российской академии наук, г. Пущино

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д217.013.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1. Тел.: +7(495)315-37-47, e-mail: genetika@genetika.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» -ГосНИИгенетика и на сайте <http://www.genetika.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 201 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
Кандидат химических наук, доцент

Воюшина Т.Л.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время производство аминокислот при помощи микроорганизмов является одной из передовых областей промышленной биотехнологии. Аминокислоты используются в различных областях промышленности, таких как пищевая, медицинская, полимерная промышленности, а также сельское хозяйство. Основное преимущество биотехнологического способа производства заключается в получении аминокислоты в биологически активной L-форме, в то время как при химическом синтезе получают рацемическую смесь L- и D- изомеров. Кроме того, микробиологический синтез протекает в водной среде при нормальной температуре и давлении, что делает процесс экологически безопаснее традиционных химических производств. Несмотря на значительный прогресс в биотехнологии получения аминокислот, сохраняется актуальность проведения работ по совершенствованию штаммов, применяемых для их получения.

Бактериальный фермент аспаратат-аммоний-лиаза (аспартаза), катализирующий реакцию аминирования фумарата или дезаминирования L-аспарагиновой кислоты, обладает значительным потенциалом применения в биотехнологиях получения аминокислот. Наибольший интерес представляет технология получения L-аспарагиновой кислоты биокаталитическим способом с помощью этого фермента. Также, активность этого фермента оказывает влияние на содержание в клетке аспарагиновой кислоты, которая является предшественником синтеза аминокислот аспарагинового семейства – лизина, треонина и метионина.

Ранее, для повышения аспартазной активности штаммов, применяемых для получения аминокислот, были использованы как традиционные подходы, так и молекулярно-генетические. Однако эти подходы обладали существенными недостатками: слабое увеличение аспартазной активности, высокая нестабильность штаммов и наличие в них трансмиссивных элементов, что ограничивает использование этих штаммов в промышленности. Современные технологии конструирования, использованные в данной работе, позволили получить штаммы с высоким уровнем аспартазной активности, высокой стабильностью и с низким уровнем побочной активности, которые нашли применение в новых биотехнологических процессах получения аминокислот.

**Цель работы:** Сравнительное исследование ферментов аспаратат-аммоний-лиаз (аспартаз) из разных видов бактерий, генетическое конструирование штаммов с высоким уровнем аспартазной активности, а также их применение в биотехнологических процессах получения аспарагиновой кислоты и лизина.

**Задачи:** 1. Клонирование и экспрессия генов аспартаз из различных источников. Сравнительное исследование каталитических свойств разных аспартаз.

2. Разработка генетических подходов к повышению аспартазной активности штаммов *E. coli* с использованием методов биоинженерии.

3. Получение штаммов *E. coli* с делетированными генами фумараз, контролирующими образование яблочной кислоты – побочного продукта при синтезе аспарагиновой кислоты.

4. Создание штаммов *E. coli* с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностями, и оценка эффективности их использования в качестве биокатализаторов для получения L-аспарагиновой кислоты.

5. Модификации аспартазной активности у *C. glutamicum* и оценка ее влияния на биосинтез лизина.

**Научная новизна.** Впервые было обнаружено, что использование сильных промоторов из T-нечетных фагов обеспечивает высокий уровень экспрессии гена аспартазы, находящегося в хромосоме *Escherichia coli*. Штаммы *Escherichia coli*, у

которых собственный промотор гена аспартазы замещен на промотор фага T5, обладают повышенным уровнем аспартазной активности (по меньшей мере в 28 раз) и отличаются высоким уровнем стабильности.

Впервые с помощью  $\lambda$  Red-зависимой системы рекомбинации получены производные штаммов *E. coli* MG1655 с удаленными генами фумараз – *fumA*, *fumB* и *fumC*, предназначенные для производства L-аспарагиновой кислоты. При использовании штаммов *E. coli* с удаленными генами фумараз в качестве биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты обнаружено, что одновременная утрата генов *fumA* и *fumC*, либо всех трех генов фумараз (*fumA*, *fumB*, *fumC*) позволяет снизить не менее чем в 10 раз содержание побочного продукта (L-яблочной кислоты) в реакционной смеси, а также повысить превращение фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту за счет более полной конверсии.

**Практическая значимость.** На основе полученных в ходе работы штаммов *Escherichia coli* с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностями были созданы образцы промышленных биокатализаторов для получения L-аспарагиновой кислоты. В условиях пилотной установки ЗАО «Биоамид» эти биокатализаторы продемонстрировали высокую эффективность на уровне лучших мировых аналогов (удельная аспартазная активность 2150-2530 мкМ/мин\*г БК; период полуинактивации - не менее 150 суток; конверсия - не менее 99,5%). L-аспарагиновая кислота, получаемая с использованием созданных биокатализаторов, предназначена для изготовления на её основе органических микроэлементных комплексов кормового назначения, которые по эффективности существенно превосходят традиционные минеральные добавки.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее эффективным генетическим подходом к повышению аспартазной активности штаммов *E. coli* является использование сильных промоторов из T-нечетных фагов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии гена аспартазы, находящегося в хромосоме *E. coli*. Экспрессия гена аспартазы *aspA* под контролем сильных фаговых промоторов позволяет повысить аспартазную активность штамма *E. coli* не менее чем в 28 раз.

2. Получение штаммов *E. coli* с делетированными генами фумараз (*fumA*, *fumB*, *fumC*), контролирующими образование яблочной кислоты – побочного продукта при синтезе аспарагиновой кислоты, и изучение их каталитических свойств показало, что для существенного (не менее 8 раз) снижения содержания L-яблочной кислоты в реакционной смеси достаточно удаления гена *fumC*. В этом случае также наблюдается повышение конверсии фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту.

3. Биокатализаторы, созданные на основе модифицированных штаммов *E. coli* с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностями обладают значительным потенциалом для промышленного получения L-аспарагиновой кислоты. Одновременные генетические модификации генов аспартазы и фумаразы позволяют увеличить не менее чем в 10 раз активность биокатализаторов, не менее чем в 7 раз повысить их продуктивность, а также снизить не менее чем в 10 раз содержание яблочной кислоты в реакционной смеси.

4. Конструирование штаммов *Corynebacterium glutamicum* - продуцентов лизина, обладающих аспартазной активностью за счет экспрессии в них гена аспартазы *aspA* из *E. coli* и изучение в этих штаммах процесса биосинтеза лизина показало, что доступность аспартата не является лимитирующей стадией синтеза лизина.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Автором опубликовано 2 статьи по теме диссертации в журнале, рекомендованном ВАК и индексируемом в Web of Science, а также 2 патента. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы

были представлены на российских конференциях: на Международном форуме «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (19-22 марта 2013, Москва, Россия), на Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (20-22 февраля 2017, Москва, Россия). Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2013-2016 гг. Апробация диссертационной работы была проведена 10 августа 2017 г. на семинаре секции «Генетика микроорганизмов» Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

**Личный вклад автора в исследование.** Автором лично выполнена большая часть работы, а именно: выделение ДНК, конструирование праймеров, проведение ПЦР, электрофореза в агарозном геле, белкового электрофореза в полиакриламидном геле, подготовка проб для секвенирования и анализ нуклеотидных последовательностей, конструирование экспрессионных плазмид и штаммов, а также измерение активности аспартазы.

Эксперименты по масштабированию процессов выращивания биомассы бактерий в ферментере и иммобилизации штаммов осуществлялись в ЗАО «Биоамид», г. Саратов, под руководством научного сотрудника Синолицкого М.К.

Автор лично проводил анализ литературных данных, участвовал в подготовке задач и планировании экспериментов, проводил анализ полученных результатов и оформлял их для предоставления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании статей по результатам проведенной работы.

**Связь работы с государственными программами.** Работа выполнена при поддержке межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» по государственному контракту с Министерством образования и науки Российской Федерации №14.М04.12.0004 от 27 июня 2014 г. (Шифр проекта 2014-14-М.04-0004)

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, двух глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы, 1 приложения. Работа изложена на 123 страницах печатного текста, включает 16 таблиц и 39 рисунков. Список цитируемой литературы включает 113 публикаций, в том числе 12 на русском языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Обзор литературы

Первые две главы диссертационной работы посвящены обзору литературы. Первая глава описывает фермент аспартат-аммоний лиазу (аспартазу), его распространенность и основные свойства. Вторая глава литературного обзора описывает применение аспартазы в промышленной биотехнологии и ее роль в биосинтезе аминокислот.

### Материалы и методы

В главе описаны использованные материалы и методы исследования. В работе использовались штаммы *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* и *Corynebacterium glutamicum*. Штаммы растили на средах LB или 2 LB с добавлением мальтозы. При необходимости в среды добавляли антибиотики в качестве селективных маркеров.

Определение аспартазной активности проводили по реакции образования L-аспарагиновой кислоты (на клетках и на бесклеточных экстрактах). Удельную

аспартазную активность клеток (или бесклеточных экстрактов) выражали в мкМ аспарагиновой кислоты, образованной 1 мг клеток по сухому весу (или 1 мг белка) за 1 минуту. Определение содержания белка проводили по методу Бредфорда [Bradford M.M., 1976]. Анализ общей и растворимой фракции белков проводили в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по [Laemmli U.K., 1970].

Синтез олигонуклеотидов проводили в ЦКП НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика или компании «Евроген». Все олигонуклеотиды были сконструированы с использованием программ OligoAnalyzer 3.1 и «VectorNTI Advance 11.0». Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили на приборе Mastercycler pro S с использованием высокоточной Phusion-полимеразы. Для анализа длинны фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле с TAE-буфером.

Выделение плазмидной ДНК проводилось с помощью щелочного лизиса, как это описано в [Green M.R. et al., 2012]. Для очистки ДНК из реакционных смесей использовались наборы коммерческих наборов GeneJet PCR Purification Kit. Для выделения РНК использовался набор RNeasy Mini Kit.

Для проведения реакции рестрикции ампликонов и плазмид использовали эндонуклеазы рестрикции серии Fast Digest с укороченным временем реакции. Лигирование фрагментов ДНК после рестрикции проводили с использованием ДНК-лигазы T4.

Введение генетических модификаций в хромосому *E. coli* проводилось как это описано у [Datsenko K.A. et al., 2000] в два этапа с модификацией [Sun W. et al., 2008].

На первом этапе в клетку вводилась кассета ДНК, содержащая ген устойчивости к антибиотику хлорамфениколу (*cat*) и ген чувствительности к сахарозе (*sacB*). За счет коротких областей гомологии в присутствии плазмиды-помощника происходила гомологичная рекомбинация с интеграцией кассеты в искомом месте и замещением присутствовавшего в хромосоме ранее гена. При этом образовывались колонии, устойчивые к хлорамфениколу, но чувствительные к сахарозе.

Второй этап рекомбинации проводили, если кассету *cat-sacB* требовалось удалить из хромосомы или если требовалось вставить новую последовательность. При введении в клетку фрагмента, содержащего нужную генетическую последовательность и несущего по краям короткие области гомологии с хромосомой, происходило замещение кассеты *cat-sacB* на данный фрагмент. При этом образовывались колонии, устойчивые к сахарозе, но чувствительные к хлорамфениколу.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Клонирование и экспрессия генов аспартаз из различных источников.

#### Сравнительное исследование каталитических свойств различных аспартаз.

В качестве объектов работы использовались аспартазы из бактерий *E. coli* ВКПМ В-7188 (применяется в настоящее время для промышленного получения L-аспарагиновой кислоты), *Bacillus sp.* УМ55-1 (содержит уникальную по литературным данным аспартазу) *S. glutamicum* ATCC13032 (штамм, используемый в биотехнологии производства аминокислот) и *S. glutamicum* 90 (штамм-производитель аминокислоты лизина). Клонирование и сравнение генов аспартаз из выбранных источников являлось первым и необходимым шагом для использования аспартаз в промышленной биотехнологии.

#### Секвенирование гена аспартазы из *Escherichia coli* ВКПМ В-7188

Используемый в настоящее время в промышленности штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 является штаммом, не подвергавшимся генетическим манипуляциям. В связи с этим было интересно изучить ген *aspA*, отвечающий за синтез гена аспартазы у этого штамма. Для этого была проведена ПЦР амплификация локуса аспартазы с последующим секвенированием.

Секвенирование показало, что в штамме *E. coli* ВКПМ-7188 также, как и в других штаммах *E. coli* ген аспартазы располагается между генами дикарбоксилатного транспортера *dcuA* и мембранного белка *fxsA*. Сам белок был практически идентичен гомологам из различных штаммов *E. coli*: по одной аминокислоте (пролин в положении 69 вместо серина) он отличался от белков аспартазы из *E. coli* KO11FL [GeneBank № CP002970] и *E. coli* W [GenBank № CP002967.1].

### Клонирование и сравнительное исследование выбранных аспартаз

Клонирование четырех генов аспартаз было осуществлено в клетках *E. coli* BLR(DE3) с помощью набора «aLICator LIC Cloning & Expression System» («Thermo Scientific», США). Все клонирования проводились в плазмиде pLATE31, обеспечивающей экспрессию клонированного гена с помощью промотора фага T7. Последовательности выбранных генов аспартаз были уточнены с помощью секвенирования, а также было проведено их сравнение с использованием программы Clustal-Omega.

Степень гомологии исследованных аспартаз по аминокислотным последовательностям составляла 36,1 - 40,6%. Гены аспартазы из *C. glutamicum* ATCC13032 и *C. glutamicum* 90 были практически идентичны (обнаружено лишь 4 отличия в нуклеотидных последовательностях; из них лишь одно приводит к аминокислотной замене Ala377Thr). Гены аспартаз из коринобактерий превышали по размеру гены аспартаз из *E. coli* и *Bacillus sp.* вследствие присутствия дополнительной последовательности размером 150 п.н. в начале гена (Рисунок 1). Увеличенный размер гена аспартазы характерен для всех известных штаммов *Corynebacterium*, последовательность которых представлена в международных базах данных.

ВКПМ7188	(1)	-----MSNNI	RIEEDLLGTREVPADAYY
C. g. 90	(1)	MSKTSNKSSADSKNDAKAEDI	VNGENQIATNESQSSDSA
C. g. 13032	(1)	MSKTSNKSSADSKNDAKAEDI	VNGENQIATNESQSSDSA
B. sp. YM55-1	(1)	-----MNTDVR	RIEKDFLGEKEIKPDAYY
ВКПМ7188	(24)	GVHTLRAIENFYI	SNNKISDIPEFVRGMVMV
C. g. 90	(75)	GVHTLRAVDNFQI	SRTTINHVPDFIRGMVQ
C. g. 13032	(75)	GVHTLRAVDNFQI	SRTTINHVPDFIRGMVQ
B. sp. YM55-1	(24)	GVQTRATENFPI	TGYRIH--PELIKSLGIV
ВКПМ7188	(98)	YQGGAGT	SVNMNTNEVLANIGLELM
C. g. 90	(149)	FQGGAGT	SLNMNTNEVVANLALFLG
C. g. 13032	(149)	FQGGAGT	SLNMNTNEVVANLALFLG
B. sp. YM55-1	(95)	IQGGAGT	SINMNA NEVIANRALELM
ВКПМ7188	(172)	EGFERKAVEFQ	DILKMGRITQLQDAVPM
C. g. 90	(223)	VAFRHKGNFVDI	IKMGRITQLQDAVPM
C. g. 13032	(223)	VAFRHKGNFVDI	IKMGRITQLQDAVPM
B. sp. YM55-1	(169)	QEFMKKADEF	FAGVTKMGRITQLQDAV
ВКПМ7188	(246)	SPLAVKKLA	EVTGFCPCVPAEDLIEAT
C. g. 90	(297)	RHQVVAAL	SEVTGLELKSARDLIEAT
C. g. 13032	(297)	RHQVVAAL	SEVTGLELKSARDLIEAT
B. sp. YM55-1	(243)	ISIVTEHL	LAKFSGHPLRSAQHLVDA
ВКПМ7188	(320)	GSSIMPAK	VNPVPEVVNQVCFKVI
C. g. 90	(371)	GSSIMPT	KVNPVPEVVNQVCFKVI
C. g. 13032	(371)	GSSIMPAK	VNPVPEVVNQVCFKVI
B. sp. YM55-1	(317)	GSSIMPG	KVNPVPEVMNQVAFQV
ВКПМ7188	(394)	ITANKEVCEGY	VYNSIGIIVTYLNFPI
C. g. 90	(445)	ITANADVCRAY	VDNSIGIITTYLNFPLG
C. g. 13032	(445)	ITANADVCRAY	VDNSIGIITTYLNFPLG
B. sp. YM55-1	(391)	IKANEERMKEY	VVEKSIGIITAINPHV
ВКПМ7188	(468)	KAKRYTDESEQ	
C. g. 90	(519)	RGRLYLEN---	
C. g. 13032	(519)	RGRLYLEN---	
B. sp. YM55-1	(465)	AGRK-----	

**Рисунок 1.** Сравнение аминокислотных последовательностей исследуемых аспартаз. Обозначения: B. sp. YM55-1 – аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1, ВКПМ7188 – аспартаза из *E. coli* ВКПМ В-7188, C. g. 90 – аспартаза из *Corynebacterium glutamicum* 90,

*C. g.* 13032 – аспартаза из *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Желтым цветом выделены консервативные аминокислоты, одинаковые у всех ферментов; красным цветом обозначены аминокислоты, входящие в предполагаемый активный сайт фермента.

Аспартаза из *E. coli* обладала более высоким уровнем гомологии с аспартазами из *Corynebacterium* (56%), чем с аспартазой из *Bacillus sp.* УМ55-1 (47%). Аспартаза из *Bacillus sp.* УМ55-1 отличалась от всех остальных исследованных аспартаз меньшим размером (468 а.о., в то время как аспартаза из *E. coli* состояла из 478 а.о.). Примечательно, что у всех исследованных аспартаз совпадали все аминокислотные остатки, предположительно входящие в каталитический центр фермента. Только одна замена наблюдалась в ферменте из *Bacillus sp.* УМ55-1: на месте 188 аминокислоты вместо глутамина находился гистидин.

Таким образом, аспартазы, использованные в работе, значительно отличались между собой как на аминокислотном, так и на нуклеотидном уровнях. Вместе с тем, у всех ферментов обнаруживались высокогомологичные области, содержащие аминокислотные остатки, вовлеченные в каталитический процесс (Рисунок 1).

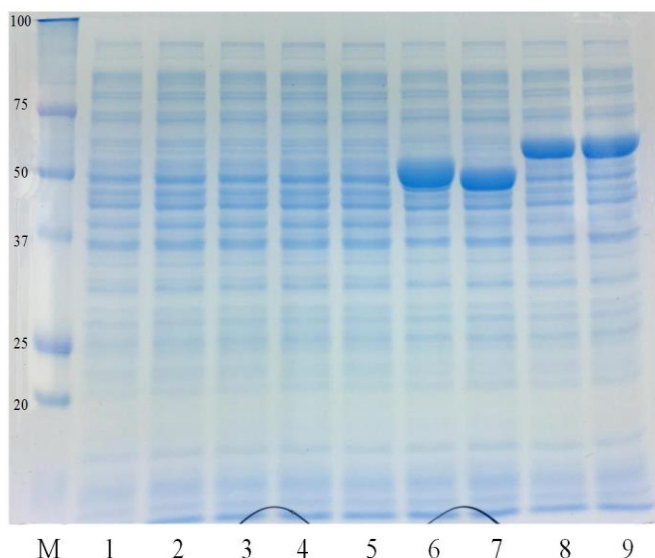
Клонированные гены аспартаз были проэкспрессированы в клетках *E. coli* BLR(DE3) под промотором T7 в одних и тех же условиях (Таблица 1).

**Таблица 1.** Аспартазная активность штаммов *E.coli*, в которых экспрессированы гены аспартаз различного происхождения под промотором T7.

	Гены аспартаз			
	<i>aspA</i> из <i>E.coli</i> ВКПМ7188	<i>aspB</i> из <i>B.sp</i> УМ55-1	<i>aspA</i> из <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	<i>aspA</i> из <i>C. glutamicum</i> №90
Аспартазная активность, мкМ/мг*мин	995 ± 17	448 ± 14	27,3 ± 2	26,8 ± 2

В данных условиях наибольшую аспартазную активность показал фермент из *E. coli* ВКПМ В-7188 (995 мкМ/мг\*мин). У фермента из *Bacillus sp.* УМ55-1 аспартазная активность оказалась в 2 раза ниже чем у аспартазы из *E. coli* (448 мкМ/мг\*мин). Оба фермента из *C. glutamicum* показали активность на уровне 25 единиц. При этом уровень продукции различных аспартаз в клетках *E. coli* BLR(DE3) был практически одинаковым, несмотря на различия в уровне активности (Рисунок 2). На этом основании был сделан вывод о том, что изученных ферментов аспартаза из *E. coli* обладает максимальной удельной активностью, а аспартаза из *C. glutamicum* - минимальной активностью.





экстрактов (БЭ), полученных из культур *E. coli* BLR(DE3), содержащих гены аспартаз из разных источников. Обозначения: М – маркер; 1 – БЭ из BLR(DE3); 2 – БЭ из ВКПМ В-7188 без индукции; 3 – БЭ из *Bacillus sp* УМ55-1 без индукции; 4 – БЭ из *C. glutamicum* ATCC13032 без индукции; 5 – БЭ из *C. glutamicum* №90 без индукции; 6 – БЭ из ВКПМ В-7188 с индукцией ИПТГ; 7 – БЭ из *Bacillus sp* УМ55-1 с индукцией ИПТГ; 8 – БЭ из *C. glutamicum* ATCC13032 с индукцией ИПТГ; 9 – БЭ из *C. glutamicum* №90 с индукцией ИПТГ. Вес маркера указан в kDa.

**Рисунок 2.** Результаты белкового электрофореза в ПААГ бесклеточных

На следующем этапе были исследованы физико-химические и каталитические свойства изучаемых аспартаз (Таблица 2):

**Таблица 2.** Сравнение физико-химических и каталитических свойств, изучаемых аспартаз.

Изучаемые свойства	Фермент			
	AspA <i>E.coli</i> ВКПМ7188	AspB <i>B.sp</i> УМ55-1	AspA <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	AspA <i>C. glutamicum</i> №90
Термостабильность	Теряет активность после 30 минут при 60°C	Сохраняет 75% активности после 60 минут при 60°C	Теряет активность после 30 минут при 60°C	Теряет активность после 30 минут при 60°C
Влияние Mg <sup>2+</sup> на аспартазную активность	Активность зависит от наличия Mg <sup>2+</sup>	Для активности не требуются ионы Mg <sup>2+</sup>	Активность зависит от наличия Mg <sup>2+</sup>	Активность зависит от наличия Mg <sup>2+</sup>
Константа Михаэлиса, мМ	20,1±5	9,9±4	68,6±6	73,9±6

Таким образом, исследуемые аспартазы из *E. coli*, *C. glutamicum* и *Bacillus sp.* УМ55-1 существенным образом отличались по физико-химическим и каталитическим свойствам. Аспартаза AspB из бацилл обладала высоким уровнем термостабильности, её активность не зависела от ионов магния. Однако её удельная активность была почти в 2 раза ниже активности аспартазы из *E.coli*. Аспартаза из коринобактерий по своим физико-химическим свойствам была похожа на аспартазу из *E. coli*, однако обладала низкой удельной активностью. Аспартаза из *E. coli* обладала максимальной удельной активностью, что является существенным преимуществом для использования этого фермента в качестве катализатора синтеза L-аспарагиновой кислоты.

## 2. Разработка генетических подходов к повышению аспартазной активности штамма *Escherichia coli* с использованием методов биотехнологии

Исходя из анализа научной и патентной литературы нами были использованы следующие основные подходы для повышения аспартазной активности штаммов:

1. Амплификация гена аспартазы в составе мультикопийных экспрессионных плазмид.
2. Усиление экспрессии гена аспартазы в составе хромосомы за счет замены собственного промотора гена на сильный промотор.
3. Получение мутантных вариантов аспартазы с повышенной удельной активностью с помощью генетических модификаций гена.

### Амплификация гена аспартазы в составе мультикопийных экспрессионных плазмид

Экспрессия генов под сильным промотором на плазмиде является одним из основных способов повышения ферментативной активности штамма. Использование многокопийных плазмид позволяет получать большие количества необходимых белковых продуктов за счет возрастания числа копий рекомбинантной ДНК в расчете на клетку.

Всего было создано три конструкции (обозначены pDL1, pDL2, pDL3), в которых ген аспартазы был клонирован под сильным промотором (Таблица 3). Для экспрессии использовались индуцибельный промотор  $P_{lacUV5}$  и конститутивные промоторы  $P_{Eftu}$  из *S. glutamicum* и  $P_{G25}$  из бактериофага T5. В качестве мультикопийной плазмиды были использованы производные плазмиды серии pUC, копияность которых составляет 500-700 штук на клетку.

**Таблица 3.** Сравнение аспартазной активности у полученных плазмидных штаммов

Штамм	Аспартаза	Промотор	Активность, мкМ/мг*мин	Экспрессия аспартазы
<i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	AspA	$P_{aspA}$	9,1±5	Конститутивно
<i>E. coli</i> pDL-1	AspA	$P_{lacUV5}$	38±4	Требуется добавление индуктора ИПТГ
<i>E. coli</i> pDL-2	AspA	$P_{efty}$	25,1±6	Конститутивно
<i>E. coli</i> pDL-3	AspB	$P_{G25}$	254±14	Конститутивно

Из данных представленных в Табл. 3 следует, что экспрессия гена аспартазы под сильным промотором в составе мультикопийного вектора позволяет повысить аспартазную активность от 4 до 28 раз по сравнению с бесплазмидным штаммом. Использование промотора  $P_{G25}$  из фага T5 для экспрессии гена аспартазы обеспечивает максимальный уровень аспартазной активности (240-254 мкМ/мг\*мин).

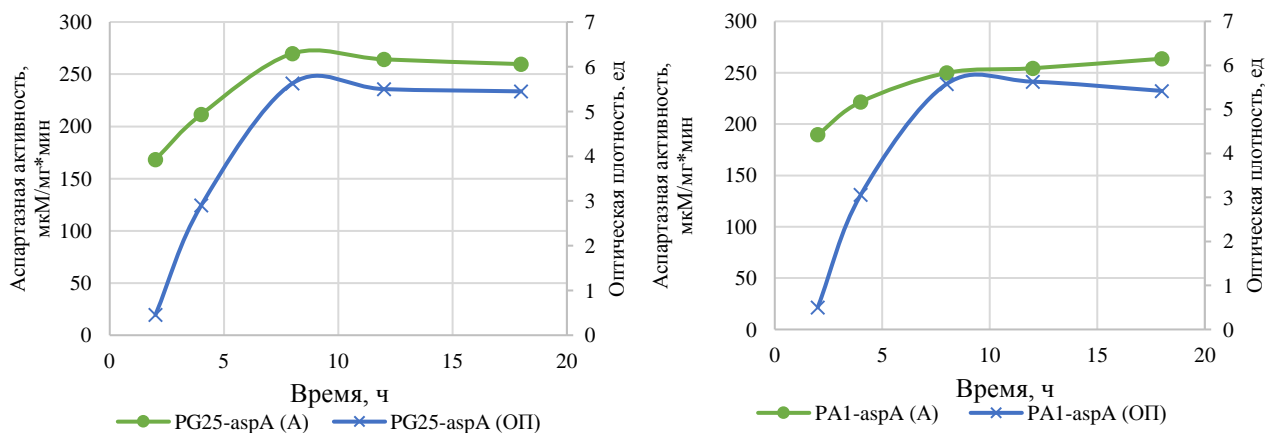
### Экспрессия гена аспартазы под сильным промотором в составе хромосомы

С учетом современных требований к безопасности штаммов, применяемых в пищевой и кормовой промышленности, нами были сконструированы штаммы с высокой аспартазной активностью, не содержащие рекомбинантных плазмид. В этом случае все генетические изменения осуществлялись непосредственно в хромосоме штамма.

Для получения бесплазмидных штаммов, обладающих высокой аспартазной активностью, в хромосоме штамма *E. coli* MG655 была осуществлена замена собственного промотора гена аспартазы *aspA* на сильные промоторы, обеспечивающие конститутивную экспрессию гена. В качестве сильных конститутивных промоторов были использованы фаговые промоторы - промотор  $P_{G25}$  из фага T5 и промотор  $P_{A1}$  из фага T7. Замену

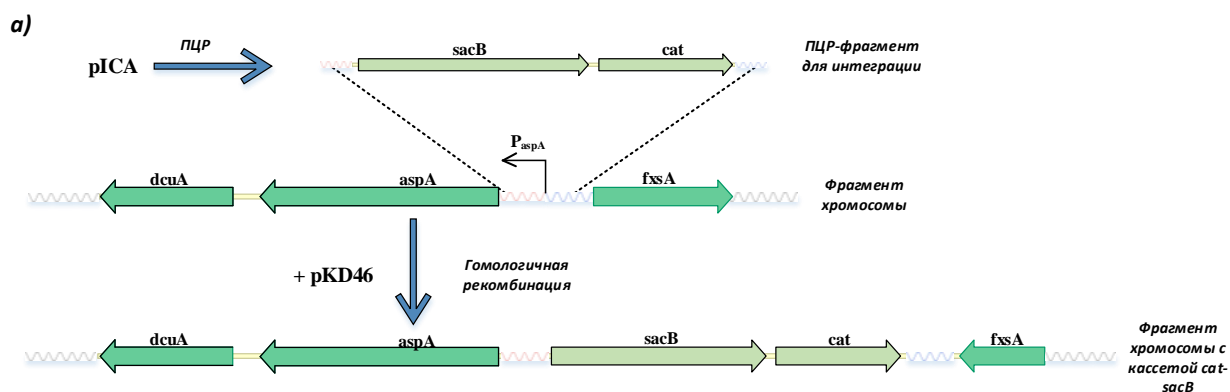
промоторов проводили с помощью Red-зависимой системы рекомбинации фага  $\lambda$  (Рисунок 3).

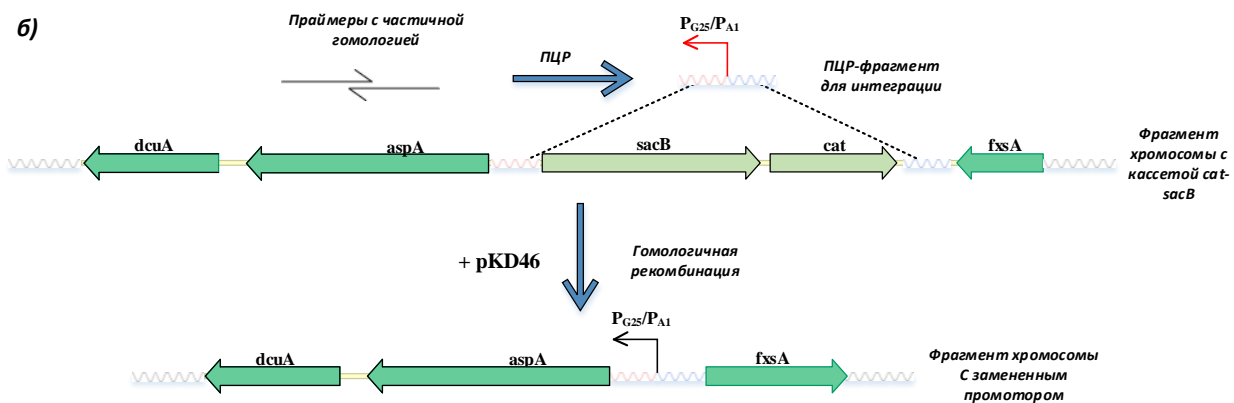
При этом были получены штамм *E. coli* D2, содержащий аспартазу *aspA* под промотором  $P_{G25}$ , и штамм *E. coli* D3, содержащий аспартазу *aspA* под промотором  $P_{A1}$ . У полученных штаммов был проверен рост и аспартазная активность (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Аспартазная активность и рост штаммов *E. coli*, у которых собственный промотор гена аспартазы заменен на промотор  $P_{G25}$  из фага T5 (А) или промотор  $P_{A1}$  из фага T7 (Б). обозначения: А – активность; ОП – оптическая плотность

Из результатов, представленных на Рисунке 4, можно видеть, что аспартазная активность штамма *E. coli* D3 (промотор  $P_{A1}$ ) достигала максимума на ранней стационарной фазе через 8 часов после начала культивирования и составляла 254-264 мкМ/мг\*мин. Оптическая плотность культуры в этот момент достигала 5,4-5,6 ед. Активность штамма *E. coli* D2 (промотор  $P_{G25}$ ) также достигала максимума после 8 часов культивирования и составляла 270 мкМ/мг\*мин. У контрольного штамма максимальная активность наблюдалась после 4-8 часов культивирования и составляла 6,2-8,8 мкМ/мг\*мин. Таким образом замена в хромосоме собственного промотора гена аспартазы на сильные фаговые промоторы позволила повысить аспартазную активность по меньшей мере в 28 раз по сравнению с контролем.

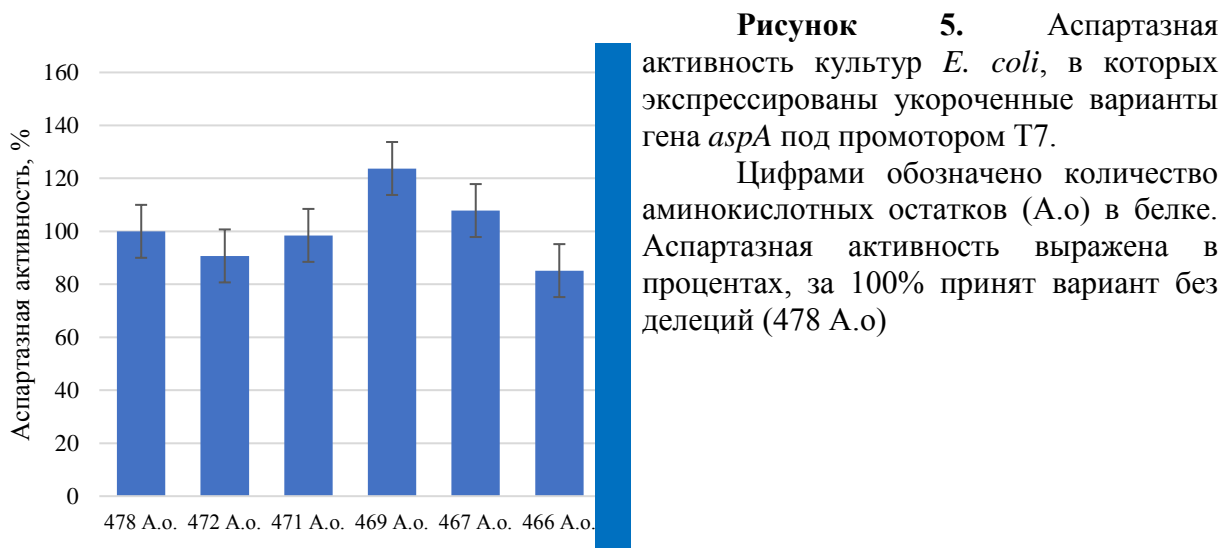




**Рисунок 3.** Схема замены промотора гена *aspA*. А) первый этап - вставка кассеты *cat-sacB* вместо промотора гена *aspA*; б) второй этап – удаление кассеты *cat-sacB* и вставка промотора  $P_{G25}/P_{A1}$ . Плазмиды: pKD46 – вспомогательная плаزمида для гомологичной рекомбинации; pICA – плазмида для наработки фрагмента *cat-sacB* для интеграции. Гены: *sacB* - ген левансахаразы (чувствительность к сахарозе); *cat* - ген устойчивости к хлорамфениколу; *dcuA* – ген дикарбоксилатного транспортера; *fxsA* – внутренний мембранный белок. Спиральями обозначены гомологичные участки, по которым проходит рекомбинация.

### Получение мутантных вариантов аспартазы с измененным уровнем активности

Ранее было показано, что утрата аминокислот на С – конце молекулы аспартазы AspA в результате действия протеаз приводит к повышению аспартазной активности фермента [Viola R.E. et al., 1999]. С целью получения вариантов фермента с повышенной активностью, были получены делеционные варианты гена *aspA* из *E. coli* ВКПМ В-7188. Все варианты были клонированы в плазмиде pLATE31 и у них была измерена аспартазная активность (Рисунок 5).



Максимальной активностью обладал вариант у которого были утрачены 27 нуклеотидов (вариант 469 а.о.). Активность этого варианта выросла на 20-25% по сравнению с исходным ферментом. В то же время утрата 18 (вариант 472 а.о.) или 33 (вариант 467 а.о.) концевых нуклеотидов у гена *aspA* не приводила к существенному изменению уровня аспартазной активности культур. Делеция 36 аминокислотных остатков (вариант 466 а.о.) приводила к 15% снижению активности культур. Стоит отметить, что хотя клетки *E. coli* BLR(DE3), в которых были экспрессированы

укороченные варианты гена *aspA* под промотором T7, обладали высоким уровнем аспартазной активности, однако они были непригодны для использования в качестве биокатализаторов, поскольку обладали повышенной чувствительностью к осмотическому шоку и при манипуляциях быстро лизировались.

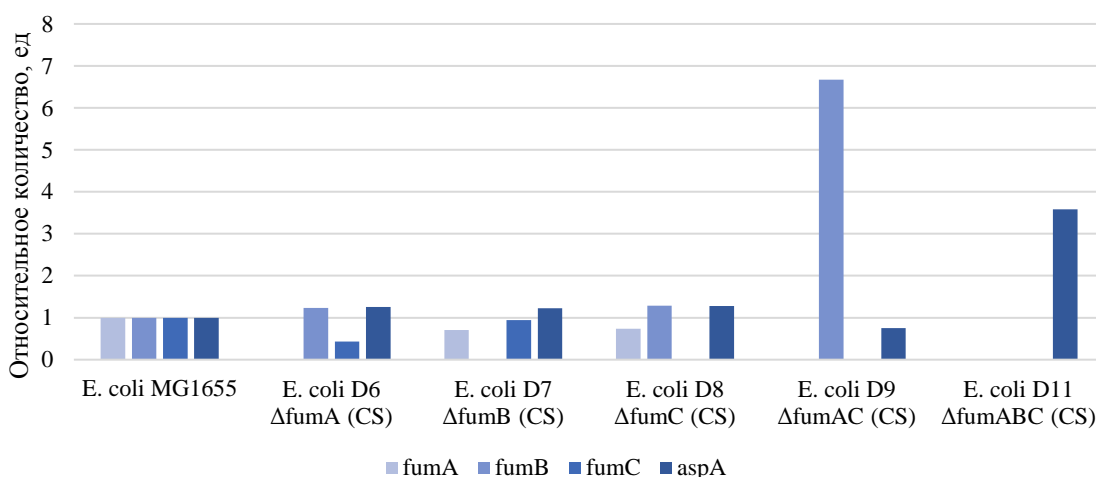
Таким образом, из всех изученных способов повышения аспартазной активности наиболее эффективным оказалось использование сильных промоторов из T-нечетных фагов (P<sub>G25</sub> и P<sub>A1</sub>), обеспечивающих высокий конститутивный уровень экспрессии гена аспартазы. Экспрессия гена *aspA* под их контролем в составе хромосомы позволяет повысить аспартазную активность штаммов *E. coli* не менее чем в 28 раз. На основании полученных результатов и с учетом требований по безопасности был сделан вывод о том, что эта стратегия является наилучшим решением для создания промышленного биокатализатора для производства L-аспарагиновой кислоты.

### 3. Получение штаммов *E. coli* с делетированными генами фумараз и изучение их каталитических свойств

При биокаталитическом получении аспарагиновой кислоты, образующаяся под действием фермента фумаразы яблочная кислота, является побочным продуктом, который ухудшает качество полученной L-аспарагиновой кислоты. Поэтому нами было решено удалить из хромосомы будущего штамма-производителя гены, кодирующие фермент фумаразу.

Известно, что клетки *Escherichia coli* содержат три гена фумаразы – *fumA*, *fumB* и *fumC*. Было получено пять типов штаммов: *E. coli* D6 Δ*fumA*(CS) (удален ген *fumA*); *E. coli* D7 Δ*fumB*(CS) (удален ген *fumB*); *E. coli* D8 Δ*fumC*(CS) (удален ген *fumC*); *E. coli* D9 Δ*fumAC*(CS) (удалены гены *fumA* и *fumC*); *E. coli* D11 Δ*fumABC*(CS) (удалены гены *fumA*, *fumB* и *fumC*). В качестве исходного штамма использовался штамм *E. coli* MG1655 с удаленным геном *iclR*. Удаление генов фумараз проводили с помощью Red-зависимой системы рекомбинации бактериофага λ.

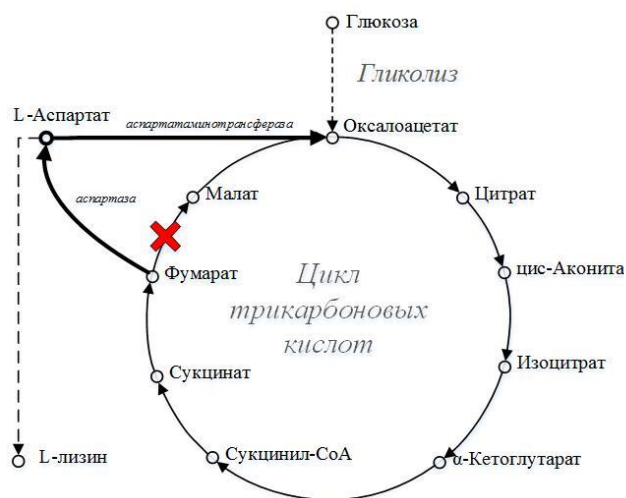
У полученных штаммов был проведен транскрипционный анализ генов фумараз и аспартазы.



**Рисунок 6.** Транскрипционный анализ генов фумараз и аспартазы в полученных штаммах

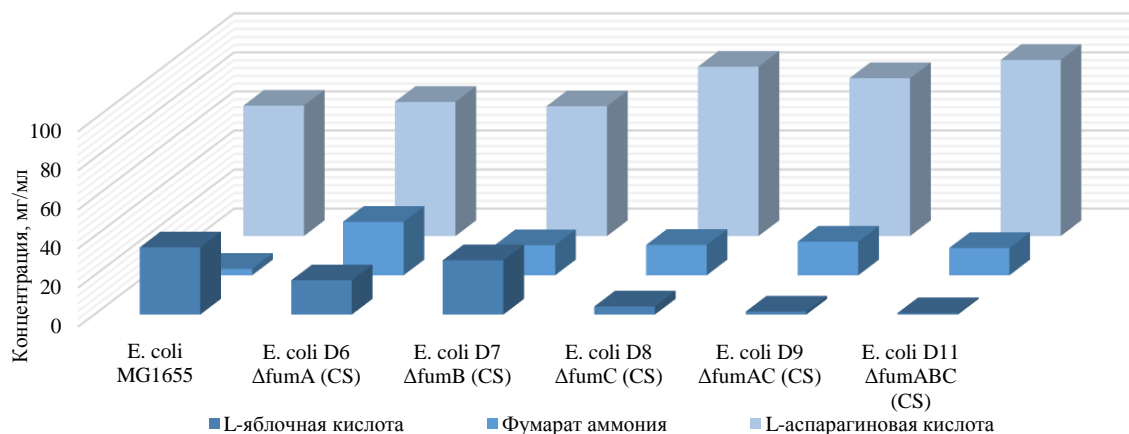
Из данных, представленных на Рисунке 6 видно, что удаление одного гена фумаразы незначительно влияет на транскрипцию остальных фумараз и аспартазы. При одновременном удалении генов *fumA* и *fumC* наблюдается увеличение транскрипции гена *fumB* в 6,7 раз. По-видимому, таким образом клетка пытается компенсировать утрату фумараз, функционирующих в аэробных условиях. При этом, уровень транскрипции гена

аспартазы также не изменяется. Однако в штамме, в котором удалены сразу все три гена фумаразы, наблюдается существенное увеличение транскрипции гена *aspA* в 3,6 раз. Это можно объяснить тем, что при удалении всех фумараз, функционирование ЦТК по-видимому восстанавливается за счет активизации аспартазы и использования аспаратаминотрансферазы (Рисунок 7).



**Рисунок 7.** Предполагаемое функционирование ЦТК в штаммах с делецией фумараз.

Штаммы с делециями генов фумараз были использованы в качестве биокатализатора синтеза L-аспарагиновой кислоты из раствора фумарата аммония (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Содержание органических кислот в образцах реакционной смеси после окончания синтеза L-аспарагиновой кислоты при использовании в качестве биокатализаторов клеток штаммов с удаленными генами фумараз.

Из результатов, представленных на Рисунке 7 следует, что максимальный уровень накопления L-аспарагиновой кислоты наблюдается в случае использования в качестве биокатализатора клеток штамма *E. coli* D11 ΔfumABC (CS) (90,2 мг/мл). Повышенный уровень накопления L-аспарагиновой кислоты наблюдается при использовании клеток штаммов *E. coli* D8 ΔfumC (CS) (86,7 мг/мл) и *E. coli* D9 ΔfumAC (CS) (80,8 мг/мл). Также, во всех этих трех случаях отмечается самое низкое содержание побочного продукта – L-яблочной кислоты, которое составляет 4,17 мг/мл и 1,54 мг/мл. При этом, в контрольном эксперименте в реакционной смеси содержалось 66,8 мг/мл L-аспарагиновой кислоты, 3,3 мг/мл фумарата аммония и 34,4 мг/мл L-яблочной кислоты. В то же время, биокатализаторы на основе штаммов *E. coli* D6 ΔfumA (CS) и *E. coli* D7 ΔfumB (CS) практически не отличались по своим характеристикам от исходного штамма *E. coli* MG1655.



Таким образом, использование в качестве биокатализатора клеток *E. coli* у которых удален либо один ген *fumC*, либо все три гена фумаразы (*fumA*, *fumB*, *fumC*), позволило снизить не менее чем 8 раз содержание побочного продукта (L-яблочной кислоты) в реакционной смеси, а также повысить превращение фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту за счет более полной конверсии. Однако, учитывая, что штаммы, у которых удалены все гены фумаразы, обладают низкими ростовыми характеристиками, представлялось целесообразным в дальнейшем использовать штаммы, у которых инактивирован либо ген *fumC*, либо оба гена *fumA* и *fumC*.

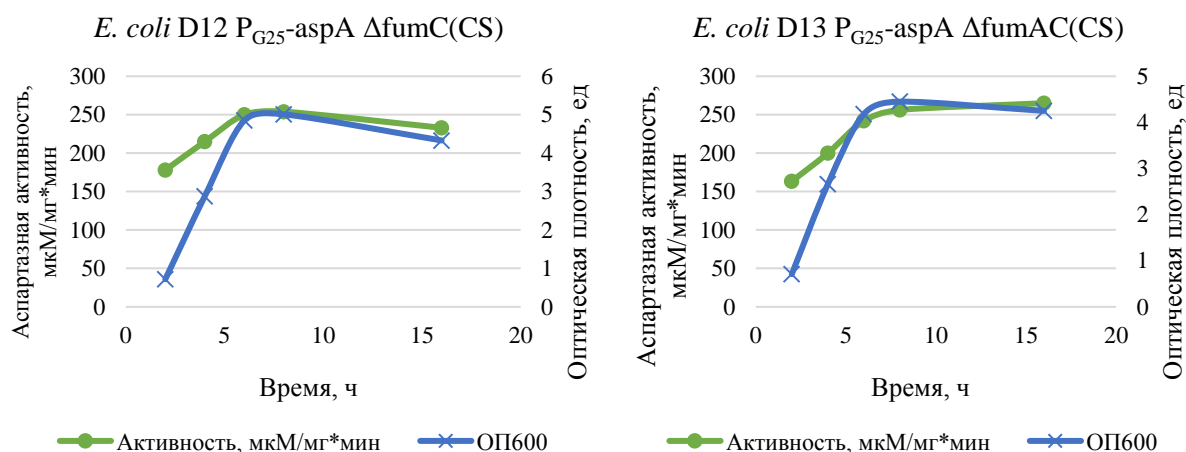
Полученные результаты по получению мутантов с удаленными генами фумаразы и изучению их каталитических свойств были далее использованы для получения промышленных биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты.

#### 4. Создание промышленных биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты на основе штаммов *E. coli* с высокой аспартазной и сниженной фумаразной активностями

С учетом опыта промышленного использования биокатализаторов для получения L-аспарагиновой кислоты, нами были сформулированы требования к штаммам, на основе которых могут быть созданы эффективные биокатализаторы:

- Штаммы должны обладать высоким уровнем аспартазной активности;
- Штаммы должны обладать низким уровнем побочной фумаразной активности;
- Штаммы не должны содержать плазмид и других трансмиссивных элементов;
- Штаммы должны расти на простых и доступных средах.

Штаммы, удовлетворяющие этим требованиям, были получены с помощью объединения в одном штамме двух генетических модификаций: замещения собственного промотора гена *aspA* в хромосоме на фаговый конститутивный промотор  $P_{G25}$ , а также удалением гена *fumC* или генов *fumA-fumC*. Замещение происходило с помощью Red-зависимой системы рекомбинации бактериофага  $\lambda$ ; в качестве исходного использовался штамм *E. coli* D2, полученный на предыдущем этапе. Таким образом были получены штаммы *E. coli* D12  $P_{G25-aspA} \Delta fumC(CS)$  (ген *aspA* под  $P_{G25}$  промотором; удален ген *fumC*) и *E. coli* D13  $P_{G25-aspA} \Delta fumAC(CS)$  (ген *aspA* под  $P_{G25}$  промотором; удалены гены *fumA* и *fumC*). У полученных штаммов была проверена скорость роста и аспартазная активность (Рисунок 9):



**Рисунок 9.** Рост и аспартазная активность полученных штаммов *E. coli* D12  $P_{G25-aspA} \Delta fumC(CS)$  и *E. coli* D13  $P_{G25-aspA} \Delta fumAC(CS)$ .

Из Рисунка 9 видно, что делеция гена *fumC* практически не влияет на ростовые качества штамма. Делеция обоих генов *fumA* и *fumC* приводит к незначительному снижению роста на 10-14%. Максимальная аспартазная активность составляет 254 мкМ/мг\*мин для штамма *E. coli* D12  $P_{G25-aspA} \Delta fumC(CS)$  и 265 мкМ/мг\*мин для штамма

*E. coli* D13 P<sub>G25</sub>-aspA ΔfumAC(CS) и проявляется после 8 часов культивирования. Таким образом, полученные в ходе конструирования штаммы, предназначенные для создания промышленных биокатализаторов, обладали высокой аспартазной активностью (около 250 мкМ/мг\*мин), что почти в 30 раз превышало уровень активности родительского штамма (8,4 мкМ/мг\*мин).

Полученные штаммы были использованы в качестве биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония. (Таблица 4).

Штамм	L-аспарагиновая кислота, мг/мл	L-яблочная кислота, мг/мл	Фумарат аммония
<i>E. coli</i> MG1655	66,8	34,4	3,3
<i>E. coli</i> D12 ΔfumC(CS)	120,2	1,2	1,8
<i>E. coli</i> D13 ΔfumAC(CS)	119,7	1,4	1,4

**Таблица 4.** Содержание органических кислот в образцах реакционной смеси после окончания синтеза L-аспарагиновой кислоты при использовании в качестве биокатализатора клеток штаммов D12 P<sub>G25</sub>-aspA ΔfumC(CS) и D13 P<sub>G25</sub>-aspA ΔfumAC(CS)

Из результатов таблицы следует, что биокатализаторы на основе полученных штаммов нарабатывали L-аспарагиновой кислоты больше, чем контрольный исходный штамм. Так, штамм *E. coli* D12 ΔfumC(CS) нарабатывал 120,2 мг/мл; *E. coli* D13 ΔfumAC(CS) – 119,7 мг/мл. Контрольный штамм *E. coli* MG1655 в тех же условиях нарабатывает всего лишь 66,8 мг/мл аспарагиновой кислоты. Также полученные штаммы нарабатывали меньше L-яблочной кислоты по сравнению с контролем: *E. coli* D12 ΔfumC(CS) – 1,2 мг/мл; *E. coli* D13 ΔfumAC(CS) – 1,4 мг/мл; *E. coli* MG1655 – 34,4 мг/мл

Масштабирование процессов выращивания биомассы бактерий в ферментере проводилось совместно с ЗАО «Биоамид» (Таблица 5).

**Таблица 5.** Сравнение штаммов D12 P<sub>G25</sub>-aspA ΔfumC(CS) и D13 P<sub>G25</sub>-aspA ΔfumAC(CS) при культивировании в 20 л ферментере

Показатели	ВКПМ В-7188	D12 P <sub>G25</sub> -aspA ΔfumC(CS)	D13 P <sub>G25</sub> -aspA ΔfumAC(CS)
Продолжительность ферментации, ч	16	22	27
Биомасса (по сух. весу), г/л	17,9	41,3	27,7
Общая аспартазная активность, мкМ/мин*мл КЖ	268	2404	1861
Удельная аспартазная активность, мкМ/мин*мг клеток (по сух. весу)	15	58,2	67,1
Удельная фумаразная активность, мкМ/мин*мг СК	1,2-2,5	< 0,2	< 0,2

Из данных, представленных в Таблице 5 видно, что созданные штаммы при их выращивании в ферментерах по всем показателям (урожай клеток, удельная активность клеток, общая активность культуры) превосходили контрольный штамм *E. coli* ВКПМ В-7188.

Для создания промышленных форм биокатализаторов полученную биомассу иммобилизовали в полиакриламидный гель или матрицу шитого полиэтиленimina и измельчали в виде гранул. Технические характеристики биокатализаторов были исследованы в процессах синтеза L-аспарагиновой кислоты в реакторах колонного типа (Таблица 6):



**Таблица 6.** Технические характеристики полученного биокатализатора для производства L-аспарагиновой кислоты

Показатели	Биокатализаторы на основе штаммов		
	<i>E. coli</i> ВКПМ В-7188*	<i>E. coli</i> D12 Δ <i>fumC</i> (CS)**	<i>E. coli</i> D13 Δ <i>fumA</i> (CS)**
Удельная аспартазная активность биокатализатора, мкМ/мин*г БК	200	2150	2530
Удельная фумаразная активность БК, мкМ/мин*г БК	12-18	< 1	< 1
Период полуинактивации, сут	90	> 150	> 150
Конверсия фумарата, %	99	99,5	99,5
Продуктивность биокатализатора, кг к-ты/кг БК	200	≥ 1400	≥ 1400
Содержание яблочной к-ты, г/л	5-6	< 0,5	< 0,5

\* клетки, иммобилизованные в полиакриламиде.

\*\* клетки, иммобилизованные в сшитом полиэтиленимине.

Из данных, представленных в Таблице 6 видно, что для созданных биокатализаторов период инактивации превысил 150 суток, в то время как для базового биокатализатора ВКПМ В-7188 период полуинактивации составил 90 суток. При использовании новых биокатализаторов в реакционной среде резко снижалось содержание яблочной кислоты с 5-6 г/л (базовый катализатор) до менее 0,5 г/л. За весь период работы продуктивность биокатализаторов превысила 1400 кг аспарагиновой кислоты /кг БК, что в 7 раз превысило продуктивность базового биокатализатора.

Таким образом, с помощью рекомбинантной инженерии впервые сконструированы штаммы, обладающие высоким конститутивным уровнем аспартазной активности (за счет замены собственного промотора гена аспартазы в хромосоме *E. coli* на сильный фаговый промотор P<sub>G25</sub>) и сниженной фумаразной активностью (за счет делеции генов *fumC* или *fumA-fumC*), на основе которых созданы промышленные биокатализаторы для производства L-аспарагиновой кислоты. Полученные данные свидетельствуют о существенных преимуществах созданных биокатализаторов в сравнении с катализаторами, используемыми в настоящее время.

### 5. Модификация аспартазной активности у *C. glutamicum* и оценка их влияния на биосинтез лизина

Штаммы *Corynebacterium glutamicum* широко используются для получения в промышленных масштабах аминокислот аспарагинового семейства, прежде всего, лизина. Поэтому представляло значительный интерес выяснить какое влияние оказывает изменение уровня аспартазной активности у *Corynebacterium glutamicum* на биосинтез лизина.

На предыдущем этапе работы были клонированы гены аспартазы из двух штаммов *C. glutamicum* ATCC13032 и *C. glutamicum* 90 (ранее *Brevibacterium*) и экспрессированы в *E. coli*. Оказалось, что оба этих фермента обладают очень низкой удельной активностью по сравнению с ферментами из *E. coli*. В связи с этим, уровень аспартазной активности штаммов *C. glutamicum* может быть модифицирован с помощью методов генной инженерии за счет экспрессии в этих штаммах гена *aspA* из *E. coli*.

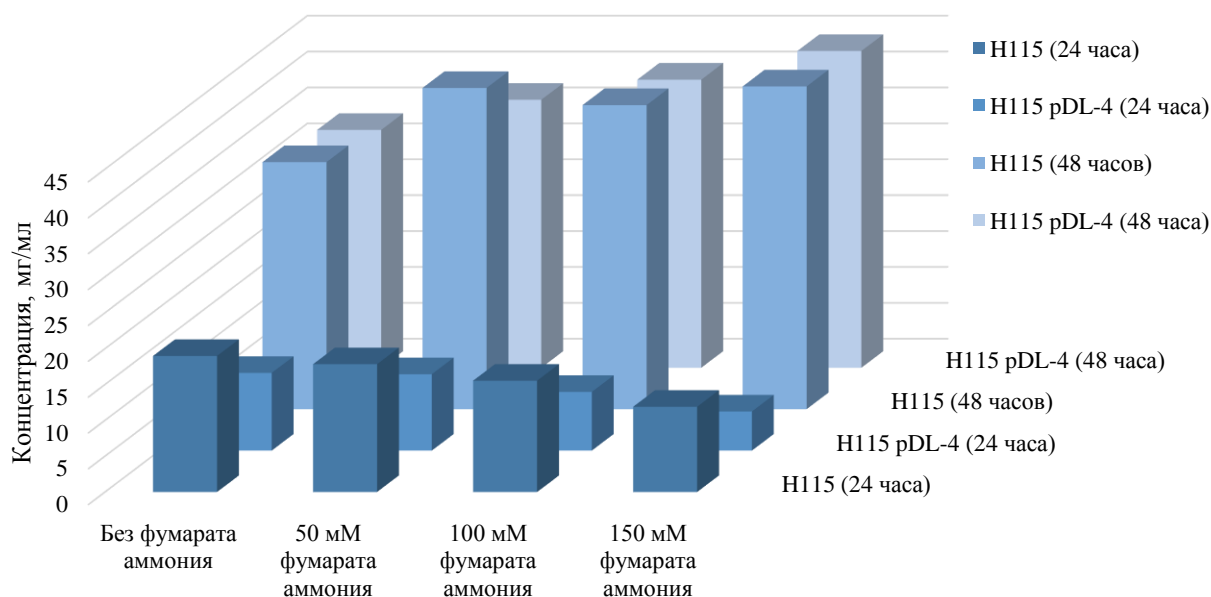
Для этого была создана рекомбинантная плазмида pDL-4 с геном *aspA* из *E. coli*, способная автономно поддерживаться в клетках *C. glutamicum*. Полученную плазмиду трансформировали в штамм *C. glutamicum* Н115, являющийся продуцентом лизина. В полученных клетках определяли рост и аспартазную активность при выращивании на ферментационной среде с различными добавками фумарата аммония (Таблица 7).

**Таблица 7.** Рост и аспартазная активность штамма *C. glutamicum* H115 pDL-4

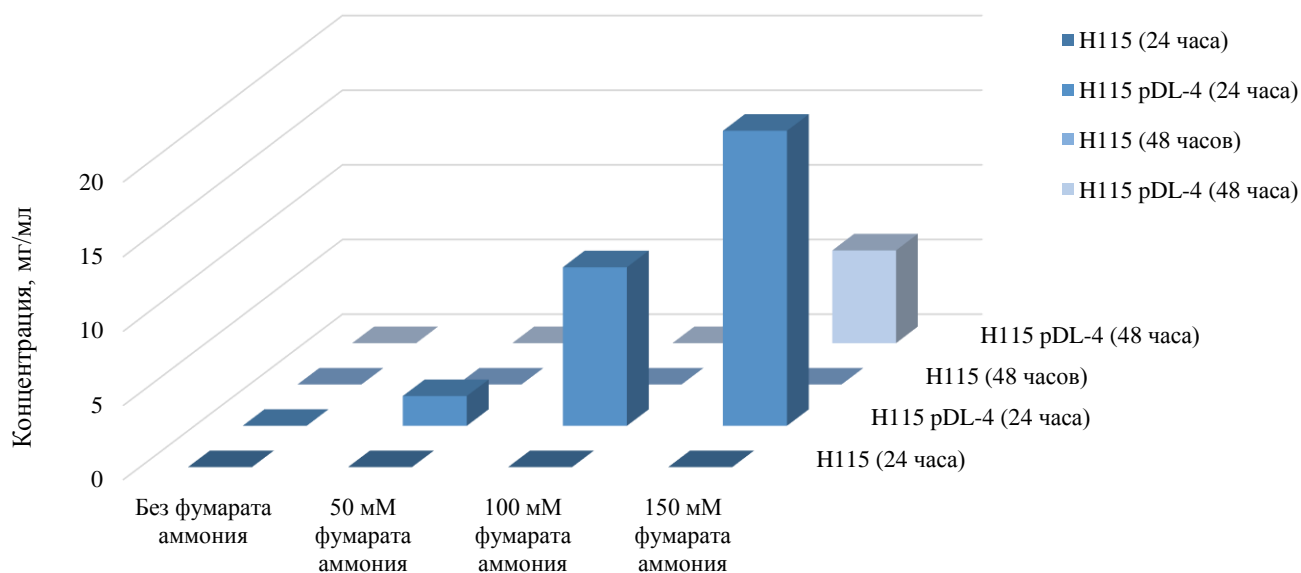
Штамм	Оптическая плотность культур, выросших на ферментационной среде с добавлением различных концентраций fumarата аммония:			
	0	50 мМ	100 мМ	150 мМ
H115 (24 часа)	32,0	29,8	32,3	29,4
H115 (48 часов)	43,2	37,2	36,9	36,3
H115 pDL-4 (24 часа)	29,8	28,1	22,7	20,2
H115 pDL-4 (48 часов)	43,9	40,7	39,8	42,2
Штамм	Активность культур, выросших на ферментационной среде с добавлением различных концентраций fumarата аммония:			
	0	50 мМ	100 мМ	150 мМ
H115 (24 часа)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
H115 (48 часов)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
H115 pDL-4 (24 часа)	15,9	15,1	14,9	13,3
H115 pDL-4 (48 часов)	7	8,8	7,4	7,5

Из данных, представленных в Таблице 7 видно, что введение плазмиды с геном *aspA* практически не сказалось на росте штаммов. Можно отметить незначительное снижение оптической плотности культур *C. glutamicum* H115 pDL-4 на 24 час, растущих в присутствии fumarата аммония. Культуры штамма *C. glutamicum* H115 независимо от среды и времени культивирования (24 или 48 час) не обладали аспартазной активностью. В то же время введение в штамм *C. glutamicum* H115 плазмиды с геном *aspA* приводило к возрастанию аспартазной активности. После 24 часов культивирования уровень аспартазной активности штамма *C. glutamicum* H115 (pDL-4) составлял 13,3 – 15,9 мкМ/мг\*мин. При этом аспартазная активность незначительно снижалась с ростом концентрации fumarата аммония в среде. После 48 часов активность плазмидного штамма снижалась до 7 мкМ/мг\*мин

В культуральной жидкости полученных штаммов методом ВЭЖХ анализировали содержание лизина и аспарагиновой кислоты (Рисунок 10,11)



**Рисунок 10.** Содержание лизина в культуральной жидкости после выращивания штаммов *C. glutamicum* в течение 24 часов.



**Рисунок 11.** Содержание аспарагиновой кислоты в культуральной жидкости после выращивания штаммов *C. glutamicum* в течение 24 часов.

Из данных, представленных на Рисунке 10 следует, что через 24 часа культивирования, содержание лизина в культуральной жидкости штамма *C. glutamicum* H115 pDL-4 было снижено с 19 мг/мл до 10,8 мг/мл по сравнению с родительским штаммом H115. Еще более сильное снижение содержания лизина наблюдалось при добавлении в среду фумарата аммония как в случае контрольного, так и в случае плазмидного штаммов. Также отмечено, что в КЖ плазмидного штамма по сравнению с контрольным появляется аспарагиновая кислота, содержание которой возрастает с 0 до 19,8 г/л с увеличением количества добавляемого фумарата аммония.

Через 48 час культивирования, для обоих штаммов содержание лизина в культуральной жидкости увеличивается до 33-34 г/л. При добавлении фумарата аммония наблюдается увеличение продукции лизина: при выращивании *C. glutamicum* H115 с добавлением 150 мМ фумарата аммония, концентрация лизина увеличивается на 30% и достигает 44-45 г/л. При выращивании плазмидосодержащего штамма *C. glutamicum* H115 pDL-4 с добавлением 150 мМ фумарата аммония, концентрация лизина также увеличивается с 33 г/л до 44 г/л. Также в этом случае отмечается наличие аспарагиновой кислоты (6,2 г/л)

Таким образом, экспрессия гена аспартазы в *C. glutamicum* не приводит к повышению уровня лизина. При этом в клетке отмечается повышенная концентрация аспарагиновой кислоты. На этом основании был сделан вывод, что в штамме *C. glutamicum* H115 доступность аспартата не является лимитирующей стадией для синтеза лизина. Также отмечено, что добавление фумарата аммония приводит к увеличению количества синтезируемого лизина.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия генов аспартаз из 3 различных источников (бактерии *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* YM55-1 и *Corynebacterium glutamicum* ) в клетках *E. coli* и их сравнительное изучение продемонстрировало преимущества аспартазы из *E. coli* как биокатализатора синтеза L-аспарагиновой кислоты.

2. Наиболее эффективным генетическим подходом к повышению аспартазной активности штаммов *E. coli* является замена собственного промотора гена аспартазы на сильные конститутивные промоторы ( $P_{G25}$  и  $P_{A1}$  ) T-нечетных фагов. Экспрессия гена аспартазы *aspA* в составе хромосомы *E. coli* под контролем фаговых промоторов  $G_{25}$  и  $A1$  обеспечила повышение аспартазной активности клеток не менее чем в 28 раз по сравнению с уровнем аспартазной активности клеток родительского штамма.

3. Получение штаммов *E. coli* с делетированными генами фумараз (*fumA*, *fumB*, *fumC*), контролирующих образование яблочной кислоты и изучение их каталитических свойств показало, что для существенного снижения содержания L-яблочной кислоты в реакционной смеси (ниже 4 г/л) при синтезе L-аспарагиновой кислоты достаточным условием является инактивация, по крайней мере, одного гена - *fumC*.

4. Биокатализаторы, созданные на основе модифицированных штаммов *E. coli* с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностями обладают значительным потенциалом для промышленного получения L-аспарагиновой кислоты. По сравнению с промышленным биокатализатором на основе штамма *E. coli* ВКПМ В-7188, новые биокатализаторы обладают в 10 раз более высокой аспартазной активностью (не менее 2000 ед/г БК), повышенной в 7 раз продуктивностью (не менее 1400 г L-ASP/г БК) и сниженной в 10 раз фумаразной активностью (менее 1 ед/г БК). В условиях проточного реактора колонного типа период полуинактивации созданных биокатализаторов превысил 150 суток.

5. Исследование штаммов *Corynebacterium glutamicum* - продуцентов лизина, обладающих аспартазной активностью за счет экспрессии в них гена аспартазы *aspA* из *E. coli* показало, что доступность аспартата не является лимитирующей стадией биосинтеза лизина.

### Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации

1) А.Д. Новиков, **Д.Д. Дербиков**, О.В. Шапошникова, Т.А. Губанова, С.В. Каменева, А.С. Яненко. Высокоэффективная экспрессия гена аспартазы (L-аспартат-аммоний-лиазы) в клетках *Escherichia coli*. Биотехнология, 2014, № 5, С. 19-24.

2) **Д.Д. Дербиков**, А.Д. Новиков, Т.А. Губанова, М.Г. Тарутина, И.Т. Гвилава, Д.М. Бубнов, А.С. Яненко. Синтез аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализаторов штаммов *Escherichia coli* с удаленными генами фумараз. Биотехнология, 2016, Т.32, №5, С. 38-48.

3) А.Д. Новиков, **Д.Д. Дербиков**, Т.А. Губанова, А.С. Яненко. Рекombинантный штамм *Escherichia coli*, обладающий конститутивной аспартазной активностью и способ синтеза L-аспарагиновой кислоты с использованием этого штамма в качестве биокатализатора. Патент РФ №2546239. Выдан 10.04.2015.

4) **Д.Д. Дербиков**, Т.А. Губанова, А.Д. Новиков, Т.В. Юзбашев, А.С. Яненко. Бесплазмидный рекombинантный штамм *Escherichia coli*, обладающий конститутивной аспартазной активностью и способ синтеза L-аспарагиновой кислоты с использованием этого штамма в качестве биокатализатора. Патент РФ №2620942. Выдан 30.05.2017.

5) **Д.Д. Дербиков**, А.Д. Новиков, О.В. Шапошникова, Т.А. Губанова, Т.Е. Леонова, А.С. Яненко. Высокоэффективная экспрессия гена аспартазы в *Escherichia coli*. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 19-22 марта 2013 г.

6) **Д.Д. Дербиков**, А.Д. Новиков, А.С. Яненко. Рекombинантные штаммы *Escherichia coli* – продуценты L-аспарагиновой кислоты. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 20-22 февраля 2017 г.