

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И
СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НАЦИОНАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

Дербиков Денис Дмитриевич

Аспаратат-аммоний-лиазы бактерий: генетическое конструирование штаммов с измененными каталитическими свойствами и их применение в биотехнологии

03.02.07.- генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
Профессор, доктор биологических наук
А. С. Яненко

Москва 2017

Оглавление	
Введение	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
Глава 1. Фермент аспаратат-аммоний лиаза: распространённость и свойства	10
1.1. Биологическое разнообразие аспартаз	11
1.2. Структура фермента.....	13
1.3. Особенности каталитического механизма аспартазы	15
1.3.1. Субстраты и ингибиторы аспартазы.....	15
1.3.2. Активация ионами двухвалентных металлов и субстратом.....	16
1.3.3 Влияние температуры	18
1.3.4. Исследование активного центра фермента	19
1.3.5. Предполагаемый механизм действия	23
1.4. Протеолитическая активация аспартазы из <i>E. coli</i>	24
Глава 2. Применение аспартаз в промышленной биотехнологии	27
2.1. Использование аспартаз в качестве катализатора для получения L-аспарагиновой кислоты	27
2.1.1. Способы получения L-аспарагиновой кислоты.....	30
2.1.2. Пути совершенствования биокатализаторов	35
2.2. Использование аспартазы из <i>Haemophilus influenza</i>	38
2.3. Роль аспартаз в биосинтезе аминокислот	39
Глава 3. Материалы и методы	42
3.1. Бактериальные штаммы, использованные в работе	42
3.2. Плазмидные вектора, использованные в работе	43
3.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе.....	44
3.4. Работа с бактериальными культурами	44
3.4.1. Культивирование бактерий.....	44
3.4.2. Получение электрокомпетентных клеток	44
3.4.3. Трансформация электрокомпетентных клеток.....	45

3.4.4. Конструирование штаммов <i>E. coli</i> с помощью λ Red-зависимой рекомбинации	46
3.5. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами.....	48
3.5.1. Выделение тотальной ДНК.....	48
3.5.2. Выделение плазмидной ДНК.....	48
3.5.3. Выделение РНК.....	49
3.5.4. Очистка фрагментов ДНК.....	49
3.5.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	49
3.5.6. Электрофорез ДНК в агарозном геле	50
3.5.7. Количественная оценка ДНК, РНК.....	50
3.5.8. Рестрикция и лигирование.....	50
3.5.9. Проведение реакции обратной транскрипции, и амплификация ДНК в режиме реального времени.....	51
3.5.10. Секвенирование фрагментов ДНК.....	51
3.6. Манипуляции с белками.....	52
3.6.1. Измерение количества белка	52
3.6.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.....	52
3.7. Определение аспартазной активности	52
3.8. Определение константы Михаэлиса	54
3.9. Определение содержания органических кислот методом ВЭЖХ.....	55
3.10. Иммуобилизация клеток <i>E. coli</i>	55
3.11. Биоинформатические методы	56
Глава 4. Результаты и обсуждение.....	57
4.1. Клонирование и экспрессия генов аспартаз из различных источников. Сравнительное исследование каталитических свойств разных аспартаз.....	57
4.1.1. Клонирование и секвенирование гена аспартазы из <i>Escherichia coli</i> ВКПМ В-7188	57
4.1.2. Клонирование гена аспартазы из <i>Bacillus sp.</i> YM55-1	59

4.1.3. Клонирование гена аспартазы из <i>Corynebacterium glutamicum</i>	60
4.1.4. Сравнительное исследование генов аспартаз из <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus sp.</i> YM55-1 и <i>Corynebacterium glutamicum</i>	61
4.1.5. Экспрессия генов аспартаз в клетках <i>E. coli</i> и их сравнительный анализ	64
4.2. Разработка генетических подходов к повышению аспартазной активности штамма <i>Escherichia coli</i> с использованием методов биоинженерии	70
4.2.1. Амплификация гена аспартазы в составе мультикопийных экспрессионных плазмид	70
4.2.2. Усиление экспрессии гена аспартазы в составе хромосомы за счет замены собственного промотора на сильный промотор.....	75
4.2.3. Получение мутантных вариантов аспартазы с измененным уровнем активности.....	77
4.3. Получение штаммов <i>Escherichia coli</i> с делетированными генами фумараз и изучение их каталитических свойств.....	80
4.3.1. Получение штаммов <i>Escherichia coli</i> с удаленными генами фумараз.....	81
4.3.2. Рост штаммов с удаленными генами фумараз.....	84
4.3.3. Транскрипционный анализ штаммов с удаленными генами фумараз	84
4.3.4. Синтез L-аспарагиновой кислоты с использованием полученных штаммов.....	86
4.4. Создание промышленных биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты на основе штаммов <i>Escherichia coli</i> с высокой аспартазной и сниженной фумаразной активностями	89
4.4.1. Создание штаммов для промышленных биокатализаторов	89
4.4.2. Рост и аспартазная активность полученных штаммов.....	90
4.4.3. Биосинтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония с использованием штаммов D12 P _{G25} -aspA ΔfumC(CS) и D13 P _{G25} -aspA ΔfumAC(CS).	91
4.4.4. Нарботка биомассы штаммов в лабораторном ферментере и получение иммобилизованной формы биокатализаторов BD12 и BD13	93
4.4.5. Изучение каталитических свойств промышленных форм иммобилизованных биокатализаторов.....	94

4.5. Модификация аспартазной активности у <i>Corynebacterium glutamicum</i> и оценка их влияния на биосинтез лизина.....	96
4.5.1. Конструирование плазмиды для экспрессии гена <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> в штаммах <i>Corynebacterium glutamicum</i>	96
4.5.2. Рост и аспартазная активность штамма <i>C. glutamicum</i> H115 pDL-4.....	97
4.5.3. Уровень синтеза лизина в штамме <i>C. glutamicum</i> H115 с повышенной аспартазной активностью	98
Заключение.....	101
Выводы	106
Список сокращений, использованных в работе.....	107
Список использованной литературы	108
Приложение А.....	117
Благодарности	123

Введение

Использование микроорганизмов и их ферментов для экологически безопасного получения различных химических веществ является одним из приоритетных направлений развития биотехнологии [Комплексная программа развития биотехнологий в РФ, 2012]. Аминокислоты, получаемые с помощью микробиологического синтеза или биокатализа, являются одним из важнейших продуктов промышленной биотехнологии. Они широко востребованы в медицине, пищевой и кормовой промышленности, сельском хозяйстве. На сегодняшний день в мире в промышленных масштабах с помощью микробиологического синтеза получают целый ряд аминокислот – лизин, треонин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и другие [Grunwald P., 2015]. По данным консалтингового агентства Global Industry Analysts, объемы производства аминокислот в мире к 2022 году увеличатся на 53%, что составит 10 млн. тонн [Берегатнова Е.В., 2017]. Главное преимущество микробиологического синтеза 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 при мягких условиях (нормальной температуре и давлении, в водной среде), что делает его экологически безопаснее традиционных химических процессов [Patel R.N., 2013]. Несмотря на значительный прогресс в биотехнологиях получения аминокислот, сохраняется актуальность проведения работ по совершенствованию штаммов, применяемых для их получения.

Бактериальный фермент аспарат-аммоний-лиаза, катализирующий реакцию аминирования фумарата или дезаминирования аспарагиновой кислоты, обладает значительным потенциалом применения в биотехнологиях получения аминокислот. Прежде всего, этот фермент используется для получения L-аспарагиновой кислоты, которая дальше применяется в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине [Flickinger M.C. et al., 1999]. Кроме того, активность этого фермента оказывает влияние на содержание в клетке аспарагиновой кислоты, являющейся предшественником синтеза аминокислот аспарагинового семейства – лизина, треонина, метионина – незаменимых аминокислот, активно применяемых в животноводстве, а также для парентерального питания человека.

Несмотря на значительную востребованность ферментов аспарат-аммоний-лиаз в промышленности, они изучены явно недостаточно. Охарактеризованы гены аспартаз из разных источников, однако до сих пор не ясны механизмы регуляции экспрессии этих генов. Ранее, для повышения аспартазной активности штаммов были использованы как традиционные подходы [Синолицкий М.К. и др., 2001], так и молекулярно-генетические

[Mukouyama M. et al., 2001]. Однако эти подходы обладали существенными недостатками: слабое увеличение аспартазной активности, высокая нестабильность плазмидных штаммов и наличие в них трансмиссивных элементов, что ограничивает использование этих штаммов в промышленности.

Данная работа посвящена исследованию бактериальных аспартаз из *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* и *Corynebacterium glutamicum* и их применению в биотехнологических процессах. Современные технологии конструирования, использованные в данной работе, позволили получить штаммы с высоким уровнем аспартазной активности и низким уровнем побочной активности, обладающие высокой стабильностью, которые нашли применение при разработке новых, биотехнологических процессов получения аминокислот.

Цель работы:

Сравнительное исследование ферментов аспаратат-аммоний-лиаз 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 L-яблочной кислоты – побочного продукта при синтезе L-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 их влияния на биосинтез лизина.

Научная новизна и практическая значимость:

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 получены производные штаммов *E. coli* MG1655 с удаленными генами фумараз – *fumA*, *fumB* и *fumC* с помощью λ Red-зависимой системы рекомбинации, 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.

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 (ОМЭК) 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 является достаточным утрата двух генов *fumA* и *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 в 10 раз активность биокатализаторов, не менее 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.

История изучения аспартаз насчитывает уже более 90 лет. В 20-х годах XX века было показано, что в покоящихся клетках бактерий существует равновесие между L-аспаратом, фумаратом и аммиаком [Quastel J.H. et al., 1926]. В дальнейшем было показано, что в дезаминировании аспарагиновой кислоты участвует фермент, названный позднее аспартазой [Woolf B., 1929]. В последующих исследованиях были определены скорость образования фумарата и иона аммония при различных условиях, а также константа равновесия этой реакции [Jacobsohn K.P. et al., 1936]. Также впервые были получены бесклеточные экстракты из *Pseudomonas fluorescens*, способные катализировать синтез L-аспарагиновой кислоты [Virtanen A.I. et al., 1932].

В данной главе будут рассмотрены основные характеристики этого фермента, а также биологическое разнообразие и особенности каталитического действия.

1.1. Биологическое разнообразие аспартаз

Аспартазы обнаружены в клетках многих видов микроорганизмов. Они были охарактеризованы и изолированы из различных грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая *Pseudomonas fluorescens* [Takagi J.S. et al., 1986], *Hafnia alvei* [Yoon M.Y., 2000], *Cytophaga sp.* [Kazuoka T. et al., 2003], *Escherichia coli* [Wang L.J. et al., 2000], *Bacillus subtilis* [Sun D.X. et al., 1991] и др. В то же время в научной литературе отсутствуют сведения о наличии аспартаз в клетках млекопитающих и высших растений.

Микробные аспартазы обладают высоким уровнем разнообразия как на геномном, так и белковом уровнях. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов аспартаз из различных источников, представленных в GeneBank NCBI, показывает, что уровень идентичности нуклеотидов между генами из различных источников может не превышать 25%. На уровне аминокислотных последовательностей идентичность между аминокислотами у ферментов из различных источников также не превышает 25%. Несмотря на низкий уровень гомологии, в генах обнаруживаются высококонсервативные участки, содержащие идентичные аминокислоты, характерные для всех изученных аспартаз. Предполагается, что некоторые аминокислотные остатки из этих областей формируют каталитический центр фермента (Рисунок 1.2):

Alcaligenes faecalis	(97)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerThrAsnMetAsnAlaAsnGluValIleCysAsnLeuAlaLeuGluHisMetGlyHisLysArgGlyGluTyrGlnTyrLeuHisPro	(132)
Bacillus sp. YM55-1	(96)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerIleAsnMetAsnAlaAsnGluValIleAlaAsnArgAlaLeuGluLeuMetGlyGluGluLysGlyAsnTyrSerLysIleSerPro	(131)
Bacillus subtilis 168	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerMetAsnMetAsnAlaAsnGluValIleGlyAsnArgAlaLeuGluIleMetGlyHisLysLysGlyAspTyrIleHisLeuSerPro	(134)
Brevibacterium flavum ZL-1	(150)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerLeuAsnMetAsnThrAsnGluValValAlaAsnLeuAlaLeuGluPheLeuGlyHisGluLysGlyGluTyrHisIleLeuHisPro	(185)
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	(150)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerLeuAsnMetAsnThrAsnGluValValAlaAsnLeuAlaLeuGluPheLeuGlyHisGluLysGlyGluTyrHisIleLeuHisPro	(185)
Escherichia coli K-12 DH10B	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerValAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Escherichia coli K12 W3110	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerValAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Escherichia coli MGI655	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerValAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Escherichia coli W	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerValAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Hafnia alvei	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerValAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Lactobacillus plantarum JDM1	(92)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerAlaAsnMetAsnValAsnGluValValAlaAsn-----LeuAlaHisArgLeuMetProAlaValAlaValHisPro	(122)
Pseudomonas fluorescens F113	(100)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerThrAsnMetAsnAlaAsnGluValIleAlaAsnIleAlaLeuGluAlaMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuHisPro	(135)
Rhodococcus erythropolis PR4	(97)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerThrAsnMetAsnAlaAsnGluValIleAlaAsnArgAlaLeuGluIleLeuGlyHisGlnArgGlyAspTyrGluArgLeuHisPro	(132)
Salmonella enterica Typhi CT18	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerValAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Serratia marcescens FGI94	(99)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerLeuAsnMetAsnThrAsnGluValLeuAlaAsnIleGlyLeuGluLeuMetGlyHisGlnLysGlyGluTyrGlnTyrLeuAsnPro	(134)
Wolinella succinogenes	(97)	GlnGlyGlyAlaGlyThrSerThrAsnMetAsnAlaAsnGluValIleAlaAsnValAlaLeuGluLeuMetGlyHisLysLysGlyGluTyrLysHisCysHisPro	(132)
Alcaligenes faecalis	(289)	CAGGGCGGGCGCAGGTACCTCGACCAATATGAAATGCCAACGAGGTTATTTGTAACCTGGCCCTTGGACATATGGGTCACAAGCGCGCGGAGTATCAATATCTTCACCCC	(396)
Bacillus sp. YM55-1	(634)	CAAGGCGGGGCAAGAACTTCCATTAATATGAATGCAAAATGAAGTGATTGTCTAACCCGCGCATTAGAAATTAATGGGAGAGGAAAAAGGAACTATTCAAAAATTAGTCCA	(741)
Bacillus subtilis 168	(295)	CAGGGCGGTGCCGGAACCTTCTATGAACATGAACCGGAAATGAGGTTATCGGAAAACCGGGCGCTTGAATCATGGGACATAAAAAGGAGATTATATCCATTTAAGTCCA	(402)
Brevibacterium flavum ZL-1	(448)	CAGGGTGGCGCAGGTACCTCACTGAACATGAACACCAACGAGGTTGTTGCCAACCTTGCACCTTGAGTTCTTAGGCCATGAAAAGGCGGAGTACCACATCCTGCACCCC	(555)
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	(448)	CAGGGTGGCGCAGGTACCTCACTGAACATGAACACCAACGAGGTTGTTGCCAACCTTGCACCTTGAGTTCTTAGGCCATGAAAAGGCGGAGTACCACATCCTGCACCCC	(555)
Escherichia coli K-12 DH10B	(295)	CAGGGCGGGCGCAGGTACTTCCGTAACATGAACACCAACGAAAGTGTGGCCAAATATCGGTCTGGAAGTACTGATGGGTCACCAAAAAGGTGAATATCAGTACCTGAACCCG	(402)
Escherichia coli K12 W3110	(295)	CAGGGCGGGCGCAGGTACTTCCGTAACATGAACACCAACGAAAGTGTGGCCAAATATCGGTCTGGAAGTACTGATGGGTCACCAAAAAGGTGAATATCAGTACCTGAACCCG	(402)
Escherichia coli MGI655	(295)	CAGGGCGGGCGCAGGTACTTCCGTAACATGAACACCAACGAAAGTGTGGCCAAATATCGGTCTGGAAGTACTGATGGGTCACCAAAAAGGTGAATATCAGTACCTGAACCCG	(402)
Escherichia coli W	(295)	CAGGGCGGGCGCAGGTACTTCCGTAACATGAACACCAACGAAAGTGTGGCCAAATATCGGTCTGGAAGTACTGATGGGTCACCAAAAAGGTGAATATCAGTACCTGAACCCG	(402)
Hafnia alvei	(295)	CAGGGTGGTGCAAGGTACTTCCGTTAATATGAACACCAACGAAAGTGTGGCCAAATATCGGTCTGGAAGTACTGATGGGTCACCAAAAAGGTGAATATCAATACCTGAACCCG	(402)
Lactobacillus plantarum JDM1	(274)	CAGGGGGTGTGGGACCTCGGCTAACATGAACGCTCAATGAAGTGGTGGCTAAT-----TTGGCTCACCGATTGATGCCGCGAGTTGCCGTTTCATCCC	(366)
Pseudomonas fluorescens F113	(298)	CAGGGCGGGCGCCGCGCAGCTCGACCAACATGAATGCCAACGAAAGTCAATCGCCAAATCATCGCCGCTGGAGGCCATGGGCCACCAGAAAGGCGGAGTACCAGTACCTGCACCCC	(405)
Rhodococcus erythropolis PR4	(289)	CAGGGTGGTGCCGGAACGCTCGACGAACATGAATGCCAACGAGGTAATCGCCAAATCGCGCATGGGAAATCCTCGGCCACCAGCGCGGCGACTACGAACGACTTCACCCC	(396)
Salmonella enterica Typhi CT18	(295)	CAGGGCGGGCGGGCAGTTCCTGCAACATGAATACCAACGAAAGTGTGGCCAAATCATCGGCTGGAAGTACTGATGGGTCATCAGAAAAGGTGAATATCAGTACCTGAACCCG	(402)
Serratia marcescens FGI94	(295)	CAGGGCGGGCGGGCAGTTCCTGCAACATGAATGCCAACGAAAGTGTGGCCAAATCATCGGCTGGAAGTACTGATGGGTCATCAGAAAAGGGAATATCAGTACCTGAACCCG	(402)
Wolinella succinogenes	(289)	CAAGGAGGCGCTGGAACCTCACCAACATGAACGCGCAATGAAGTGATCGCCAACTCGCAGCTTGAGCTCATGGGACATAAAAAGGGTGAATATAACATTTGCCACCCC	(396)

Рисунок 1.2. Сравнение участка аминокислотных и нуклеотидных последовательностей аспартаз из различных микроорганизмов. Желтым цветом обозначены консервативные позиции в последовательности.

1.2. Структура фермента

Все описанные в литературе аспартазы являются тетрамерами, состоящими из 4 одинаковых субъединиц с молекулярной массой около 51-57 кДа [Kawata Y. et al., 1999] [Gou X.J. et al., 2004]. Размер одной субъединицы аспартазы может варьировать от 468 до 526 аминокислот. В присутствии 0,4 М гуанидина гидрохлорида, аспартаза из *E. coli* обратимо диссоциирует на отдельные субъединицы [Murase S. et al., 1993]. Наличие ферментной активности у отдельных субъединиц не обнаруживается, хотя димеры сохраняют 45% своей нативной активности.

В связи с тем, что степень идентичности между аспартазами, выделенными из различных микроорганизмов очень низка, субъединицы, принадлежащие разным аспартазам не могут образовывать гибридных тетрамеров [Yumoto N. et al., 1992].

Разработка способов выделения аспартаз из бактериальных клеток и достижение высокой степени очистки фермента позволило получить аспартазу в виде кристаллов и использовать рентгеноструктурный анализ для изучения структуры фермента [Shi W. et al., 1993]. Для разрешения структуры аспартаз из *E. coli* и *Bacillus sp* YM55-1 были использованы полученные ранее результаты по структуре фумаразы FumC, которая относится к тому же суперсемейству ферментов [Weaver T.M. et al., 1993].

Структура аспартаз из *E. coli* и из *Bacillus sp*. YM55-1 представлена на Рисунке 1.3. Оба фермента состоят из 4 одинаковых субъединиц и имеют схожую структуру. Все 4 субъединицы вместе обладают вращательной симметрией.

Каждая субъединица фермента состоит из 3 доменов (Рисунок 1.4.). Первый, N-терминальный домен состоит из примерно 140 аминокислотных остатков и включает в себя 2 скрученных антипараллельных β -слоя и 5 спиралей. Спирали 1 и 4 располагаются антипараллельно друг другу. Спирали 2 и 3 также антипараллельны друг другу, при этом они расположены почти перпендикулярно к паре спиралей 1-4. Спираль 5 располагается в конце этого домена.

Второй домен в обоих ферментах состоит из примерно 250 аминокислотных остатков. Центр домена составлен из 6 α -спиралей, которые слегка изогнуты и параллельны друг другу. Длина спиралей варьирует от 25 до 38 остатков. Соединение между спиральями осуществляется с помощью 2 длинных петель, делающих эту часть очень подвижной. Также, этот домен содержит так называемую SS-петлю, которая играет важную роль в каталитическом акте. Примечательно, что в этом домене содержится более половины консервативных аминокислотных остатков в составе семейства аспартаз-фумараз.

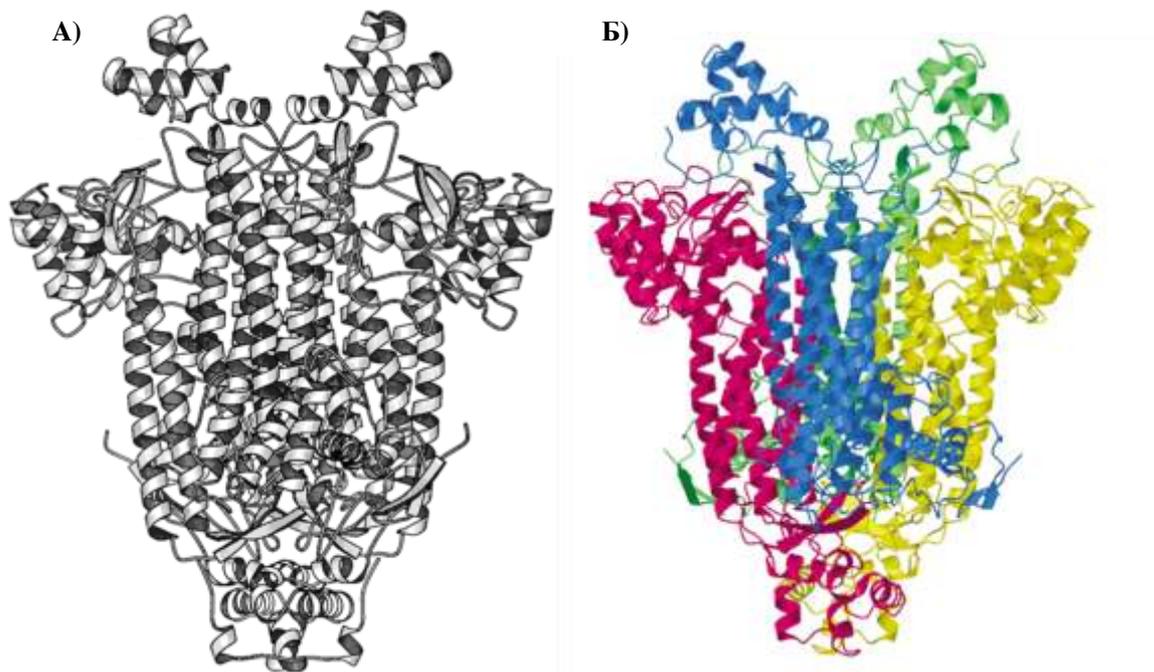


Рисунок 1.3. Структура аспартазы из *Escherichia coli* (А) [Shi W. et al., 1997] и *Bacillus sp.* YM55-1 (Б) [Fujii T. et al, 2003]. Разными цветами выделены отдельные субъединицы аспартазы.

Третий домен является самым маленьким и включает в себя примерно 70-80 аминокислотных остатков. Домен состоит преимущественно из 2 мотивов спираль-поворот-спираль, ориентированных примерно 90 градусов относительно друг друга.

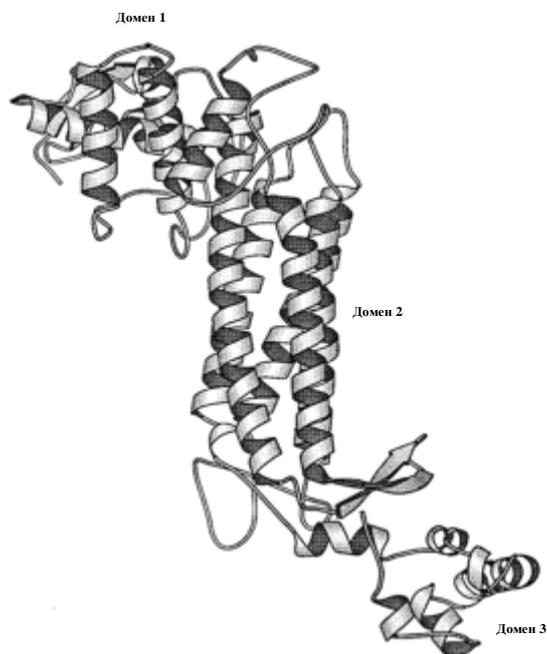


Рисунок 1.4. Структура отдельной субъединицы аспартазы из *E. coli* [Shi W. et al., 1997]

1.3. Особенности каталитического механизма аспартазы

1.3.1. Субстраты и ингибиторы аспартазы

Аспартазы обладают экстремально высокой специфичностью к субстрату – L-аспарагиновой кислоте. Несмотря на многочисленные исследования, не удалось идентифицировать альтернативные субстраты для аспартаз. Аспартазы не проявляют активности с D-аспарагиновой кислотой, кротоновой кислотой [Virtanen A.I. et al., 1955], глутамином, глицином, аланином, малеиновой кислотой [Quastel J.H. et al., 1926], а также другими структурно-подобными соединениями. В работе Emery T. [Emery T.F., 1963] было обнаружено, что, помимо аммония, гидроксилламин может являться альтернативным субстратом для аспартазы из *B. cadaveris*. Частично очищенная аспартаза из *B. cadaveris* способна катализировать присоединение гидроксилламина к фумаровой кислоте с образованием N-гидроксиаспарагиновой кислоты. При этом, следует отметить, что гидроксилламин полностью блокирует реакцию аспартазы с аспарагиновой кислотой. Аспартаза AspB из *Bacillus sp.* YM55-1 также способна катализировать синтез N-замещенных производных аспарагиновой кислоты [Weiner B. et al., 2008]. При добавлении к фумаровой кислоте гидроксилламина, гидразина, метоксилламина или метиламина в присутствии аспартазы образуются N-гидроксиаспарагиновая кислота, 2-гидразиоантарная кислота, N-метоксиаспарагиновая кислота или N-метиласпарагиновая кислота, соответственно. При этом авторы отмечают, что аспартаза AspB обладает более высокой активностью в отношении гидроксилламина и гидразина по сравнению с метоксилламином и метиламином.

Активность аспартазы из *E. coli* в отношении β -полуальдегида аспартата была изучена в работе [Schindler J.F. et al., 1994]. При инкубации фермента с β -полуальдегидом аспартата наблюдается его необратимая инактивация. Оказалось, что аспартаза катализирует дезаминирование β -полуальдегида аспартата с образованием аммиака и полуальдегида фумаровой кислоты, который и вызывает инактивацию фермента.

Проверка различных соединений в качестве субстратов аспартазы выявило большое число соединений, ингибирующих её активность [Falzone C.J. et al., 1988]. Ингибиторами аспартазы являются L- и D-малат, сукцинат и их производные (Таблица 1.1).

Из таблицы видно, что для связывания ингибитора с активным сайтом фермента требуется карбоксильная или аналогично заряженная группа в позиции C-1 и C-4.

Таблица 1.1. Ингибиторы аспартазы [Falzone C.J. et al., 1988]

Structure ^a			
Substrate Analog	R ₁	R ₂	K _i (mM)
O-phospho-D-serine	NH ₃ ⁺	OPO ₃ ²⁻	0,20
D-malate	OH	COO ⁻	0,66
DL-2-amino-3-phosphonopropionate	NH ₃ ⁺	PO ₃ ²⁻	0,66
3-nitropropionate	H	NO ₂	0,83
2,3-diphosphoglycerate	OPO ₃ ²⁻	OPO ₃ ²⁻	1,1
mercaptosuccinate	SH	COO ⁻	1,6
L-2-chlorosuccinate	Cl	COO ⁻	1,7
DL-2-bromosuccinate	Br	COO ⁻	2,3
DL-2-amino-4-phosphonobutyrate	NH ₃ ⁺	CH ₂ PO ₃ ²⁻	2,4
D-2-methylmalate ^b	OH	COO ⁻	3,7
2-hydroxy-3-nitropropionate	OH	NO ₂	6,7
N-acetyl-L-aspartate	NHC(=O)CH ₃	COO ⁻	6,7
(l-aminopropyl)phosphonate ^c	NH ₃ ⁺	CH ₃ ⁺	17
β-aspartylhydrazine	NH ₃ ⁺	C(=O)NHNH ₂	18
methylsuccinate	CH ₃ ⁺	COO ⁻	23
phosphoglycolate	H	OPO ₃ ²⁻	23
succinate	H	COO ⁻	24
L-malate	OH	COO ⁻	31
(aminomethyl)phosphonate	NH ₃ ⁺	^d	33
(3-aminopropyl)phosphonate ^e	NH ₃ ⁺	CH ₂ PO ₃ ²⁻	36

^a Структурная формула - R₂CH₂CH(R₁)COO⁻ ; ^bα-протон замещен на α-метильную группу; ^cα-карбонильная группа замещена на α-фосфонат; ^d-CH₂COO⁻ фрагмент цепи замещен на PO₃²⁻; ^eα-карбоксил замещен на протон.

В роли ингибиторов аспартазы могут выступать такие соединения как цитрат, EDTA и пирофосфат [Ellfolk N., 1953]. Это объясняется их способностью хелатировать ионы двухвалентных металлов: при добавлении избытка ионов вместе с цитратом ингибирование аспартазы снимается.

1.3.2. Активация ионами двухвалентных металлов и субстратом

Влияние ионов двухвалентных металлов на фермент аспартазу впервые было продемонстрировано в работе Ichihara K. [Ichihara K. et al., 1955]. При добавлении ионов Co²⁺ к неактивной очищенной аспартазе наблюдается восстановление активности фермента.

Добавление других ионов (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) восстанавливает активность гораздо менее эффективно.

Активность аспартазы из *E. coli* при щелочных значениях pH увеличивается в присутствии ионов двухвалентных металлов [Falzone C.J. et al., 1988]. Например, ионы магния MgCl_2 в концентрации 2 мМ при низкой концентрации субстрата повышают активность аспартазы в 8 раз [Suzuki S. et al., 1973]. Ионы многих других двухвалентных металлов также являются эффективными активаторами аспартазы (Таблица 1.2.):

Таблица 1.2. Активация аспартазы из *E. coli* с помощью ионов двухвалентных металлов [Falzone C.J. et al., 1988]

Ион металла	Константа активации, K_a (μМ)
Zn	$0,21 \pm 0,04$
Cd	$0,7 \pm 0,5$
Mn	$0,8 \pm 0,4$
Co	$2,0 \pm 0,3$
Mg	$4,9 \pm 2,4$
Ca	19 ± 4

Необходимо отметить, что влияние ионов двухвалентных металлов зависит от значений pH. При высоких значениях pH наличие ионов двухвалентных металлов в реакционной смеси является обязательным условием для проявления активности аспартазы из *E. coli* [Rudolph F.B. et al., 1971]. В то же время, при низких значениях pH, даже в отсутствие ионов двухвалентных металлов, наблюдается некоторый уровень аспартазной активности [Suzuki S. et al., 1973].

Активность аспартазы из *Hafnia alvei* также увеличивается в присутствии ионов двухвалентных металлов [Wilkinson J.S. et al., 1961]. Однако в отличие от аспартазы из *E. coli*, аспартаза из *Hafnia alvei* не активируется ионами Ca^{2+} , а ионы Zn^{2+} и Co^{2+} обладают слабой активирующей способностью [Nuiry I.I. et al., 1984]. В исследовании Yoon M. [Yoon M.Y. et al., 1998] было показано, что увеличение концентрации Zn^{2+} и Co^{2+} в среде оказывает отрицательное действие на активность аспартазы из *Hafnia alvei* (Таблица 1.3):

Долгое время считалось, что роль двухвалентных ионов при действии на аспартазу заключается во взаимодействии с β-карбоксильной группой субстрата [Nuiry I.I. et al., 1984]. Однако в последующем ЯМР-исследовании было показано, что молекула аспартазы, помимо

сайта связывания с субстратом, содержит отдельный сайт для связывания с аспарагиновой кислотой, которая является активатором фермента [Falzone C.J. et al., 1988].

Таблица 1.3. Эффект двухвалентных катионов на аспартазную активность *Hafnia alvei* [Yoon M.Y. et al., 1998]

Ион металла	Относительная ферментная активность, %
Mg ²⁺ (5 мМ)	90
Mg ²⁺ (10 мМ)	100
Mn ²⁺ (1 мМ)	90
Mn ²⁺ (3 мМ)	100
Ca ²⁺ (2 мМ)	100
Ca ²⁺ (10 мМ)	82
Zn ²⁺ (0,2 мкМ)	100
Zn ²⁺ (0,5 мкМ)	60

Следует отметить, что фумараза С, относящаяся к тому же суперсемейству ферментов, что и аспартаза, также активируется высокими концентрациями субстрата - яблочной кислоты [Weaver T., 2005] [Mescam M. et al., 2011]. По-видимому, субстратная активация является характерной особенностью ферментов этого суперсемейства. Исключением из этого правила является аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1, которой не требуются ионы Mg²⁺ при щелочных значениях рН и которая не активируется L-аспарагиновой кислотой [Kawata Y. et al., 1999].

1.3.3 Влияние температуры

Аспартазы сохраняют активность в широком интервале температур. Максимальная активность аспартазы из *E. coli* наблюдается при 55°C, а аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1 – при 65°C (Рисунок 1.5.). В исследовании Yoon M [Yoon M.Y. et al., 1998] показано, что максимальная активность аспартазы из *Hafnia alvei* наблюдается при 45°C. При температуре выше 70°C все известные аспартазы утрачивают свою активность.

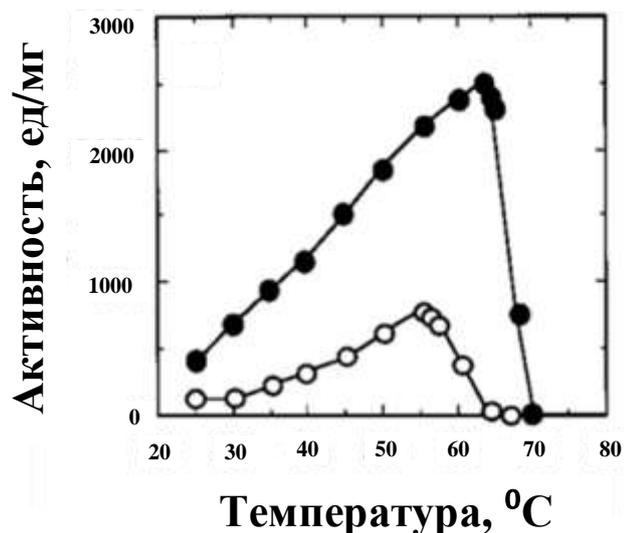


Рисунок 1.5. Активность аспартаз при различных температурах. ● - *Bacillus sp.* YM55-1; ○ – *E. coli*. [Kawata Y. et al., 1999]

Аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1 обладает также более высокой термостабильностью по сравнению с аспартазой из *E. coli* (Рисунок 1.6.). После 60 мин инкубирования при 55°C, аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1 сохраняла около 80% активности, в то время как фермент из *E. coli* полностью утрачивал свою активность уже через 30 минут инкубирования при тех же условиях.

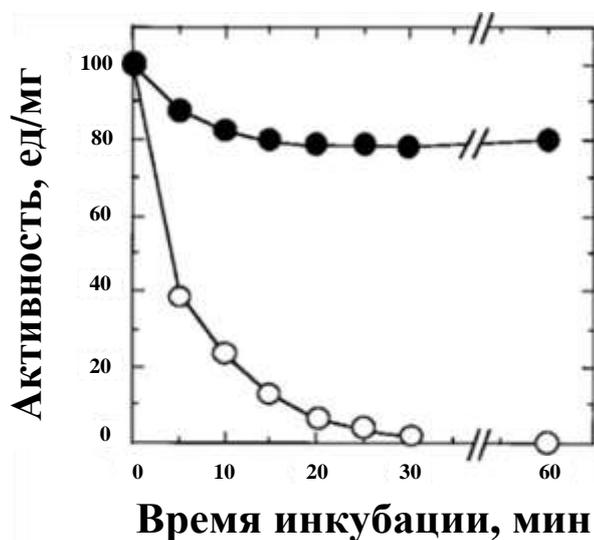


Рисунок 1.6. Стабильность аспартаз в условиях температурной денатурации. ● - *Bacillus sp.* YM55-1; ○ – *E. coli*. [Kawata Y. et al., 1999]

1.3.4. Исследование активного центра фермента

Исследование структуры активного центра аспартазы важно для понимания процесса ферментативного катализа. Именно поэтому были проведены многочисленные исследования,

направленные на выявление аминокислотных остатков, входящих в активный сайт фермента. Эти работы привели к идентификации ряда аминокислот, которые, как полагают, играют решающую роль в каталитическом механизме аспартазы.

Для определения аминокислотных остатков, входящих в активный сайт фермента, использовались различные методики, в том числе химические модификации аминокислот и сайт-направленный мутагенез. Для оценки влияния вводимых в фермент модификаций, проводилось изучение кинетических характеристик модифицированных вариантов ферментов, в том числе и константа Михаэлиса, кинетическая константа и субстратная специфичность.

Обработка аспартазы из *E. coli* реагентами, модифицирующими сульфгидрильные группы (N-этилмалеимид или реактив Элмана) приводила к полной потере каталитической активности [Mizuta K. et al., 1975]. Также, обработка аспартазы DACM - флуоресцентным реагентом на сульфгидрильные группы, приводила к инактивации фермента [Ida N., et al. 1985]. Эти результаты дали основание предполагать, что в каталитическом процессе участвуют остатки цистеина, которых в ферменте из *E. coli* насчитывается 11. Последующий ВЭЖХ-анализ пептидов, полученных обработкой аспартазы трипсином, позволил предположить, что Cys-141 и Cys-431 являются остатками, участвующими в связывании с аспарагиновой кислотой. При добавлении аспарагиновой кислоты эти цистеины не модифицируются DACM.

Однако сайт-направленный мутагенез показал, что замена C141S никак не влияет на каталитические свойства аспартазы [Giorgianni F. et al., 1997]. Это говорит о том, что Cys-141 находится в доступном месте для модификации субстратным аналогом, но напрямую участия в катализе не принимает.

Также сайт-направленный мутагенез кодона Cys-431, показал, что этот остаток не вовлечен в каталитический акт [Murase S. et al., 1991]. У полученного мутанта C431W аспартазная активность сохранялась, однако была отмечена более высокая субстратная специфичность и более сильная зависимость от ионов двухвалентных металлов.

Еще одним цистеиновым остатком, который предположительно может участвовать в каталитическом акте, является Cys-390. Для проверки роли этой сульфгидрильной группы на каталитическую активность аспартазы были получены мутанты C390S и C390A [Saribas A.S. et al., 1994]. Однако эти мутанты сохраняли активность и каталитические характеристики нативного фермента. В последующем исследовании проводили замещение каждого из 11 цистеинов, находящихся в аспартазе из *E. coli* [Chen H.H. et al., 1996] При этом, только в одном случае наблюдалось незначительное изменение в кинетических характеристиках

фермента. Эти данные в совокупности наглядно показывают, что цистеиновые остатки не участвуют в каталитическом акте. По-видимому, их роль заключается в связывании с L-аспарагиновой кислотой, которая активирует фермент.

Добавление к очищенной аспартазе диэтилпиروкарбоната (DEPC), который модифицирует остаток гистидина, приводило к ингибированию активности фермента [Ida N. et al., 1984]. Последующая обработка неактивного фермента гидроксиламином (NH_2OH) восстанавливала активность фермента. Однако из 8 гистидинов, имеющих в составе аспартазы, только один, His-124, является консервативным для всех известных на тот момент аспартаз. Изучение свойств мутанта H124L не выявило его отличий от исходного фермента. Обработка полученного мутанта DEPC показала, что фермент обладает такой же чувствительностью, как и нативный фермент. В дальнейшем были получены аналогичные замены для всех 8 гистидинов, входящих в состав аспартазы. Только 2 из полученных мутантов показали небольшое снижение аспартазной активности [Chen H.H. et al., 1997], что не позволило сделать вывод об участии гистидиновых остатков в активном центре.

При выдерживании аспартазы с орто-фталальдегидом наблюдается корреляция с потерей ферментной активности и изменениями в поглощении в флуоресцентном спектре фермента [Viola R.E. et al., 2000]. При уменьшении активности фермента поглощение при 377 нм повышается, а также появляется пик флуоресценции при 420 нм. Эти изменения характерны для образования изоиндольного кольца, которое возникает при модификации находящихся рядом остатков лизина и цистеина. При добавлении избытка фумарата, α -метиласпартата (активатор) и ионов Mg^{2+} наблюдается полная защита от инактивации. При этом, при удалении хотя бы одного компонента опять возникает инактивация. Это наблюдение предполагает, что вблизи одного из ранее охарактеризованных цистеинов находится лизиновый остаток, участвующий в катализе.

Роль остатков лизина в каталитическом процессе также была изучена с помощью сайт направленного мутагенеза. Аспартаза из *E. coli* содержит 27 остатков лизина. Из них только два, Lys-55 и Lys-327, являются полностью консервативными в семействе аспартаз/фумараз. При этом Lys-327 расположен в высококонсервативной области (Рисунок 1.7).

Specis/enzyme	327																			
<i>EcAspA</i>	E	L	Q	A	G	S	S	I	M	P	A	K	V	N	P	V	V	P	E	V
<i>PfAspA</i>	A	R	Q	P	G	S	S	I	M	P	G	K	V	N	P	V	I	P	E	A
<i>BsAspA</i>	A	R	Q	P	G	S	S	I	M	P	G	K	V	N	P	V	M	A	E	L
<i>EcFumC</i>	E	N	E	P	G	S	S	I	M	P	G	K	V	N	P	T	Q	C	E	A
<i>RatFum</i>	E	N	E	P	G	S	S	I	M	P	G	K	V	N	P	T	Q	C	E	A
<i>HumFum</i>	E	N	E	P	G	S	S	I	M	P	G	K	V	N	P	T	Q	C	E	A
<i>YeaArs</i>	A	Y	S	T	G	S	S	L	M	P	Q	K	K	N	A	D	S	L	E	L
<i>HumArs</i>	A	Y	S	T	G	S	S	L	M	P	Q	K	K	N	P	D	S	L	E	L
<i>DkDcII</i>	A	Y	S	T	G	S	S	L	M	P	Q	K	K	N	P	D	S	L	E	L
<i>CkDII</i>	A	Y	S	T	G	S	S	L	L	P	Q	K	K	N	P	D	S	L	E	L
<i>BsAdl</i>	K	G	Q	K	G	S	S	A	M	P	H	K	R	N	P	I	G	S	E	N
<i>HumAdl</i>	K	D	Q	I	G	S	S	A	M	P	Y	K	R	N	P	M	R	S	E	R
<i>PpPcab</i>	P	G	K	G	G	S	S	T	M	P	H	K	R	N	P	V	G	A	A	V

Рисунок 1.7. Высококонсервативные регионы в суперсемействе аспартаз/фумараз [Saribas A.S. et al., 1994]. Виды: *Ec* – *Escherichia coli*; *Pf* – *Pseudomonas fluorescens*; *Bs* – *Bacillus subtilis*; *Rat* – крыса; *Hum* – человек; *Ya* – дрожжи; *Dk* – утка; *Ck* – цыпленок; *Pp* – *Pseudomonas putida*. Ферменты: *AspA* – аспартаза; *Fum* – фумараза; *Ars* – аргининосукцинат лиаза; *DcII* – δ -кристаллин II; *Adl* – аденилосукцинат лиаза; *Pcab* -карбоксимуконат циклоизомераза. Желтым цветом выделены области, идентичные между аспартазой из *E. coli* и другими членами семейства аспартаз/фумараз. Синим цветом выделены области, являющиеся идентичными среди функционально связанных подсемейств фумараз, аргининосукциназ и δ -кристаллинов. Жирным выделен остаток лизина, входящий в активный сайт

Мутант, у которого Lys-327 был заменен на аргинин, обладал низкой активностью. При этом мутантный белок обладал сходной с нативным ферментом афинностью по отношению к сорбенту, применяемому для хроматографии. Однако, в отличие от нативного фермента, мутантный белок не удавалось смыть с колонки с помощью раствора L-аспарагиновой кислоты. Очищенный мутантный белок обладал низкой аспартазной активностью (около 0,3% от активности нативного фермента). Отсутствие элюции с колонки при использовании раствора аспарагиновой кислоты, вероятно объясняется снижением у мутанта сродства к субстрату.

В свою очередь Lys-55 также является консервативным остатком в семействе аспартаз/фумараз. Для выяснения роли Lys-55 был получен мутант, у которого Lys-55 заменен на аргинин [Saribas A.S. et al., 1994]. Мутантный белок выявлялся в клетке в нерастворимой фракции и не обладал аспартазной активностью.

1.3.5. Предполагаемый механизм действия

Роль отдельных аминокислот в каталитическом механизме удалось предсказать после получения в кристаллическом виде комплекса аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1 с субстратом и изучения его структуры с помощью рентгеноструктурного анализа [Fujii T. et al., 2003].

В связывании аспартазы с субстратом участвует несколько аминокислотных остатков из 3 различных субъединиц, относящихся к 4 консервативным участкам (Рисунок 1.8). α -аминогруппа аспарагиновой кислоты связана с остатками Thr-101, Asn-142 и His-188, в то время как α -карбоксыльная группа связана с Asn-142, Thr-187 и Lys-324 [de Villiers M. et al., 2012]. Положительно заряженный Lys-324 стабилизирует отрицательный заряд L-аспарагиновой кислоты с помощью электростатического взаимодействия. β -карбоксыльная группа субстрата связана с остатками Thr-101, Ser-140, Thr-141 и Ser-319. Аминокислотные остатки активного сайта образуют обширную сеть водородных связей, которые удерживают L-аспарат в энергетически невыгодном состоянии.

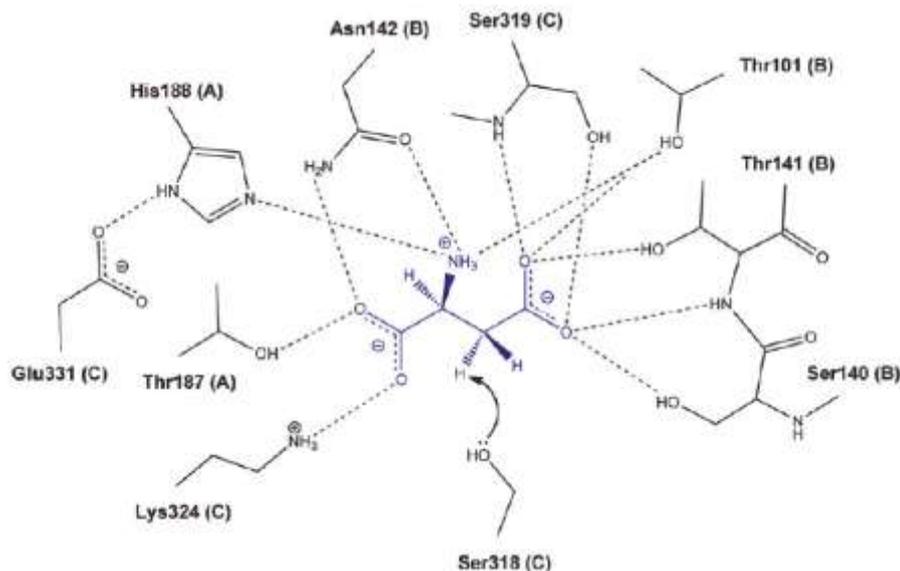


Рисунок 1.8. Схематическое взаимодействие между L-аспарагиновой кислотой и каталитическим центром аспартазы aspB [Fibriansah G. et al., 2011]. Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

Аспартаза катализирует двухэтапную реакцию элиминирования аминогруппы, на первом этапе которой Ser-318 отнимает протон от β -карбоксыльной группы L-аспартата. При этом образуется промежуточный карбанион, стабилизированный ферментом. Роль Ser-318 продемонстрирована в опытах по сайт-специфическому мутагенезу. При замене Ser-318 на аланин наблюдается полная потеря активности, что свидетельствует о важности этой

аминокислоты в каталитическом механизме. На втором этапе, связь C_{α} -N разрывается, образуя при этом фумарат и аммоний (Рисунок 1.9).

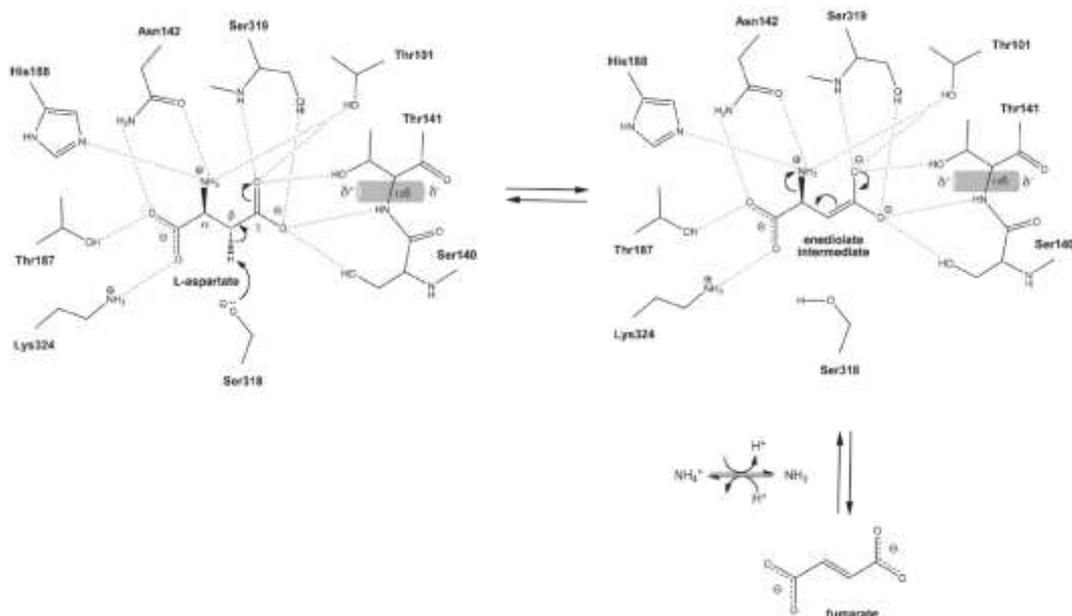


Рисунок 1.9. Схематическое представление предполагаемого каталитического механизма аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1 [Fibriansah G. et al., 2011].

В этой модели важную роль отводят SS-петле. В нее входят остатки 317-328. В открытом состоянии петля удерживается за счет гидрофобного взаимодействия между Ile320 и Met321, находящимся во 2 домене с одной стороны и поверхностью соседнего C-терминального домена с другой [de Villiers M. et al., 2012]. При связывании фермента с L-аспаратом, SS-петля переходит в закрытое состояние и аминокислотные остатки, входящие в состав петли, связываются с субстратом. При этом образуются дополнительные водородные связи, что делает возможным перенос протона.

1.4. Протеолитическая активация аспартазы из *E. coli*

В дополнение к активации субстратом и двухвалентными ионами металлов, аспартаза из *E. coli* также активируется с помощью протеолитического расщепления [Mizuta K. et al., 1975]. Разрыв одной или нескольких пептидных связей вблизи карбоксильного конца приводит к возрастанию аспартазной активности в несколько раз [Yumoto N. et al., 1980]. Протеолитическая активация неспецифична, она может происходить при обработке аспартазы различными протеазами, такими как трипсин, субтилизин, проназа, каждая из которых повышает аспартазную активность. Однако было неясно – повышение активности аспартазы происходит из-за расщепления в уникальном сайте или нескольких сайтах сразу.

Для решения этих вопросов был проведен эксперимент, в котором стоп-кодоны были введены в различные позиции с С-карбоксильного конца аспартазы [Jayasekera M.M. et al., 1997]. Всего было получено 5 мутантов (Рисунок 1.10)

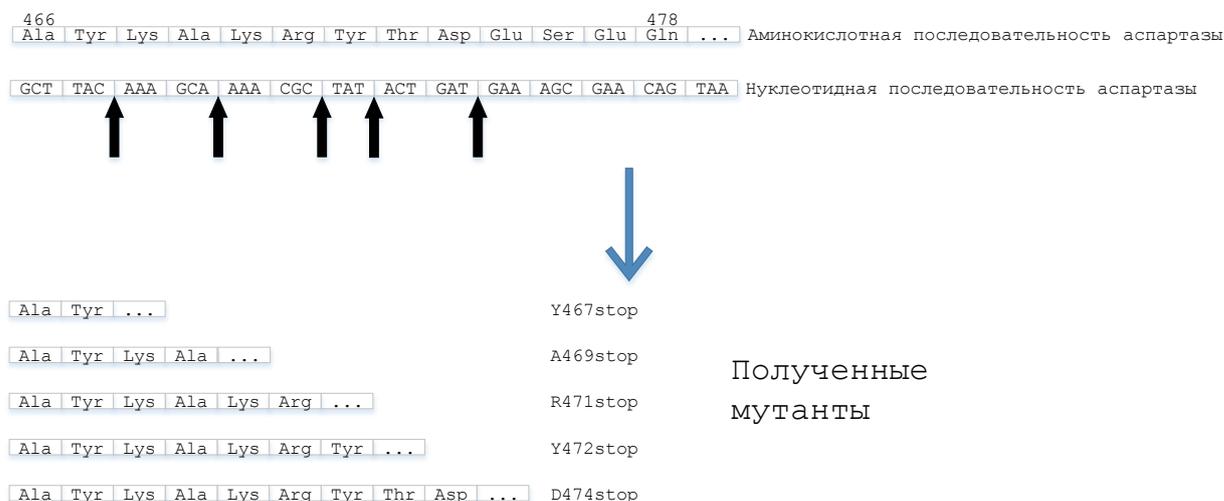


Рисунок 1.10. Получение мутантных аспартаз, усеченных с С-конца. Стрелками показаны позиции введения стоп-кодона

У первого полученного мутанта стоп-кодон был введен после Ala466. При этом терялось 12 аминокислот, среди которых были 3 положительно заряженные и 3 отрицательно заряженные. Поскольку были удалены заряженные аминокислоты, ожидалось что это будет иметь влияние на структуру фермента в этом регионе. У этого мутанта было отмечено снижение аспартазной активности. Авторы отметили, что эти заряженные аминокислоты кластеризованы с 3 отрицательно заряженными аминокислотами, расположенными у С-конца полипептидной цепи. Далее был получен мутант, у которого стоп-кодон введен после Thr-473, у которого отщеплены отрицательно заряженные остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, но не затронуты положительно заряженные лизин и аргинин. Каталитические свойства такого мутанта незначительно отличались от свойств нативного фермента.

Поскольку у мутанта Thr473 активность не изменялась, а у Ala466 активность была понижена, то предполагалось, что активация может происходить при утрате С-терминальных аминокислот, расположенных между Ala-466 и Thr—473. Используя генетический подход (введение стоп-кодонов), было получено несколько делеционных вариантов аспартазы и их каталитические свойства были изучены (Таблица 1.4).

Таблица 1.4. Кинетические параметры делеционных вариантов аспартазы из *E.coli*

[Jayasekera M.M. et al., 1997]

Мутант	k_{cat} (min^{-1})	% k_{cat}	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Wild-type	$40,5 \pm 1,6$	100	$1,8 \pm 0,1$	$22,6 \pm 0,9$
D474stop	$43,7 \pm 7,6$	105	$2,8 \pm 1,1$	$15,3 \pm 2,9$
Y472stop	$97,2 \pm 6,1$	240	$3,3 \pm 0,8$	$29,5 \pm 1,8$
R471stop	$70,7 \pm 2,9$	175	$4,5 \pm 0,5$	$15,7 \pm 0,6$
A469stop	$39,6 \pm 1,0$	98	$10,2 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,1$
Y467stop	$2,5 \pm 0,8$	6,1	$31 \pm 8,2$	$0,08 \pm 0,003$

Максимальной активностью обладал мутант Y472, утративший 6 аминокислот с С-конца. Каталитическая константа у мутанта Y472 более чем в два раза превышала уровень, характерный для нативного фермента. Мутанты, которые утратили либо больше терминальных аминокислот (D469), либо меньше (D474), обладали схожим уровнем активности с нативным ферментом.

Пока не ясно как именно эти структурные модификации на С-конце аспартазы влияют на каталитическую активность фермента. Конформация на этом конце у нативного фермента весьма неупорядочена и за пределами 460 аминокислоты электронная плотность четко не определена. Эта неупорядоченность может отражать весьма гибкую область белка, которая может изменять свою конформацию в ответ на связывание в активном центре фермента. Одно из возможных объяснений изменения каталитической активности связано с предполагаемой способностью участка на С-конце аспартазы участвовать в связывании с субстратом. В результате сродство фермента к субстрату понижается с каждой последовательно удаленной функционально значимой аминокислотой. Повышенная каталитическая активность наблюдается только в мутантах, несущих на С-конце положительно заряженную аминокислоту (Lys468, Lys470, Arg471). Эти группы могут участвовать в процессе координации аспарагиновой кислоты в активном сайте фермента.

Глава 2. Применение аспартаз в промышленной биотехнологии

Бактериальные аспартазы, катализирующие присоединение аммония к фумаровой кислоте с образованием L-аспарагиновой кислоты, обладают значительным потенциалом для промышленного применения. Прежде всего, фермент аспартаза как биокатализатор широко используется для получения L-аспарагиновой кислоты, которая как стартовый материал используется для получения пищевых и кормовых добавок, а также лекарственных средств.

Кроме того, аспартазы, катализируя в клетках реакции аминирования фумарата или дезаминирования аспарагиновой кислоты, могут оказывать влияние на уровень содержания в клетке L-аспарагиновой кислоты.

Направленные модификации гена аспартазы могут являться одним из подходов к созданию штаммов – продуцентов аминокислот аспарагинового семейства.

2.1. Использование аспартаз в качестве катализатора для получения L-аспарагиновой кислоты

L-аспарагиновая кислота (или аминокантарная кислота) является альфа-аминодикарбоновой органической кислотой, относящаяся к протеиногенным аминокислотам, участвующим в синтезе белков в клетках. Уникальные свойства L-аспарагиновой кислоты (эффективный хелатор металлов, стартовый материал для синтеза эфиров с высокой сладостью и биоразлагаемых полимеров) обеспечили её широкое использование в различных отраслях народного хозяйства. В настоящее время мировое производство L-аспарагиновой кислоты превышает 40 тыс. тонн (Рисунок 2.1).

В пищевой промышленности широко применяется искусственный подсластитель метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, также известный как аспартам. Впервые аспартам был синтезирован в 1965 году химиком Джеймсом М. Шлаттером [Mazur R.H., 1974]. В 1981 году аспартам стал применяться в США и Великобритании в качестве пищевой добавки - подсластителя E951. Аспартам используется в основном в низкокалорийных продуктах и напитках, а также может использоваться при заболеваниях сахарным диабетом. Пищевую добавку E951 также можно встретить в безалкогольных напитках, жевательных резинках, леденцах и кондитерских изделиях.

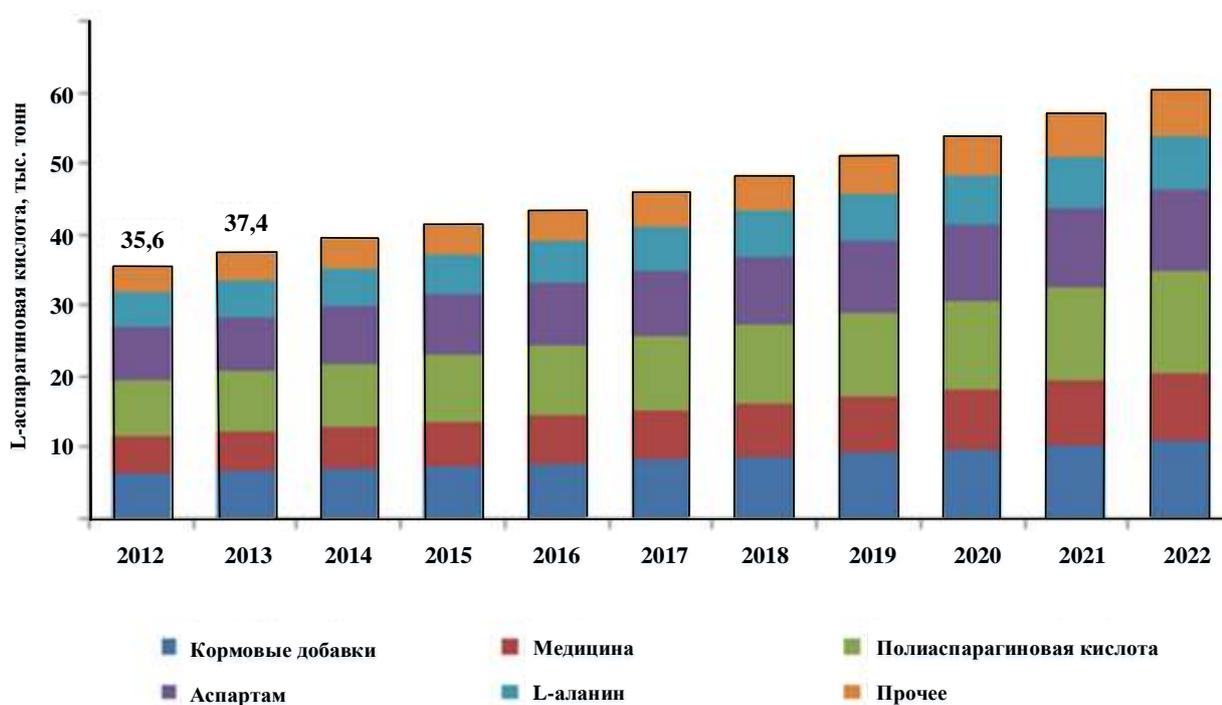


Рисунок 2.1. Предполагаемый мировой спрос на аспарагиновую кислоту в 2012-2022 (по данным консалтингового агентства Grand View Research)

Калиевые и магниевые соли аспарагиновой кислоты нашли широкое применение в медицине. L-аспарагиновая кислота оказалась идеальным переносчиком ионов калия и магния в организме человека и её соли используются в качестве лекарственного средства для устранения дефицита калия и магния при сердечных заболеваниях [Воронин С.П. и др., 2004]. Калий и магний являются макроэлементами, регулирующими биохимические процессы в организме человека. Недостаток этих макроэлементов возникает при сердечно-сосудистых заболеваниях, сахарном диабете, тяжелых формах диареи и рвоты. Было показано, что препараты на основе калиево-магниевых солей аспарагиновой кислоты (панангин, аспаркам, калия магния аспарагинат) наиболее полно устраняют дефицита ионов калия и магния в организме [Синолицкий М.К. и др., 2003]

Еще одной областью применения L-аспарагиновой кислоты являются кормовые добавки для сельскохозяйственных животных. Микроэлементные комплексы (МЭК) на основе L-аспарагиновой кислоты представляют собой смесь соединений пяти металлов (железо, кобальт, медь, марганец и цинк) с L-аспарагиновой кислотой. Использование МЭК в экспериментах на птицах и свиньях показали высокую биологическую усвояемость микроэлементов, что позволяет снизить концентрацию микроэлементов в кормах в 10 - 20 раз без снижения продуктивности [Шейко И. и др., 2014]. Такое снижение потребления микроэлементов достигается за счет практически полного усвоения металлов. При этом

отмечается нормальный уровень концентрации металлов в крови, внутренних органах и костях животных и птицы .

Значительный интерес вызывает использование L-аспарагиновой кислоты в качестве мономера в полимерной химии. Полиаспарагиновая кислота (PASP) относится к биodeградируемым полимерам, которые могут использоваться для производства гидрогелевых материалов, включая суперадсорбенты, способные удерживать большое количество воды и производственных отходов [Sharma S. et al., 2016]. Обработка ростков растений смесью удобрений с полиаспарагиновой кислотой позволяет улучшить показатели продуктивности роста растений при уменьшенном расходе удобрений [Kinnersley A.M. et al., 1997]. Полиаспарагиновая кислота и её сополимеры с другими аминокислотами (например, L-лизин) являются эффективными переносчиками лекарственных веществ, таких как, адриамицин и даунорубицин - антираковых препаратов, снижая их токсичность [Min K.H. et al., 2012]. Кроме того, благодаря рН-чувствительности и способности транспортировать ионы через мембранные оболочки независимо от градиента концентрации, полиаспарагинаты перспективно использовать в фармацевтической промышленности в качестве диализных мембран [Ertel S.I. et al., 1992].

На Рисунке 2.2. представлены основные области применения L-аспарагиновой кислоты

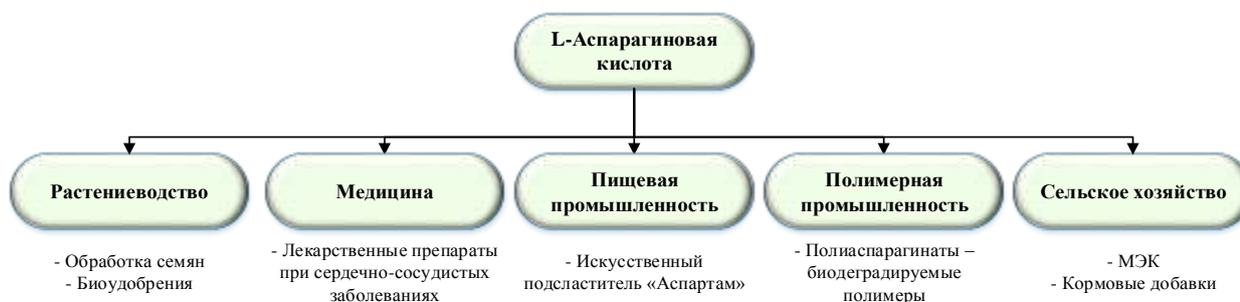


Рисунок 2.2. Области применения L-аспарагиновой кислоты

Широкое использование аспарагиновой кислоты в различных областях способствовало развитию различных способов её получения, включая традиционные способы органического синтеза, а также использование биотехнологий для её синтеза.

2.1.1. Способы получения L-аспарагиновой кислоты

Известно два основных способа получения аспарагиновой кислоты – химический (тонкий органический синтез) и биотехнологический. Биотехнологические способы, в свою очередь, разделяются на две группы – ферментационные и биокаталитические (Рисунок 2.3).



Рисунок 2.3. Основные способы получения аспарагиновой кислоты: достоинства и недостатки

2.1.1.1. Химический способ

Впервые аспарагиновая кислота была получена в 1850 году нагреванием аммонийной соли яблочной кислоты [Dunn M.S. et al, 1930]. В дальнейшем были разработаны новые, более эффективные способы, основанные на взаимодействии яблочной или фумаровой кислот с аммонием в закрытой трубке; на восстановлении оксима оксалукусусного эфира или эфира нитроянтарной кислоты, а также гидролизе триэтилового эфира этан- α,α,β -трикардоксильной кислоты. Вместе с тем, все вышеперечисленные методы обладают рядом недостатков. Так, направленное аминирование фумаровой кислоты требует создания высокого давления в $5,5 \cdot 10^5$ Па. При гидролизе триэтилового эфира этан- α,α,β -трикардоксильной кислоты образуется значительное количество побочных продуктов, в том числе иминодиуксусная кислота, что требует дальнейшей очистки готового продукта.

Основным способом промышленного получения аспарагиновой кислоты является конденсация малеинового ангидрида с водяным аммиаком при высоком давлении с последующим гидролизом полученной аммонийной соли аспарагиновой кислоты и выделением свободной кислоты. Однако в этом случае образуется рацемическая смесь изомеров аспарагиновой кислоты с выходом около 72-80% [Овчинников В.А. и др., 2001] и для получения L-аспарагиновой кислоты требуется разделение рацематов.

Несмотря на то, что химические способы исторически возникли раньше, в настоящее время в промышленности они не применяются. Это связано со следующими недостатками:

- Химические способы приводят к образованию рацемической смеси L- и D-форм аспарагиновой кислоты. Известно, что D-энантиомеры аминокислот являются биологически неактивными, не узнаются ферментными системами живых организмов и не усваиваются ими. Поэтому для получения биологически активной L- формы необходимо дорогостоящее разделение рацематов;

- Химические способы требуют жестких условий проведения процесса и специальной аппаратуры;

- Химические способы ведут к образованию побочных продуктов, что приводит к необходимости дополнительных стадий очистки;

- Химические способы связаны с проблемой безопасной и экологичной утилизации промышленных отходов.

В силу этих недостатков, химические способы не выдерживают конкуренции с биотехнологическими способами синтеза аспарагиновой кислоты.

2.1.1.2. Биотехнологические способы

Биотехнологические способы основаны на способности микроорганизмов или их ферментов превращать клеточные метаболиты - предшественники в L-аспарагиновую кислоту, которая затем выделяется и очищается. Основными преимуществами биотехнологических методов являются:

- получение аминокислоты в виде L-формы - природного изомера, в то время как химические способы приводят к получению рацемической смеси L- и D- изомеров;

- «мягкие» условия процесса получения (водные среды, комнатная температура и нормальное давление);

- использование возобновляемых или дешевых источников сырья;

- возможность улучшать продуктивность штаммов с помощью генетических методов.

Биотехнологические способы делят на две группы - ферментационные и биокаталитические.

Ферментационный способ основан на способности микробных клеток метаболизировать сахара и превращать их в целевой продукт – L-аспарагиновую кислоту. Важнейшим преимуществом такого способа является использование в качестве сырья для синтеза возобновляемых источников, например сахара растительного происхождения.

Производство аспарагиновой кислоты с использованием этого метода началось в 1960 году [Kisumi M. et al., 1960]. В качестве продуцентов использовали штаммы *Pseudomonas fluorescens* и мутант *Escherichia coli*, обладающие высокой аспартазной активностью. Конверсия фумарата в аспарагиновую кислоту достигала теоретически ожидаемой величины и составляла около 56 мг/мл. Также описан метод получения аспарагиновой кислоты с помощью штаммов *Brevibacterium* и *Corynebacterium*, устойчивых к 6-диметиламинопурина [Tsuchida T. et al., 1976]. Однако в этих случаях максимальный уровень продукции был слишком низким и составлял 10 мг/мл.

В последние годы для получения продуцентов аспарагиновой кислоты стали использовать микроорганизмы, измененные методами генной инженерии. Известны способы получения L-аспарагиновой кислоты с помощью бактерий, у которых изменена экспрессия генов, вовлеченных в синтез аспарагиновой кислоты. К примеру, в патенте [Мохова О.Н. и др., 2011] описан способ получения аспарагиновой кислоты с помощью бактерии рода *P. ananatis*, у которой изменена экспрессия генов, вовлеченных в синтез аспарагиновой кислоты. При этом выход аспарагиновой кислоты составил 3,7 мг/мл, что составляет 10% от теоретически ожидаемого. Авторы считают, что для получения штамма для производства аспарагиновой кислоты ферментационным способом необходимо снизить уровень α -кетоглутаратдегидрогеназы и цитратсинтазы, а также увеличить уровень фосфоенолпируваткарбоксилазы и глутаматдегидрогеназы. В патенте [Куваева Т.М. и др., 2011] описан способ получения аспарагиновой кислоты с помощью бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. При введении в штамм гена аспартатдегидрогеназы из *Polaromonas sp.* продукция аспарагиновой кислоты увеличивается в 2 раза по сравнению с исходным и составляет 1,4 мг/мл.

Однако пока не удалось получить штаммы, обладающие высоким уровнем продукции аспарагиновой кислоты при ферментации сахаров. Кроме того, ферментационные способы получения аспарагиновой кислоты отличаются сложностью реализации и длительностью процесса (2-3 суток). В силу отмеченных недостатков, ферментационные способы пока не вышли за рамки разработок и не используются в промышленности.

Биокаталитические способы основаны на использовании клеток, обладающих высокой аспартазной активностью, или изолированных ферментов в качестве катализаторов превращения фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту. Биокаталитические способы в настоящее время являются наиболее распространенными способами промышленного получения L-аспарагиновой кислоты.

Биомасса клеток, обладающих высокой аспартазной активностью, представляет собой простейшую форму катализатора превращения fumarата аммония в L-аспарагиновую кислоту. Основными недостатками такой формы катализатора на основе нативных клеток являются низкая операционная стабильность, технические проблемы при повторном использовании клеток и невозможность создания непрерывного процесса. Поэтому этот способ в настоящее время в промышленности не используется.

В 70-е годы XX века японская фирма «Танабе Сейяку» запатентовала способ получения L-аспарагиновой кислоты, где изолированный фермент аспартазы использовался в качестве биокатализатора [Tosa T. et al., 1973]. Для повышения стабильности фермент был иммобилизован в полиакриламидном геле. Однако этот подход не оправдал себя по следующим причинам:

- высокой стоимости стадии выделения и очистки аспартазы;
- значительного снижения активности фермента при выделении;
- понижении активности фермента при иммобилизации;
- высокой стоимости полученного биокатализатора.

Более эффективным оказался подход, заключающийся в иммобилизации целых клеток *E. coli*, обладающих аспартазной активностью, в полиакриламидном геле [Chibata I. Et al., 1974]. В этом случае биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток обладали в 20 раз более высокой активностью по сравнению с катализаторами на основе иммобилизованного фермента. В последующие годы основные усилия были сосредоточены на получении новых штаммов с повышенной аспартазной активностью и поисках наиболее эффективных носителей для иммобилизации. Наиболее эффективными носителями для иммобилизации являются полимерные матрицы – полиакриламиды [Tosa T. et al., 1974], альгинаты, каррагенаны [Nishida Y. et al., 1979] [Sato T. et al., 1979], полиуретаны [Fusee M.C. et al., 1981] [Fusee M.C., 1987], полиазетидин, и др. Основными функциональными критериями эффективности метода иммобилизации являются:

- степень сохранения исходной активности нативных клеток;
- емкость носителя, т.е. количество связанных клеток на единицу получаемого биокатализатора;
- стабильность биокатализатора;
- скорость снижения активности в процессе эксплуатации.

Биокаталитический способ получения L-аспарагиновой кислоты включает следующие стадии:

- Нарботка биомассы бактериальных клеток, обладающих аспартазной активностью;

- Изготовление биокатализатора путем иммобилизации клеток или фермента;
- Трансформация фумарата аммония в L-аспарагинат с помощью биокатализатора;
- Выделение L-аспарагиновой кислоты.

При оптимальных условиях иммобилизации степень включения микробных клеток, определяемая по содержанию общего белка, достигает 85-95%. Биокатализаторы, созданные на основе иммобилизованных клеток, обладают высокой операционной стабильностью: период полуинактивации аспартазной активности биокатализатора на основе полиакриламидных гелей составляет около 120 суток при 30⁰C [Drauz K. et al., 2012]. Кроме того, в отличие от интактных клеток, активность которых ингибируется при концентрации субстрата свыше 1 М, иммобилизованные клетки сохраняют активность вплоть до 1,5 М фумарата аммония [Liese A. et al., 2006]. Это позволяет повысить концентрацию фумарата аммония в реакционной смеси и таким образом повысить эффективность процесса в целом.

Существующие процессы биокаталитического получения L-аспарагиновой кислоты делятся на периодические и непрерывные. В случае периодического процесса биосинтез L-аспарагиновой кислоты происходит в термостатируемом реакторе, в который загружается суспензия биокатализатора и субстрат - фумарат аммония. Процесс проводят до полной переработки субстрата, затем биокатализатор отделяют и из реакционной смеси выделяют L-аспарагиновую кислоту с помощью кристаллизации при pH=2,8. Для закисления реакционной смеси используют кислоты, такие как азотная кислота [Giselbrecht K.H. et al., 2001], уксусная или муравьиная [Giselbrecht K.H. et al., 1999].

Примером периодического процесса является работа [Miers J.M., 2001], в которой для получения L-аспарагиновой кислоты использовались клетки *Microbacterium*, которые выращивали и иммобилизовали в полиэтиленимине, глутаровом альдегиде и хитозане. Трансформацию проводили в реакторе периодического действия, в качестве субстрата использовали 1 М фумарат аммония. Через один час биокатализатор отделяли от раствора. При таком способе производства скорость образования L-аспарагиновой кислоты составляла 438 мг/ч*мл суспензии.

Реакторы непрерывного действия представляют собой колонки, заполненные гранулами иммобилизованных клеток с высокой аспартазной активностью. При пропускании через колонки раствора фумарата аммония образуется раствор L-аспарагината аммония, который затем осаждается и очищается (Рисунок 2.4):

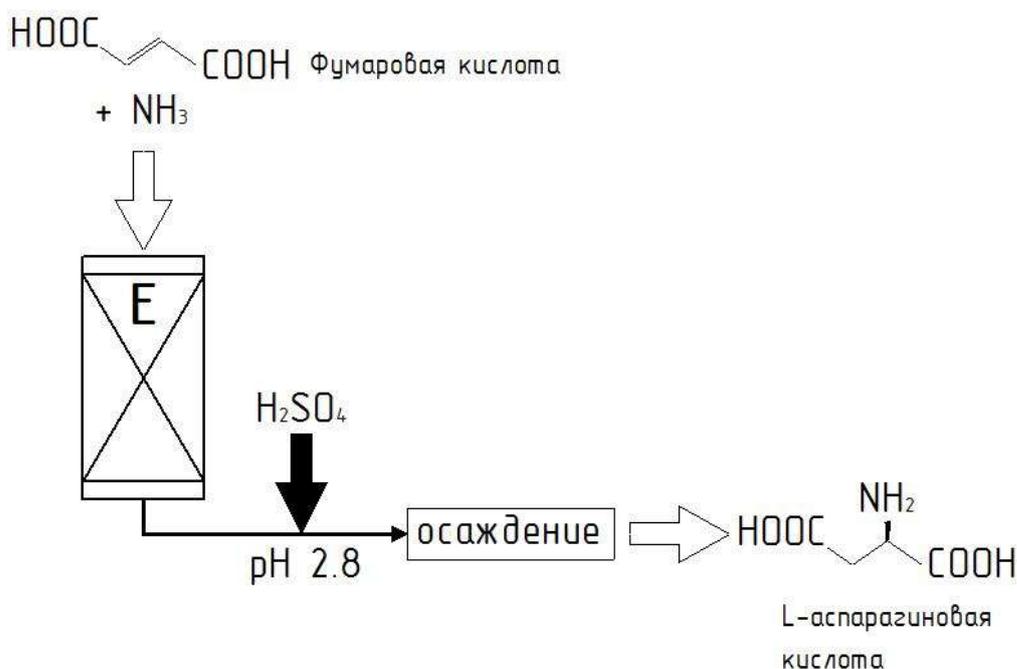


Рисунок 2.4. Схема получения L-аспарагиновой кислоты биокаталитическим методом в реакторе непрерывного действия

Примером непрерывного процесса является технология, разработанная американской компании «BioCatalytics Inc.», в которой используются колонные реакторы объемом 75 л. При этом, степень конверсии фумарата в L-аспарагиновую кислоту составляет 99% и оптическая чистота более 99,9%. Период полуинаktivации используемого в этой технологии биокатализатора составляет около 6 месяцев [Liese A. et al., 2006].

Необходимо отметить, что ключевым элементом биокаталитической технологии является бактериальный штамм, обладающий аспартазной активностью, на основании которого создается биокатализатор для получения L-аспарагиновой кислоты. Несмотря на то, что биокаталитическая технология уже реализована в промышленных масштабах, разработка новых, более эффективных биокатализаторов для этого процесса, остается актуальной задачей.

2.1.2. Пути совершенствования биокатализаторов

Ферменты, катализирующие обратимое присоединение иона аммония по двойной связи фумаровой кислоты с образованием L-аспарагиновой кислоты, обнаружены у ряда микроорганизмов, включая *Escherichia coli*, *Serratia*, *Erwinia*, *Bacillus* и др. В обычных условиях эти ферменты участвуют в катаболизме аминокислот и содержатся в клетках в незначительных количествах. Поэтому без дополнительных генетических манипуляций или

специальных условий культивирования такие бактерии не могут использоваться для практических целей.

Главным недостатком природных штаммов *E. coli* как продуцентов аспартазы является низкий уровень их аспартазной активности. Кроме того, для них характерно быстрое снижение (почти в 10 раз) аспартазной активности при увеличении плотности культуры в ходе культивирования [Синолицкий М.К. и др., 2001]. В результате, при использовании природных штаммов *E.coli* не удается получить необходимое количество биомассы высокоактивных клеток для промышленного производства L-аспарагиновой кислоты. Еще одним недостатком природных бактериальных штаммов является наличие в клетках фумаразной активности, которая катализирует превращение фумаровой кислоты в L-яблочную кислоту. Поэтому, при биокаталитическом получении L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония, в реакционной смеси всегда накапливается в качестве побочного продукта L-яблочная кислота, что приводит к необходимости дополнительной очистки, снижению эффективности процесса в целом.

В научно-технической литературе известны различные подходы для повышения аспартазной активности бактериальных штаммов. Идеальный биокатализатор должен обладать следующими свойствами:

- высоким уровнем аспартазной активности, которая образуется в клетках конститутивно;
- низким уровнем фумаразной активности, с которой связано образование яблочной кислоты – главного побочного продукта;
- для наработки биокатализатора должны использоваться доступные и дешевые компоненты питательных сред;

Анализ научно-технической и патентной литературы позволяет выделить следующие основные подходы к повышению аспартазной активности штаммов, применяемых в качестве катализаторов получения L-аспарагиновой кислоты:

1. Селекция и отбор спонтанных и индуцированных мутаций, приводящих к повышению синтеза аспартазы. Традиционные методы мутагенеза и отбора мутаций, приводящих к повышению синтеза аспартазы обеспечивают 2-4 кратное повышение аспартазной активности по сравнению с штаммами дикого типа. К сожалению, такие мутанты обладают также повышенным уровнем фумаразной активности, а также чувствительны к катаболитной репрессии, что требует дальнейшего улучшения свойств штамма для промышленного применения. В патенте [Синолицкий М.К. и др., 2001] были получены мутанты *E. coli* ВКПМ В-7188, устойчивые к аналогу глюкозы – альфа-метил D-

глюкопиранозиду, что позволило снизить чувствительность к катаболитной репрессии и одновременно увеличить аспартазную активность штамма с 95,4 до 140,5 ед. акт./ед. ОП. Кроме того, мутантный штамм обладал еще одним важным преимуществом – его аспартазная активность в отличие от природного штамма оставалась на достаточно высоком уровне вплоть до стационарной фазы роста.

2. Клонирование гена аспартазы в составе мультикопийных векторов с использованием методов генной инженерии. Клонирование гена аспартазы в составе мультикопийных векторов приводит к значительному повышению экспрессии гена и повышению аспартазной активности рекомбинантных клеток. В патенте US 6,214,589 B1 [Mukouyama M. et al., 2001] описан способ получения L-аспарагиновой кислоты с помощью штамма *E. coli*, содержащего плазмиду с геном аспартазы из *E. coli* или *Pseudomonas fluorescens* под сильным промотором. После иммобилизации клеток, несущих такую плазмиду, аспартазная активность готового биокатализатора составляет 250 и более единиц, а степень конверсии фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту составляет 99,7%.

Вместе с тем, экспрессия гена в составе мультикопийных плазмид приводит к нестабильности рекомбинантных штаммов, что требует внесения в среды для культивирования селективных агентов – антибиотиков. В целом, нестабильность рекомбинантных плазмид является большой проблемой при промышленном использовании генетически модифицированных штаммов. Для преодоления нестабильности рекомбинантных штаммов применяют различные способы, в том числе, генетические элементы, повышающие стабильность плазмид [Nishimura N. et al., 1987], а также бактериальные мутации, стабилизирующие поддержание плазмид в клетках [Nishimura N. et al., 1989]. Альтернативным подходом к стабилизации рекомбинантных штаммов является интеграция клонированного гена в хромосому хозяина.

Другим недостатком этого способа является сложность культивирования штамма, связанная с необходимостью вносить в питательную среду антибиотики для стабильного поддержания плазмиды и дорогостоящих индукторов синтеза аспартазы.

3. Генетическая модификация гена с целью получения мутантных вариантов аспартазы с повышенной удельной активностью и термостабильностью. Этот подход начал реализовываться в связи с развитием методов молекулярной инженерии и накоплением информации о молекулярной структуре и механизме действия аспартазы. Для получения мутантных форм аспартазы используется сайт-направленный мутагенез. Примером такого подхода является патент US 6,133,013 [Viola R.E. et al., 2000]. В нем описывается клонирование в составе плазмидного вектора аспартаз, имеющих делецию нескольких

аминокислот на С-конце. Удаление 7 аминокислот приводит к повышению аспартазной активности в 2 раза по сравнению с диким типом. Также в этом патенте описывается получение мутантной аспартазы A469stop, у которой обнаружена способность растворять тромбы.

4. Оптимизация условий культивирования штаммов с целью получения большого количества биомассы с высокой удельной аспартазной активностью. Оптимизация состава питательной среды и режимов культивирования штаммов является обязательным этапом наработки биокатализатора. Целью этапа оптимизации является раскрытие потенциала созданных с помощью селекционных и генетических подходов штаммов путем подбора доступных на рынке компонентов среды и технологически обоснованных режимов ферментации.

Сложность работы по оптимизации состава сред и условий культивирования заключается в том, что оптимальные условия устанавливаются для каждого получаемого мутанта. В этой связи работа по оптимизации носит циклический характер и проводится для каждого создаваемого в ходе работы штамма.

Все эти подходы используются в настоящее время для получения промышленных биокатализаторов. Однако следует отметить, что для каждого из этих подходов характерны как преимущества, так и недостатки. Традиционные методы не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, но трудоемки в исполнении и требуют значительных трудозатрат. Молекулярные методы требуют высокой квалификации, специального оборудования, но главное могут приводить к нестабильности штаммов и низким выходам по биомассе. Поэтому программа создания промышленного штамма представляет собой комбинацию перечисленных методов, зависящую от специфических особенностей исходного штамма.

2.2. Использование аспартазы из *Haemophilus influenzae*

Бактериальная аспартаза из *Haemophilus influenzae* обладает уникальной способностью связываться и активировать плазминоген – важнейший компонент системы свертывания крови человека [Sjöström I. et al., 1997]. Обнаружить такую способность удалось с использованием афинной хроматографии при скрининге белков *H. Influenzae*, способных связаться с плазминогеном. Обнаруженный белок показывал стимуляцию тканевого активатора плазминогена (tPA), катализирующего активацию плазминогена примерно в 300 раз, главным образом, за счет снижения константы Михаэлиса. Ген, кодирующий плазминоген-связывающий белок, был изолирован и секвенирован. Оказалось, что этот белок состоит из 472 аминокислоты и показывает 79% гомологию с аспартазой из *E. coli*.

Более того, этот плазминоген-связывающий белок обладал высокой аспартазной активностью [Sjöström I., et al. 1997]. В этой связи возникает вопрос – обладают ли другие бактериальные аспартазы способностью активировать плазминоген. Проверка аспартазы из *E. coli* не обнаружила никакого связывания с плазминогеном и активации этого фермента [Viola R.E. et al., 2000].

Сравнение аминокислотных последовательностей аспартаз из *H. influenzae* и *E. coli* показало, что у фермента из *H. influenzae* на С-конце отсутствуют 5 аминокислот, при этом, терминальным остатком является лизин. Было показано, что именно карбокситерминальный лизин является важным компонентом для связывания с плазминогеном [Plow E.F. et al., 1995]. Проверка мутантных вариантов аспартазы *E. coli*, полученных с помощью С-терминального протеолиза, показала, что делеционные варианты А469 и R471 способны связываться с плазминогеном с афинностью, сравнимой с нативным ферментом из *H. Influenzae*. При этом, мутант А469 демонстрировал слабую активацию плазминогена. Следовательно, делеционные варианты аспартазы из *E. coli* подобно аспартазе из *H. influenzae* обладают новой биологической активностью – способностью активировать плазминоген– важнейший компонент системы свертывания крови человека [Viola R.E. et al., 1999]

Таким образом, уникальные свойства аспартазы из *H. influenzae* и делеционных мутантов *E. coli* открывают новое направление в использовании аспартаз – создание на основе аспартаз медицинских препаратов для коррекции нарушений систем свертываемости крови.

2.3. Роль аспартаз в биосинтезе аминокислот

Известно, что L-аспарагиновая кислота является одним из важнейших метаболитов бактериальной клетки. Она является прямым предшественником синтеза аминокислот аспарагинового семейства, к которым относятся лизин, метионин, треонин и изолейцин [Lehninger A.L. et al., 2000] - важнейшие незаменимые аминокислоты, широко применяемые в животноводстве в качестве кормовых добавок. Также было показано, что при экспрессии гена аспартазы на плазмиде в клетках *Corynebacterium* возрастает количество L-аргинина с 3 г/л до 3,9 г/л [Вае Н.А. et al., 2016]. Кроме того, L-аспарагиновая кислота является предшественником синтеза пиримидинов, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты в клетке. Таким образом, уровень доступности L- аспарагиновой кислоты может существенным образом сказаться на скорости образования самых различных клеточных метаболитов.

L-аспарагиновая кислота, образуется в клетках бактерий, главным образом, из оксалоацетата путем трансаминирования с участием фермента аспаратаминотрансферазы. Известно, что повышение активности аспаратаминотрансферазы в клетках коринебактерий приводит к увеличению продукции лизина [Araki M. et al., 1999]. Этот пиродоксаль-зависимый фермент катализирует перенос аминогруппы от глутамата на оксалацетат с освобождением α -кетоглутарата. Сопряженная с этим реакция синтеза глутамата из α -кетоглутарата представляет собой окислительно-восстановительный процесс, протекающий с участием восстановительного эквивалента, NADPH (Рисунок 2.5).

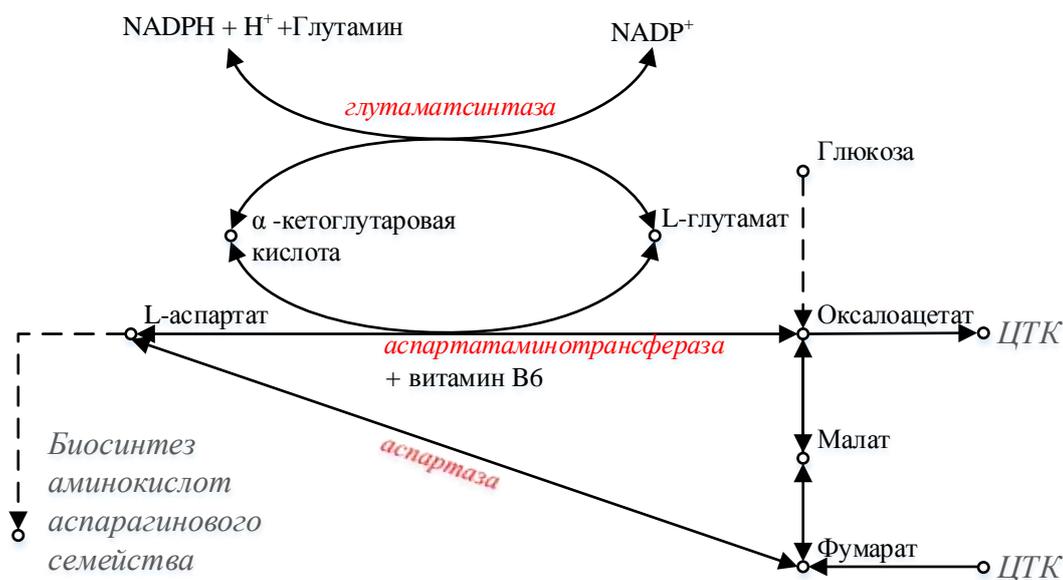


Рисунок 2.5. Схема биосинтеза L-аспартата в клетках микроорганизмов. Красным курсивом выделены ферменты, участвующие в реакции

Альтернативным путем образования L-аспарагиновой кислоты является аминирование фумаровой кислоты с участием фермента аспартазы. Для образования L-аспарагиновой кислоты по этому пути не требуются кофакторы и восстановительные эквиваленты (NADPH). Теоретически такой путь синтеза L-аспарагиновой кислоты является более выгодным. Этот путь может обеспечивать более высокую доступность аспарагиновой кислоты для синтеза важнейших строительных блоков клетки и, в первую очередь, аминокислот аспарагинового семейства.

В промышленности для производства этих аминокислот часто используются штаммы *Corynebacterium glutamicum*. Известно, что штаммы *Corynebacterium glutamicum* не обладают аспартазной активностью, поэтому аспартазный путь синтеза аспарагиновой кислоты, по-видимому, не функционирует в этих бактериях. В статье [Menkel E. et al., 1989] были

проведены работы по определению влияния аспартазы на биосинтез лизина. Было показано, что экспрессия гена аспартазы из *E. coli* на плазмиде в клетках *Corynebacterium glutamicum* DG52-5 на среде с добавлением фумаровой кислоты позволило повысить выход лизина на 20%: с 30 мМ до 37-38 мМ. Повышение наблюдалось только при добавлении в среду фумаровой кислоты в концентрации 125 мМ. Таким образом, модификации аспартазной активности в штаммах, предназначенных для производства аминокислот, может служить одним из методов повышения количества получаемого продукта.

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

Используемые в работе штаммы представлены в Таблице 3.1:

Таблица 3.1. Штаммы, используемые в работе

Номер	Название	Описание штамма	Источник
1	<i>E. coli</i> XL1-Blue	Штамм для клонирования	"Agilent Technologies", США
2	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Штамм для экспрессии генов под T7-промотором	"Merck", Германия
3	<i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Штамм-продуцент L-аспарагиновой кислоты	ВКПМ В-7188
4	<i>E. coli</i> MG1655	Производный <i>E. coli</i> К-12, применявшийся для конструирования	ВКМП В-6195
5	<i>E. coli</i> D1(CS)	Производный <i>E. coli</i> MG1655 с вставкой <i>cat^R-sacB^S</i> перед промотором гена <i>aspA</i>	Эта работа
6	<i>E. coli</i> D2	Производный <i>E. coli</i> MG1655, собственный промотор гена <i>aspA</i> замещен на промотор P _{G25}	Эта работа
7	<i>E. coli</i> D3	Производный <i>E. coli</i> MG1655, собственный промотор гена <i>aspA</i> замещен на промотор P _{A1}	Эта работа
8	<i>E. coli</i> D4(CS)	Производный <i>E. coli</i> MG1655 с вставкой <i>cat^R-sacB^S</i> вместо гена <i>iclR</i>	Эта работа
9	<i>E. coli</i> D5	Производный <i>E. coli</i> MG1655 с удаленным геном <i>iclR</i>	Эта работа
10	<i>E. coli</i> D6 Δ <i>fumA</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D5 с вставкой <i>cat^R-sacB^R</i> вместо гена <i>fumA</i>	Эта работа
11	<i>E. coli</i> D7 Δ <i>fumB</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D5 с вставкой <i>cat^R-sacB^S</i> вместо гена <i>fumB</i>	Эта работа
12	<i>E. coli</i> D8 Δ <i>fumC</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D5 с вставкой <i>cat^R-sacB^R</i> вместо гена <i>fumC</i>	Эта работа
13	<i>E. coli</i> D9 Δ <i>fumAC</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D5 с вставкой <i>cat^R-sacB^R</i> вместо генов <i>fumA</i> и <i>fumC</i>	Эта работа
14	<i>E. coli</i> D10 Δ <i>fumB</i>	Производный <i>E. coli</i> D5 с удаленным геном <i>iclR</i>	Эта работа
15	<i>E. coli</i> D11 Δ <i>fumABC</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D10 Δ <i>fumB</i> с вставкой <i>cat^R-sacB^R</i> вместо гена <i>fumC</i>	Эта работа
16	<i>E. coli</i> D12 Δ <i>fumC</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D2 с вставкой <i>cat^R-sacB^R</i> вместо гена <i>fumC</i>	Эта работа
17	<i>E. coli</i> D13 Δ <i>fumAC</i> (CS)	Производный <i>E. coli</i> D2 с вставкой <i>cat^R-sacB^R</i> вместо генов <i>fumA</i> и <i>fumC</i>	Эта работа
18	<i>C. glutamicum</i> 90	Штамм-продуцент L-лизина	ВКПМ В-10945
19	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Типовой штамм коринобактерий	ВКПМ В-41
20	<i>C. glutamicum</i> Н115	Производный штамм <i>C. glutamicum</i> 90 с повышенным уровнем лизина	ВКПМ В-12504

Для поиска гомолога аспартазы *aspB* из *Bacillus sp.* YM55-1 использовалась коллекция бацилл, выделенная из почв Москвы и Московской области (Козловский Ю.Е., институт общей генетики РАН). Коллекция включала 191 штамм бактерий, относящихся к следующим видам: *Bacillus mesentericus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus globigii*, *Bacillus natto*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* и др.

3.2. Плазмидные вектора, использованные в работе

Используемые в работе плазмидные вектора представлены в Таблице 3.2:

Таблица 3.2. Плазмидные вектора, используемые в работе

Название	Описание вектора	Источник
pLATE31	Вектор для клонирования	"ThermoFisher Scientific", США
pLATE31-aspA478	Производная pLATE31 с клонированным геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Эта работа
pLATE31-aspB	Производная pLATE31 с клонированным геном <i>aspB</i> из <i>Bacillus sp.</i> YM55-1	Эта работа
pLATE31-aspA13032	Производная pLATE31 с клонированным геном <i>aspA</i> из <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Эта работа
pLATE31-aspA90	Производная pLATE31 с клонированным геном <i>aspA</i> из <i>C. glutamicum</i> 90	Эта работа
pUC57	Вектор для клонирования	"ThermoFisher Scientific", США
pTZ57R/T	Вектор для клонирования	"ThermoFisher Scientific", США
pDL1	Производная pTZ57R/T с клонированным геном <i>aspA</i> под P_{lacUV5}	Эта работа
pTZ19R	Вектор для клонирования	"ThermoFisher Scientific", США
pDL2	Производная pTZ19R с клонированным геном <i>aspA</i> под P_{eftu}	Эта работа
pDL3	Производная pUC57 с клонированным геном <i>aspB</i> под P_{G25}	Эта работа
pLATE31-aspA472	Производная pLATE31 с укороченным геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Эта работа
pLATE31-aspA471	Производная pLATE31 с укороченным геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Эта работа
pLATE31-aspA469	Производная pLATE31 с укороченным геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Эта работа
pLATE31-aspA467	Производная pLATE31 с укороченным геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Эта работа
pLATE31-aspA466	Производная pLATE31 с укороченным геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Эта работа
pNS2-cat72	Плазмида, способная реплицироваться в клетках <i>C. glutamicum</i>	[Тарутина М.Г., 2015]
pDL4	Производная pNS2-cat72 с геном <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188 под P_{eftu}	Эта работа
pJET1.2-AspA	Плазмида для наработки гена аспартазы <i>aspA</i> из <i>E. coli</i> ВКПМ В-7188	Ранее получена в лаборатории

pKD46	Вспомогательная плазмида для λ Red-зависимой рекомбинации	[Datsenko К.А., 2000]
pICA	Вспомогательная плазмида для наработки кассеты <i>cat-sacB</i>	[Дербиков Д.Д. Гвилава И.Т., 2016]

3.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе

В работе использовались олигонуклеотиды, синтезированные компанией «Евроген» или в ЦКП НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика. Все олигонуклеотиды, использованные при проведении работ, представлены в Таблице 3.3. (Приложение А). Все олигонуклеотиды были сконструированы с использованием программ OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., США) и «VectorNTI Advance 11.0» (ThermoFisher Scientific, США).

3.4. Работа с бактериальными культурами

3.4.1. Культивирование бактерий

Культивирование клеток *E. coli* проводили в жидкой среде LB следующего состава: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, значение pH среды до 7,0-7,3 – при 37°C и перемешивании 300 об/мин и на твердой среде LB с добавлением 15 г/л агара.

Культивирование клеток *C. glutamicum* проводили в жидкой среде 2 LB с мальтозой следующего состава: 20 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 20 г/л мальтозы (вносится после автоклавирования), значение pH среды до 7,0-7,3 – при 30°C и перемешивании 300 об/мин и на твердой среде 2 LB с мальтозой с добавлением 15 г/л агара.

Для наработки в ферментере биомассы клеток *E. coli*, содержащих ген аспартазы, использовалась ацетатная среда следующего состава: 20 г/л дрожжевой экстракт, 15 г/л Na₂HPO₄*12H₂O, 2 г/л KH₂PO₄, 11,6 г/л CH₃COONa*3H₂O, 0,13 г/л MgSO₄ (вносится после автоклавирования), значение pH среды до 6,7.

При необходимости в качестве селективных маркеров в среды добавляли антибиотики («Sigma», США) в следующих концентрациях: для *E. coli* - 100 мкг/мл ампициллин, 10 мкг/мл хлорамфеникол, 50 мкг/мл канамицин; для *C. glutamicum* - 10 мкг/мл хлорамфеникол, 50 мкг/мл канамицин.

3.4.2. Получение электрокомпетентных клеток

Для приготовления электрокомпетентной культуры *E. coli* использовали среду SOB следующего состава: 20 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 0,5 г/л NaCl, 0,186 г/л KCl,

0,95 г/л MgCl₂, значение pH среды до 7,0. Для подращивания бактерий *E. coli* после электропорации использовали среду SOC. Среда SOC идентична по составу среде SOB, но дополнительно содержит 20 мМ глюкозы, которую вносят в среду после стерилизации.

На среде SOB выращивали ночную культуру *E. coli*, разводили её в соотношении 1:100 и подращивали с аэрацией до OD₆₀₀ 0.5-0.6. Клетки собирали центрифугированием (4°C, 5 мин, 12000*g), дважды промывали ледяной деионизованной водой, дважды 10% глицерином и затем ресуспендировали в 100-200 мкл 10% глицерина. Клетки фасовали по 45 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C).

Для приготовления электрокомпетентной культуры *C. glutamicum* использовали среду ВН, следующего состава: 23,5 г/л ВН, 15 г/л сорбита, значение pH среды до 7,5 состава. Для подращивания бактерий *C. glutamicum* после электропорации использовали среду ВН с добавлением 15 г/л сорбитола.

На среде ВН выращивали ночную культуру *C. glutamicum*, разводили её в соотношении 1:100 и подращивали с аэрацией до OD₆₀₀ 0.7-0.8. Клетки собирали центрифугированием (4°C, 5 мин, 12000*g), четыре раза промывали в охлажденном 10% глицерине и затем ресуспендировали в 100-200 мкл 10% глицерина. Клетки фасовали по 45 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

3.4.3. Трансформация электрокомпетентных клеток

Компетентные клетки оттаивали во льду в течение 5 минут. В клеточную суспензию добавляли ДНК в количестве 1-50 нг и переносили в предварительно охлажденные кюветы для электропорации («Bio-Rad», США). Электропорацию проводили на приборе для бактериальной электротрансформации Gene Pulser Xcell Electroporation Systems («Bio-Rad», США). Параметры электрического импульса задавали в соответствии с рекомендациями производителя для *E. coli* и *C. glutamicum* (время импульса 4-5 мсек, напряженность электрического поля 12.5 кВ/см). После проведения электропорации к клеточной суспензии добавляли 1 мл среды SOC или ВН. Сразу после добавления среды для клеток *C. glutamicum* вводили стадию прогревания при 46°C в течение 6 минут. Клетки подращивали с аэрацией в течение 2 часов при 37°C для *E. coli* и 30°C для *C. glutamicum*, после чего суспензию высевали на чашки с агаризованной селективной средой. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C для *E. coli* и 30°C для *C. glutamicum*.

3.4.4. Конструирование штаммов *E. coli* с помощью λ Red-зависимой рекомбинации

Введение генетических модификаций в хромосому *E. coli* с помощью λ Red-зависимой системы рекомбинации проводили по методике [Datsenko K.A. et al., 2000] с модификациями [Sun W. et al., 2008]. Метод основан на гомологичной рекомбинации, происходящей между короткими гомологичными участками на хромосоме и линейным фрагментом, вводимым в клетку с помощью электропорации.

Введение делеций/инсерций производилось в два этапа:

1) На первом этапе в клетку вводилась кассета ДНК, содержащая ген устойчивости к антибиотику хлорамфениколу (*cat*) и ген чувствительности к сахарозе (*sacB*) [Reyrat J.M. et al., 1998]. По краям кассета содержала короткие области гомологии (50 п.н.) с хромосомой, по которым в последующем проходила рекомбинация. Кассету *cat-sacB* получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду pICA и праймеры, указанные в таблице 3.3 (Приложение А). В присутствии плазмиды pKD46, обеспечивающей клетку белками рекомбинации Red $\alpha\beta\delta$, в условиях индукции арабинозой, происходила интеграция фрагмента в хромосому за счет двух актов рекомбинации с замещением присутствовавшего в ней ранее гена (Рисунок 3.1а). При этом образовывались колонии, устойчивые к хлорамфениколу, но чувствительные к сахарозе. Для отбора клонов, чувствительных к сахарозе, использовали среду Sula следующего состава: 12 г/л триптон, 6 г/л дрожжевой экстракт, 60 г/л сахарозы, значение pH среды до 7,0. Наличие вставки подтверждали ПЦР.

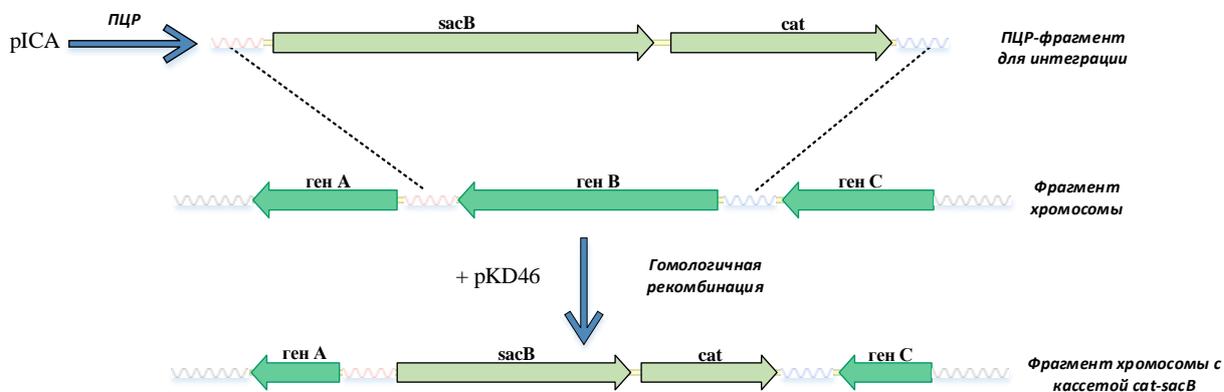
2) Второй этап рекомбинации проводили, если кассету *cat-sacB* требовалось удалить из хромосомы (Рисунок 3.1б) или если требовалось вставить новую последовательность (Рисунок 3.1в).

Для получения делеции кассеты *cat-sacB* использовали праймеры, имеющие частичную гомологию друг с другом. Праймеры отжигали друг на друге, получая при этом короткий ПЦР-фрагмент, который затем вводили в клетки с помощью электропорации. В присутствии плазмиды pKD46 в условиях индукции арабинозой, происходило замещение кассеты *cat-sacB* на короткий ПЦР-фрагмент. При этом образовывались колонии, устойчивые к сахарозе, которые отбирали на среде Sula. Удаление кассеты *cat-sacB* и наличие вставки подтверждали с помощью ПЦР.

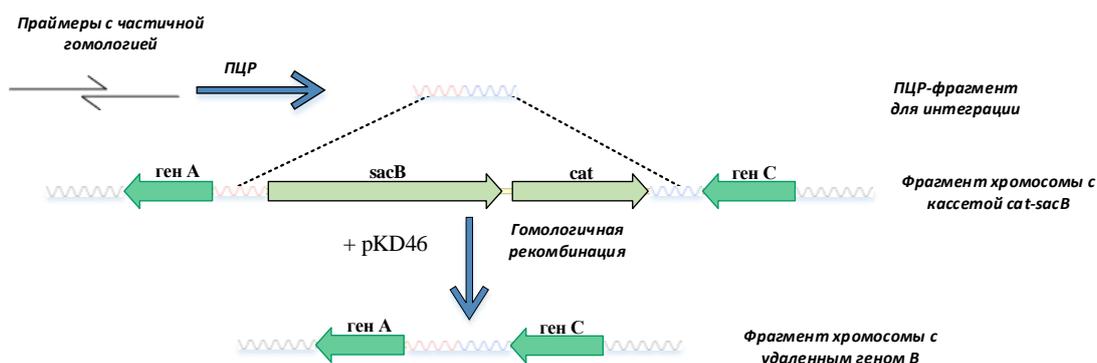
Для вставки новой генетической последовательности использовался фрагмент, содержащий нужную генетическую последовательность и имеющий по краям короткие области гомологии с хромосомой. При введении такого фрагмента в клетку в присутствии плазмиды pKD46 в условиях индукции арабинозой, происходило замещение кассеты *cat-*

sacB на данный фрагмент. При этом образовывались колонии, устойчивые к сахарозе, которые отбирали на среде Sula. Удаление кассеты *cat-sacB* и наличие вставки подтверждали с помощью ПЦР.

а)



б)



в)

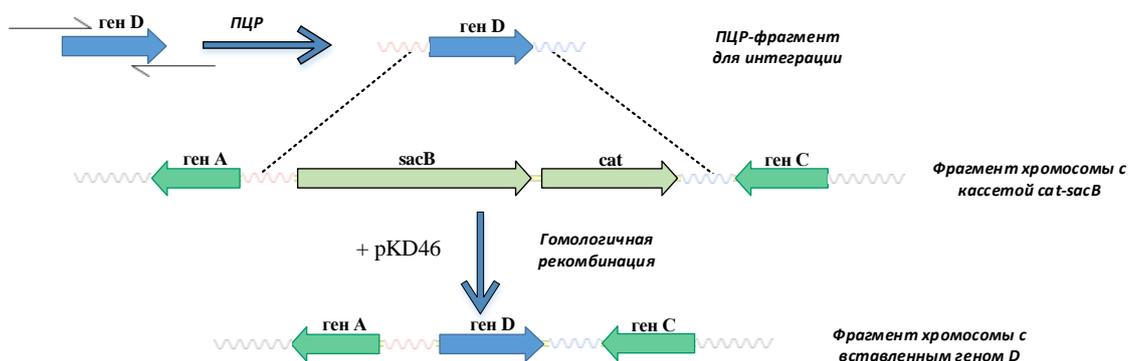


Рисунок 3.1. Схема введения мутаций в хромосому *E. coli*. а) первый этап – вставка кассеты *cat-sacB* в интересующую область; б) второй этап – удаление кассеты *cat-sacB* и создание делеции; в) второй этап – удаление кассеты *cat-sacB* и вставка гена. Плазмиды: pICA – плазмида для наработки фрагмента *cat-sacB* для интеграции; pKD46 –

вспомогательная плазида для гомологичной рекомбинации. Гены: *sacB* - ген левансахаразы (чувствительность к сахарозе); *cat* - ген устойчивости к хлорамфениколу; *bla* – ген устойчивости к ампициллину. Спиралями обозначены гомологичные участки, по которым проходит рекомбинация.

3.5. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами

3.5.1. Выделение тотальной ДНК

Для выделения тотальной ДНК бактериальную культуру заседали в 10 мл среды LB или 2 LB с добавлением мальтозы и инкубировали при 30-37°C и перемешивании 300 об/мин в течение 16 часов. Клеточную суспензию отделяли от культуральной среды с помощью центрифугирования (4°C, 5 мин, 3200*g). Осадок клеток растворяли в 200 мкл 0,5 М ацетата аммония и после выдерживания 10 минут при комнатной температуре центрифугировали (25°C, 1 мин, 12000*g). Осадок клеток ресуспендировали в 600 мкл лизирующего раствора (10 мМ ЭДТА, 1% SDS) и выдерживали суспензию при 65°C в течение 10 минут. После выдерживания к смеси добавляли 200 мкл 7,5 М ацетата аммония и 100 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1). Смесь центрифугировали (25°C, 15 мин, 12000*g) и далее проводили переосаждения изопропиловым спиртом как это описано в [Green M.R. et al., 2012]

3.5.2. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК бактериальную культуру *E.coli* заседали в 10 мл среды LB с добавлением селективного антибиотика и инкубировали при 30-37°C и перемешивании 300 об/мин в течение 16 часов. Клеточную суспензию отделяли от культуральной среды с помощью центрифугирования (4°C, 5 мин, 3200*g). Осадок клеток растворяли в 300 мкл SQ и добавляли 300 мкл щелочного лизирующего раствора (0,2 н NaOH, 1% SDS). После выдерживания 5 минут при комнатной температуре добавляли 450 мкл 3М ацетата натрия и убирали пробы в лед на 15 минут. Пробы центрифугировали (4°C, 15 мин, 12000*g) и после добавления к супернатанту равного объема изопропилового спирта пробы убирали на 15 минут в лед. Пробы центрифугировали (4°C, 15 мин, 12000*g) и осадок сушили.

После высушивания осадок растворяли в 200 мкл SQ и добавляли 200 мкл 6 М ацетата аммония. После выдерживания пробирок при -20°C в течение 15 минут, пробы центрифугировали (4°C, 15 мин, 12000*g) и супернатант переносили в новую пробирку.

Далее проводили пересаживание этиловым спиртом как это описано в [Green M.R. et al., 2012]

3.5.3. Выделение РНК

Для выделения РНК биомассу *E. coli* выращивали в среде LB до достижения первой половины лог-фазы. Клетки осаждали центрифугированием (4°C, 10 мин, 3000*g) и гомогенизировали в QIAzol Lysis Reagent («Qiagen», Германия). Выдерживали 5 минут при 25°C и добавляли 1/5 V хлороформа. Смесь энергично встряхивали и центрифугировали (4°C, 15 мин, 12000*g). Верхнюю фазу отбирали в отдельную пробирку и проводили дальнейшее выделение с использованием стандартных методик набора RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для удаления контаминирующей геномной ДНК использовали ДНКазу I («ThermoFisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

3.5.4. Очистка фрагментов ДНК

Очистка ДНК из реакционной смеси (амплификация, рестрикция, лигирование) проводили с использованием коммерческих наборов GeneJet PCR Purification Kit («ThermoFisher Scientific», США) согласно рекомендациям производителя. Выделение фрагментов ДНК из геля проводили с помощью коммерческих наборов GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», США) согласно рекомендациям производителя.

3.5.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для амплификации ДНК использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводилась на амплификаторе Mastercycler pro S («Eppendorf», США). Для наработки фрагментов для клонирования реакционная смесь содержала: 1x Phusion HF Buffer («Thermo Scientific», США) с добавлением MgCl₂ до конечной концентрации 1 мМ в реакционной смеси, 200 мкМ каждого dNTP, 500 нМ каждого из олигонуклеотидных праймеров, 3% DMSO и 2 ед. Phusion-полимеразы, а также матричную ДНК в количестве от 1 до 100 нг на 100 мкл смеси. Температуру отжига праймеров T_m рассчитывали в программе OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., США). В отдельных случаях оптимальную температуру отжига пары праймеров подбирали с использованием технологии температурного градиента.

Стандартная программа реакции амплификации выглядела следующим образом:

	98 ⁰ С - 2'
25-35 циклов	98 ⁰ С - 20''
	Tm ⁰ С - 20''
	72 ⁰ С - 1'' (на 2000 п.о.)
	72 ⁰ С - 2'

3.5.6. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для определения количества и длины полученных фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле. Агарозу («Carl Roth», Германия) плавил в электрофорезном буфере ТАЕ (Tris-ацетат 40 мМ, EDTA 1 мМ, рН=7,6), после застывания гель использовали для разделения фрагментов ДНК. Электрофорез проводили в электрофорезной ванночке с ТАЕ-буфером. Пробы ДНК наносили в лунки геля с добавлением красителя «6X Loading Dye» («ThermoFisher Scientific», США). В качестве маркера использовали коммерчески доступный «GeneRuler Mix» («ThermoFisher Scientific», США). Электрофорез проводили при напряжении 5-7,5 В/см.

3.5.7. Количественная оценка ДНК, РНК

Ориентировочную концентрацию ДНК или РНК в пробе определяли спектрофотометрически на приборе NanoVue Plus («BioChrom», США) по инструкции производителя. Следили за соотношением $A_{260}/A_{280} \geq 1,8-2,0$.

3.5.8. Рестрикция и лигирование

Для проведения реакции рестрикции ампликонов и плазмид использовали эндонуклеазы рестрикции серии Fast Digest («ThermoFisher Scientific», США) с укороченным временем реакции. Реакцию проводили при 37⁰С в течение 20 минут согласно рекомендациям производителя, после чего проводили термоинактивацию. Фрагменты ДНК после реакции очищали с использованием наборов, описанных в Разделе 3.5.4.

Лигирование фрагментов ДНК после рестрикции проводили с использованием ДНК-лигазы Т4 («ThermoFisher Scientific», США). Реакционная смесь содержала: 1X Т4 DNA Ligase buffer, 5% раствор PEG4000, 0,33 мг/мл BSA, 5 мМ АТФ, 5 ед. Т4 DNA Ligase, 20-100 нг линейного плазмидного вектора и ДНК фрагмент для вставки. Молярное соотношение плазмиды:фрагмент при лигировании составляло 1:5. Реакцию проводили при температуре

16°C в течение 12 часов, после чего проводили термоинактивацию фермента при 65°C в течение 10 минут.

3.5.9. Проведение реакции обратной транскрипции, и амплификация ДНК в режиме реального времени

Реакцию синтеза кДНК по матрице выделенной РНК проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Реакцию амплификации ДНК в режиме реального времени проводили с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия) на приборе Applied Biosystems 7500 Fast («Applied Biosystems», США).

Конечная реакционная смесь содержала: 0,5X смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX, 0,5 мкМ каждого из олигонуклеотидов, а также кДНК в количестве 10 нг на 100 мкл смеси.

Стандартная программа реакции амплификации выглядела следующим образом:

	95 ⁰ C - 5'
40 циклов	95 ⁰ C - 30''
	T _m ⁰ C - 20''
	72 ⁰ C - 30''
	95 ⁰ C - 15''
Градиент температуры плавления	60 ⁰ C - 95 ⁰ C-5''

Для амплификации использовались праймеры, указанные в Таблице 3.3 (Приложение А).

Расчет уровня экспрессии и температур плавления проводился с использованием коммерческой программы Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System («ThermoFisher Scientific», США). Анализ относительного уровня экспрессии проводился по крайней мере в трех независимых повторах.

3.5.10. Секвенирование фрагментов ДНК

Секвенирование использовалось для подтверждения структуры вводимых модификаций и проводилось с помощью автоматического секвенатора SEQ8000 («Beckman Coulter», США) в ЦКП ФГУП «ГосНИИгенетика».

3.6. Манипуляции с белками

3.6.1. Измерение количества белка

Определение количества белка проводили по методу Бредфорда [Bradford M.M., 1976] с помощью Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad», США). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по BSA.

3.6.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Анализ общей и растворимой фракции белков проводили по [Laemmli U.K., 1970] в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Состав разделяющего геля: 375 мМ Tris-Cl, 0,1% SDS, 12% акриламид, pH = 8,8. Состав концентрирующего геля: 125 мМ Tris-Cl, 0,1% SDS, 5% акриламид, pH= 6,8. Раствор 30% акриламида готовили в соотношении 29,2% акриламида и 0,8% метилен-бисакриламида. Для полимеризации добавляли 0,1% персульфата аммония и 0,4 мкл/мл TEMED. В камеру заливали разделяющий гель; после его полимеризации сверху заливали концентрирующий гель. Пробы лизата или белка в количестве 10-30 мкг смешивали с 5X Protein Loading Buffer («ThermoFisher Scientific», США) и вносили в карманы геля. Состав электродного буфера: 25 мМ Tris base, 192 мМ глицина, 0,1% SDS, pH = 8,3. Электрофорез проводили по напряженности по концентрирующему гелю 8 В/см, по разделяющему гелю 15 В/см.

По окончании электрофореза гель помещали на ночь в окрашивающий раствор следующего состава: 0,25 г Coomassie Blue R250, 45% метанол, 10% уксусная кислота. После окрашивания гель отмывали в 7% уксусной кислоте при нагревании.

3.7. Определение аспартазной активности

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

Для определения аспартазной активности на клетках клетки собирали центрифугированием (4°C , 10 мин, 3000*g) и ресуспендировали в 500 мкл 1 М раствора fumarата аммония (pH=8,0). Оптическую плотность клеток определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu corporation», Япония) при 600 нм. Для повышения проницаемости клеточной стенки к суспензии добавляли этилацетат до конечной концентрации 4,5% и выдерживали смесь при 37 °С в течение 45 мин. Затем к 0,1 мл

клеточной суспензии добавляли 0,9 мл 1 М раствора фумарата аммония и смесь инкубировали при 37 °С в течение 10 минут. Полученную смесь центрифугировали и в супернатанте определяли содержание L-аспарагиновой кислоты спектрофотометрическим методом после реакции с нингидрином. В качестве контроля использовали образец, в котором к 0,1 мл активированной клеточной суспензии добавляли 0,9 мл дистиллированной воды.

Для определения аспартазной активности на бесклеточных экстрактах клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере, рН = 7,0. Суспензию клеток разрушали с помощью ультразвука при 4 °С в режиме: 30 сек озвучивания, 30 сек охлаждения во льду, 5 циклов. Осадок удаляли центрифугированием и к 0,1 мл супернатанта добавляли 0,9 мл 1 М раствора фумарата аммония (рН=8,0). Смесь инкубировали при 37 °С в течение 10 минут. Полученный раствор использовали для определения содержания аспарагиновой кислоты спектрофотометрическим методом после реакции с нингидрином. В качестве контроля использовали образец, в котором к 0,1 мл супернатанта добавляли 0,9 мл дистиллированной воды.

Для определения аспарагиновой кислоты спектрофотометрическим методом, раствор, содержащий аспарагиновую кислоту разводили в 20-200 раз. К 2 мл разведенного раствора добавляли 1 мл раствора нингидрина и кипятили его в течение 3 минут, после чего охлаждали во льду. После охлаждения измеряли оптическую плотность при 510 нм.

Концентрацию аспарагиновой кислоты вычисляли по формуле:

$$C = \frac{D_p \cdot C_{ст} \cdot n}{D_{ст}}$$

где D_p – оптическая плотность разведенной пробы;

$D_{ст}$ – оптическая плотность стандартного раствора аспарагиновой кислоты;

$C_{ст}$ – концентрация аспарагиновой кислоты в стандартном растворе, мг/мл;

n – разведение пробы

Удельную аспартазную активность клеток выражали в мкМ аспарагиновой кислоты, образованной 1 мг клеток (по сухому весу) за 1 минуту. Удельную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$A_{уд} = \frac{(C - C_0) \cdot 1000}{M * D * P * t}$$

где C – концентрация аспарагиновой кислоты в реакционной смеси после окончания реакции трансформации в испытуемом растворе, мг/мл;

C_0 – концентрация аспарагиновой кислоты в контрольном растворе, мг/мл;

M – молярная масса аспарагиновой кислоты, г/моль;

D – оптическая плотность клеточной суспензии, пошедшей в трансформацию, ед;

P – вес 1 мл клеток с $ОП_{600} = 1$, высушенных до постоянного веса, мг;

t – продолжительность трансформации, мин.

Удельную аспартазную активность бесклеточных экстрактов выражали в мкМ аспарагиновой кислоты, образованной 1 мг белка за 1 минуту. Удельную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$A_{уд} = \frac{(C - C_0) \cdot 1000}{M * P * t}$$

где C – концентрация аспарагиновой кислоты в реакционной смеси после окончания реакции трансформации в испытуемом растворе, мг/мл;

C_0 – концентрация аспарагиновой кислоты в контрольном растворе, мг/мл;

M – молярная масса аспарагиновой кислоты, г/моль;

P – количество белка, взятое в реакцию трансформации, мг;

t – продолжительность трансформации, мин

3.8. Определение константы Михаэлиса

Определение константы Михаэлиса проводилось по реакции образования фумарата при взаимодействии аспарагиновой кислоты с аспартазой.

Клетки, содержащие аспартазу собирали центрифугированием и ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере, рН = 7,0. Суспензию клеток разрушали с помощью ультразвука при 4°C в режиме: 30 сек озвучивания, 30 сек охлаждения во льду, 5 циклов. Осадок удаляли центрифугированием и бесклеточные экстракты, разведенные в 6-60 раз, использовали в дальнейшем определении.

К 160 мкл раствора L-аспарагиновой кислоты с различными концентрациями добавляли 40 мкл разведенного бесклеточного экстракта. Следили за ростом поглощения при 240 нм при 25°C. Измерение проводили на микропланшетном ридере Tecan Safire²

(«ThermoFisher Scientific», США). В качестве контроля использовали образец, в котором к 160 мкл аспарагиновой кислоты добавляли 40 мкл дистиллированной воды. По полученным данным строили график зависимости поглощения от концентрации фумаровой кислоты.

3.9. Определение содержания органических кислот методом ВЭЖХ

Определение содержания органических кислот проводили методом ВЭЖХ в ЦКП ФГУП «ГосНИИгенетика» на приборе Separations Module Waters 2695 («Alliance», США) с использованием колонок типа YMC-Triart C18 (5 мкм, 12 нм, 250 × 4.6 мм). Анализируемую смесь разводили водой в 20 раз и центрифугировали (4°C, 5 мин, 30000*g). 0,9 мл супернатанта переносили в пробирки и анализировали на ВЭЖХ при следующих условиях: элюент – 0,1%-ная H₃PO₄, скорость потока – 1,0 мл/мин, температура колонки – 30°, λ – 210 нм, время анализа – 20 мин. Прием и обработку данных производили с использованием компьютерной системы Empower Pro («Alliance», США).

3.10. Иммуобилизация клеток *E. coli*

Иммуобилизацию клеток *E. coli* для получения биокатализатора синтеза L-аспарагиновой кислоты проводили в ЗАО «Биоамид». Иммуобилизация проводилась в двух носителях: в сшитый полиэтиленимин и сшитый полиакриламид.

Для иммуобилизации в сшитый полиэтиленимин 10 г открученной и предварительно промытой в физиологическом растворе биомассы клеток помещали в стеклянный стакан и добавляли 11 г 1% раствора хлорида натрия. При перемешивании добавляли 5 г 20% раствора полиэтиленимина («BASF», Германия), предварительно нейтрализованного соляной кислотой до pH 7,5. После добавляли 3 г 25% раствора глутарового альдегида («Panreac», Испания). После затвердевания смесь измельчали и подсушивали до остаточной влажности 65-75%. Полученный биокатализатор просеивали через сито, оставляя фракцию 0,5-1,5 мм, которую выдерживали в 20% растворе ацетата аммония в течение 24 часов при 5°C. Полученный таким образом биокатализатор использовали в дальнейшем.

Для иммуобилизации в сшитый полиакриламид готовили отмытую клеточную суспензию с ОП₆₀₀=130 ед. К 140 г кристаллического акриламида («Sigma-Aldrich», США) добавляли 7,4 г метилен-бис-акриламида («Sigma-Aldrich», США) и 200 мл дистиллированной воды. Далее к 450 мл клеточной суспензии добавляли 150 мл раствора мономеров; для начала полимеризации добавляли 7,5 мл 10% TEMED («Sigma-Aldrich», США) и 10 мл 10% раствора персульфата аммония («Sigma-Aldrich», США). Раствор охлаждали до температуры 0-5°C и выдерживали 1 час. Полученный гель измельчали до

размера частиц 1-2 мм и отмывали физиологическим раствором. Полученный биокатализатор использовали в дальнейшей работе.

3.11. Биоинформатические методы

Последовательности белков и генов были получены из различных баз данных: GenBank NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>], UniProt [<http://www.uniprot.org>], KEGG [<http://www.genome.jp/kegg/>].

Гомологию нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследовали в программе BLAST [Johnson M. et al., 2008].

Выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega [Sievers F. et al., 2011].

Выбор праймеров для ПЦР в реальном времени проводили с помощью в программе OligoAnaluzer 3.1 [Owczarzy R. et al., 2008].

Результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей анализировались в программах BioEdit [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>] и SnapGene Viewer [<http://www.snapgene.com>].

Глава 4. Результаты и обсуждение

4.1. Клонирование и экспрессия генов аспартаз из различных источников.

Сравнительное исследование каталитических свойств разных аспартаз

Объектами настоящей работы являлись аспартазы из бактерий *E. coli*, *Bacillus sp.* УМ55-1 и *Corynebacterium glutamicum*. Выбор этих аспартаз в качестве объектов исследований обусловлен уникальностью штаммов, служащих источником выделения этих ферментов: штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 применяется в настоящее время в России для промышленного получения аспарагиновой кислоты; штамм *Bacillus sp.* УМ55-1 содержит уникальную по каталитическим свойствам аспартазу, а штаммы *Corynebacterium glutamicum* применяются для производства аминокислоты лизина. Клонирование генов аспартаз из различных источников и их сравнительное исследование является первым и необходимым шагом для использования аспартаз в биотехнологиях.

4.1.1. Клонирование и секвенирование гена аспартазы из *Escherichia coli* ВКПМ В-7188

Штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 является природным штаммом, ранее не подвергавшимся генетическим манипуляциям. Этот штамм обладает высокой аспартазной активностью и в настоящее время используется в качестве биокатализатора для получения L-аспарагиновой кислоты (ЗАО «Биоамид»). С целью повышения аспартазной активности этого штамма представляло значительный интерес исследовать аспартазу из этого штамма на генетическом уровне.

4.1.1.1. Таксономическое положение штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 на основе анализа 16S рРНК

Ранее, на основании морфологических и физиологических свойств штамм ВКПМ В-7188 был отнесен к виду *E. coli* [Синолицкий М.К. и др., 2001] [Кондратьева Е.Н. и др., 1979]. Для подтверждения этих данных был проведен молекулярно-генетический анализ гена 16S-рРНК. ПЦР проводили с использованием пары праймеров F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') и R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). В качестве матрицы для ПЦР использовалась хромосомная ДНК, выделенная как описано в разделе 3.5.1. Последующее секвенирование проводили с использованием полученных фрагментов в ЦКП ФГУП «ГосНИИгенетика».

Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что ген 16S-pPHK из *E. coli* ВКПМ В-7188 на 99% идентичен генам 16S-pPHK из штаммов W3310 и KO11FL. Выявлено только 9 отличий в последовательностях генов 16S-pPHK исследуемого штамма и штаммов W3310 и KO11FL. Таким образом, результаты молекулярно-биологической идентификации штамма ВКПМ В-7188 подтвердили ранее проведенные морфологические и физиологические тесты и позволили отнести изучаемый штамм к виду *Escherichia coli* группе производных штамма К-12.

4.1.1.2. Изучение структуры локуса гена аспартазы из *E. coli* ВКПМ В-7188

В качестве основного подхода для изучения структуры локуса гена аспартазы из штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 была выбрана стратегия ПЦР амплификации фрагментов ДНК с их последующим секвенированием.

На основании анализа баз данных мы выяснили, что в хромосоме бактерий *E. coli* ген *aspA* находится между генами дикарбоксилатного транспортера *dcuA* и мембранного белка *fxsA*. Мы предполагали, что и в случае штамма ВКПМ В-7188 ген *aspA* будет иметь подобную локализацию на хромосоме. Поэтому для амплификации фрагментов ДНК штамма *E. coli* ВКПМ В-7188, содержащих ген *aspA* и фланкирующие области, были использованы праймеры, соответствующие консервативным областям этих генов (Рисунок IV-1).

Выделение хромосомной ДНК из *E. coli* ВКПМ В-7188 и подготовку проб проводили как описано в разделе 3.5.1. ПЦР амплификация фрагментов проводилась с использованием праймеров D1-R (5'-CGGCTGGAAAAGTCTCTATGC-3') и D1-F(5'-GATGTTAGTCGGCGGGAA-3'). Полученный фрагмент размером 3830 пн был отдан на секвенирование. Секвенирование производилось с использованием праймеров, указанных в Таблице 3.3 (Приложение А). Стратегия секвенирования показана на Рисунке 4.1:

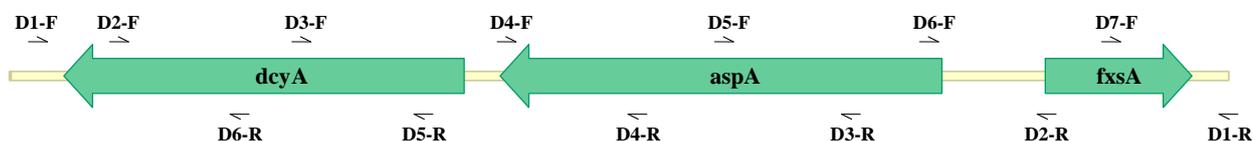


Рисунок 4.1. Стратегия клонирования и секвенирования ПЦР-фрагментов локуса гена *aspA*. Обозначения: *dcuA* – ген дикарбоксилатного транспортера; *aspA* – ген аспартазы; *fxsA* – ген мембранного белка. Черными стрелками обозначены праймеры, использованные в секвенировании.

Секвенирование показало, что хромосомный локус, контролирующий синтез аспартазы в *E. coli* ВКПМ-7188 имеет ту же структуру, что и локусы известных штаммов *E. coli*: ген аспартазы располагается между генами дикарбоксилатного транспортера *dcuA* и мембранного белка *fxsA*. Структурный белок аспартазы из ВКПМ-7188 был практически идентичен гомологам из разных 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].

4.1.1.3. Клонирование гена аспартазы из *E. coli* ВКПМ В-7188

Клонирование гена *aspA* из *E. coli* ВКПМ-7188 было осуществлено в клетках *E. coli* BLR(DE3) с помощью набора «aLICator LIC Cloning & Expression System» («Thermo Scientific», США). Для клонирования использовалась плазмида pLATE31, обеспечивающая экспрессию клонированного гена с промотора фага T7

Наработку фрагмента для клонирования проводили с помощью ПЦР-амплификации используя праймеры D.EC478-R (5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCTGTTTCGCTTTCATCAGTATAGC-3') и D.EC478-F (5'-AGAAGGAGATATAАСТАТGTCAAACAACATTCGTATCGAAGAAGATCTGTTGG-3').

Безлигазное клонирование проводилось в соответствии с рекомендациями производителя набора. Полученная плазмида, обозначенная pLATE31-aspA478, была трансформирована в штамм *E. coli* BLR(DE3). При этом был получен штамм, обозначенный *E. coli* pLATE31-aspA478.

4.1.2. Клонирование гена аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1

Известно, что штамм *Bacillus sp.* YM55-1 содержит уникальную аспартазу с высокой термостабильностью, активность которой не зависит от ионов двухвалентных металлов [Kawata Y. et al., 1999]. Известна последовательность гена, обозначенного *aspB*, контролирующего образование уникальной аспартазы [Kawata Y. et al., 2000] В научной литературе отсутствуют сведения о встречаемости гена *aspB* в других штаммах бацилл. Нами были предприняты попытки обнаружить гомолог аспартазы *aspB* в других штаммах бацилл. Для этого была использована коллекция штаммов *Bacillus*, выделенных из почв Москвы и Московской области. Стратегия скрининга включала поиск ферментов с высокой удельной активностью, а также поиск гомологов гена *aspB*. Результаты скрининга оказались

отрицательными. По-видимому, штамм *Bacillus sp.* YM55-1 является уникальным источником аспартазы *aspB*.

С учетом этого обстоятельства, было принято решение синтезировать копию гена *aspB in vitro*, используя информацию о последовательности гена из базы.

Синтез гена *aspB* был выполнен компанией ООО «АТГ Сервис Ген» (Санкт-Петербург, Россия) на коммерческой основе. Далее ген *aspB* был клонирован в составе плазмиды pLATE31 под контролем промотора фага T7 с помощью набора «aLICator LIC Cloning & Expression System» в соответствии с рекомендациями производителя. Нарботку фрагмента для клонирования проводили с помощью ПЦР-амплификации используя праймеры D.BS55-F (5'- AGAAGGAGATATAАСТАТГААТАССГАТГТТССГАТТГАГ -3') и D.BS55-R (5'- GTGGTGGTГАТGGTГАТGGССТТТТСТТССАГСААТТСССГ-3'). Полученная плазида, обозначенная pLATE31-*aspB*, была трансформирована в штамм *E. coli* BLR(DE3). При этом был получен штамм, обозначенный *E. coli* pLATE31- *aspB*.

4.1.3. Клонирование гена аспартазы из *Corynebacterium glutamicum*

Бактерии *Corynebacterium glutamicum* широко используются в биотехнологии, в первую очередь, как продуценты различных аминокислот. Представляло значительный интерес изучить свойства аспартазы из штаммов *C. glutamicum*, т.к. её активность может изменять содержание в клетке аспарагиновой кислоты, являющейся предшественником синтеза аминокислот аспарагинового семейства.

Источником гена аспартазы являлись штаммы *C. glutamicum* ATCC13032 (базовый штамм для конструирования продуцентов аминокислот) и *C. glutamicum* 90 (ранее известный как *Brevibacterium sp.* 90) – продуцент лизина, полученный с помощью мутагенеза.

На основании данных полногеномного секвенирования *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [GeneBank № NC_006958] были выбраны праймеры D.CG-F (5'- AGAAGGAGATATAАСТАТГТСТААГАССГАГСААССААГТС -3') и D.CG-R (5'- GTGGTGGTГАТGGTГАТGGССГТТСТССААГТАГАГССТТС-3') для клонирования гена *aspA* в составе плазмиды pLATE31 под контролем промотора фага T7. Безлигазное клонирование проводилось с помощью набора «aLICator LIC Cloning & Expression System» в соответствии с рекомендациями производителя. При этом были получены 2 плазмиды, обозначенные pLATE31-*aspA*13032 и pLATE31-*aspA*90. Плазмиды были трансформированы в штамм *E. coli* BLR(DE3), при этом полученные штаммы получили обозначение *E. coli* pLATE31-*aspA*13032 и *E. coli* pLATE31-*aspA*90.

4.1.4. Сравнительное исследование генов аспартаз из *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* YM55-1 и *Corynebacterium glutamicum*

Последовательности четырёх генов аспартаз, полученные на предыдущем этапе, были уточнены с помощью секвенирования и было проведено их сравнение с использованием программы Clustal-Omega.

Оказалось, что гены аспартазы из *C. glutamicum* 90 и *C. glutamicum* ATCC13032 были практически идентичны. Обнаружено лишь 4 отличия в нуклеотидных последовательностях (Рисунок 4.2). 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. Увеличенный размер гена аспартазы характерен для всех известных штаммов *Corynebacterium*, последовательности которых представлены в международных базах данных.

Ген аспартазы из *E. coli* обладал более высокой степенью гомологии с генами аспартаз из *Corynebacterium* (58%) чем с геном аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1 (53%). Также, в последовательностях всех изучаемых генов находились высококонсервативные участки (Рисунок 4.2).

Степень гомологии исследованных аспартаз по аминокислотным последовательностям составляла 36,1 - 40,6%. Аспартаза из *C. glutamicum* 90 отличалась от аспартазы из *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 одной аминокислотной заменой Ala377Thr. От других исследованных ферментов они отличались наличием на N-конце белка последовательности из 51 аминокислотного остатка (Рисунок 4.3). Аминокислоты, входящие в эту последовательность, обнаруживаются только у аспартаз из бактерий рода *Corynebacterium*.

По аминокислотным последовательностям уровень гомологии фермента из *E. coli* был больше с ферментами из *Corynebacterium* (56%), чем с ферментом из *Bacillus sp.* YM55-1 (47%). Аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1 отличалась от всех остальных исследованных аспартаз самым маленьким размером – 468 а.о.

Также 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.* YM55-1: на месте 188 аминокислоты вместо глутамина находится гистидин.

Bacillus sp. YM55-1 (1) -----
Escherichia coli BKIM B-7188 (1) -----
Corynebacterium glutamicum 90 (1) ATGTCTAAGACGAGCAACAAGTCTTCAGCAGACTCAAAGAATGACGCCAAAAGCCGAAGACATTGTGAACGGCGAGAACCAATCGCCACGAATGAGTCGG
Corynebacterium glutamicum 13032 (1) ATGTCTAAGACGAGCAACAAGTCTTCAGCAGACTCAAAGAATGACGCCAAAAGCCGAAGACATTGTGAACGGCGAGAACCAATCGCCACGAATGAGTCGG

Bacillus sp. YM55-1 (1) -----ATGAATACCGATGTTTCGTATTGAGAAAGACTTTTGGAGAAAAGGA
Escherichia coli BKIM B-7188 (1) -----ATGTCA-AACAACATTCGTATCGAAGAAGATCTGTTGGGTACCAGGGA
Corynebacterium glutamicum 90 (101) AGTCTTCAGACAGCGCTGCAGTTTCGGAACGTGTCGTCGAACCAAAAACCACGGTTTCAGAAAAGTTCCGAATCGAATCGGATCTGCTTGGTGAACCTCA
Corynebacterium glutamicum 13032 (101) AGTCTTCAGACAGCGCTGCAGTTTCGGAACGTGTCGTCGAACCAAAAACCACGGTTTCAGAAAAGTTCCGAATCGAATCGGATCTGCTTGGTGAACCTCA

Bacillus sp. YM55-1 (48) GATTCCGAAAGACGCTTATTATGGCGTACAAACAATTCGGGCAACGGAAAAATTTCCAATTACAGGTTATCGTATTCAT-----CCAGAATTAATTAAA
Escherichia coli BKIM B-7188 (48) AGTTCAGCTGATGCCTACTATGGTGTTCACACTCTGAGAGCGATTGAAAACCTTCTATATCAGCAACAACAAAATCAGTGATATTCCTGAATTTGTTTCGC
Corynebacterium glutamicum 90 (201) GATCCCATCCCAACGCATATTACGGGGTGCACACCCTTCGTGCGGTGGACAACTTCCAAATCTCACGAACCACCATCAATCAGTCCAGATTTCATTCGC
Corynebacterium glutamicum 13032 (201) GATCCCATCCCAACGCATATTACGGGGTGCACACCCTTCGTGCGGTGGACAACTTCCAAATCTCACGAACCACCATCAACCACGTCAGATTTCATTCGC

Bacillus sp. YM55-1 (142) TCACTAGGGATTGTAAAAAATCAGCCGCATTAGCAAACATGGAAGTTGGCTTACTCGATAAAGAAGTTGGCAATATATCGTAAAAAGCTGCTGACGAAG
Escherichia coli BKIM B-7188 (148) GGTATGTAATGTTAAAAAAGCCGCAGCTATGGCAAACAAAGAGCTGCAAACCAATTCTAAAAAGTGTAGCGAATGCCATCATTTGCCGCATGTGATGAAG
Corynebacterium glutamicum 90 (301) GGCATGTTCCAGGTGAAAAAGGCCGCAGCTTTAGCAAACCGCCGACTGCACACACTTCCAGCACAAAAGCAGAAGCAATTTGCTGGGCTTGTGATCAGA
Corynebacterium glutamicum 13032 (301) GGCATGTTCCAGGTGAAAAAGGCCGCAGCTTTAGCAAACCGCCGACTGCACACACTTCCAGCACAAAAGCAGAAGCAATTTGCTGGGCTTGTGATCAGA

Bacillus sp. YM55-1 (242) T---GATTGAAGAAAAATGGAATGATCAATTTATTGTTGACCCAATTCAAGGCGGGGCGAGGAACCTGCATTAAATATGAATGCAATGAAGTATTGGTAA
Escherichia coli BKIM B-7188 (248) TCCTGAACAACGGAAAAATGCATGGATCAGTTCCCGGTAGACGCTTACCAGGGCGGGCGAGGTAACCTCCGTAAACATGAACACCAACGAAGTCTGGGCCAA
Corynebacterium glutamicum 90 (401) TCCTCAATTGAGGAACGCTGTATGGATCAGTTCCCAATCGATGTGTTCCAGGGTGGCGCAGGTACCTCACTGAACATGAACACCAACGAGGTTGTTGCCAA
Corynebacterium glutamicum 13032 (401) TCCTCAATTGAGGAACGCTGTATGGATCAGTTCCCAATCGATGTGTTCCAGGGTGGCGCAGGTACCTCACTGAACATGAACACCAACGAGGTTGTTGCCAA

Bacillus sp. YM55-1 (339) CCGCGCATTAGAATTAATGGGAGAGGAAAAAGGAAACTATTCAAAAATAGTCCAAACTCCCATGTAATAATGTTCTCAATCAACAACAGATGCTTTCCCT
Escherichia coli BKIM B-7188 (348) TATCGGTCTGGAAGTATGGGTCACCAAAAAGGTGAATATCAGTACCTGAACCCGAACGACCATGTTAACAATATGTCAGTCCACTAACGACGCCCTACCCG
Corynebacterium glutamicum 90 (501) CCTTGCACCTGAGTTCTTAGGCCATGAAAAGGGCGAGTACCACATCTGCACCCATGGATGATGTGAACATGTCCAGTCCACCAACGATTCCTACCCA
Corynebacterium glutamicum 13032 (501) CCTTGCACCTGAGTTCTTAGGCCATGAAAAGGGCGAGTACCACATCTGCACCCATGGATGATGTGAACATGTCCAGTCCACCAACGATTCCTACCCA

Bacillus sp. YM55-1 (439) ACTGCAACGCATATTGCTGTGTTAAGTTTATTAAATCAATTAATTGAAACTACAAATACATGCAACAAGAAATTCATGAAAAAGCAGATGAATTCGCTG
Escherichia coli BKIM B-7188 (448) ACCGGTTTCCGTATCGCAGTTTACTCTTCCCTGATTAAGCTGGTAGATGCGATTAAACAACCTGCGTGAAGGCTTTGAACGTAAAGCTGTGCGAATTCAGG
Corynebacterium glutamicum 90 (601) ACTGGTTTCCGCTGGGCATTTACGCTGGACTGCAGACCTCATCGTGAATTTGATGAGCTTCAGGTTGCGTTCCGCCACAAGGGCAATGAGTTTGTGC
Corynebacterium glutamicum 13032 (601) ACTGGTTTCCGCTGGGCATTTACGCTGGACTGCAGACCTCATCGTGAATTTGATGAGCTTCAGGTTGCGTTCCGCCACAAGGGCAATGAGTTTGTGC

Bacillus sp. YM55-1 (539) GCGTATTAAAAATGGGAGAACGCCACTTGCAAGACGCTGTTCCATTTTATTAGGACAAGAGTTTGAAGCATATGCTCGTGTAAATGCCCCGGA--TATT
Escherichia coli BKIM B-7188 (548) ACATCCCTGAAAAATGGGTCGTACCCAGCTGCAGGACGACGATACCGATGACCCCTCGGTGAGGAATTCGCGCTTTCAGCATCCTGCTGAAAGAGAAGTGAA
Corynebacterium glutamicum 90 (701) ACATCAITCAAGATGGGCGCACCCAGTTGCAGGATGCTGTTCCCATGAGCTTGGGCGAAGAGTTCCGAGCATTCGCGCACAACTCGCAGAAGA---GCA
Corynebacterium glutamicum 13032 (701) ACATCAITCAAGATGGGCGCACCCAGTTGCAGGATGCTGTTCCCATGAGCTTGGGCGAAGAGTTCCGAGCATTCGCGCACAACTCGCAGAAGA---GCA

Bacillus sp. YM55-1 (637) GAACTATTGCCAATACGAGA-AACAATTTATACGACATCAACATGGGTGCAACAGCAGTCGGCCTGCTTAAATGCAGATCTGAAATAATAAGCATC
Escherichia coli BKIM B-7188 (648) AAACATCCAACGTACCGCTG--AACTG-CTGCTGGAAGTTAACCTTGGTGAACAGCAATCCGTTACTGGTCTGAACACGCCGAAAGAGTACTCTCCGCTG
Corynebacterium glutamicum 90 (798) GACCGTGTCTCGTGAAGCTGCCAACCGCTCTCCTCAGGTTCAACCTTGGTGAACCGCAATCCGTTACTGGTGTGAACACTCCAGCAGGCTACCGCCACCG
Corynebacterium glutamicum 13032 (798) GACCGTGTCTCGTGAAGCTGCCAACCGCTCTCCTCAGGTTCAACCTTGGTGAACCGCAATCCGTTACTGGTGTGAACACTCCAGCAGGCTACCGCCACCG

Bacillus sp. YM55-1 (736) GTAACAGAACATTAGCAAATTCAGCGGACATCCATTAAGAAGTGCACAACATTTAGTGGACGCAACTCAAAAATACAGACTGCTATACAGAAATTTCTT
Escherichia coli BKPM B-7188 (745) GCAGTGAAAAAAGTGGCTGAAGTTACTGGCTTCCATGCGTACCGGCTGAAGACCTGATCGAAGCGACTCTGACTGCGGGCTTATGTTATGTTTCAG
Corynebacterium glutamicum 90 (898) GTTGTGCGTGTCTGTCTGAGGTACCCGGACTGGAACTAAAGTCCGCAGTGTCTCATGAGGCTACCTCTGACACCGGTGCATATGTTTCATCGGCACT
Corynebacterium glutamicum 13032 (898) GTTGTGCGTGTCTGTCTGAGGTACCCGGACTGGAACTAAAGTCCGCAGTGTCTCATGAGGCTACCTCTGACACCGGTGCATATGTTTCATCGGCACT

Bacillus sp. YM55-1 (836) CTGCATTAAAAGTTTGCATGATCAACATGTC TAAAATTGCCAATGATTACGCCTTAATGGCATCTGGACCACGCGCAGGCTTATCAGAAATCGTTCTTCC
Escherichia coli BKPM B-7188 (845) GCGCGCTGAAACGCTGGCTGTGAAGATGTC CAAAATCTGTAAACGACCTGCGCTTGGCTCTCTCAGGCCACGTGCCGGCTGAACGAGATCAACCTGCC
Corynebacterium glutamicum 90 (998) CCGCAATCAAGCGTGCAGCCATGAAACTGTCCAAGATCTGTAAACGATCTACGCTGCTGTCTTCTGGTCTCTCGTGGCTGAACGAAATCAACCTGCC
Corynebacterium glutamicum 13032 (998) CCGCAATCAAGCGTGCAGCCATGAAACTGTCCAAGATCTGTAAACGATCTACGCTGCTGTCTTCTGGTCTCTCGTGGCTGAACGAAATCAACCTGCC

Bacillus sp. YM55-1 (936) TGCTCGACAACCTGGATCTTCTATCATGCTGGTAAAGTGAATCCTGTATGCCAGAAGTGATGAACCAAGTGGCATTCCAAGTGTTCGGTAAATGATTTA
Escherichia coli BKPM B-7188 (945) GGAACCTGCAGGCGGCTCTTCCATCATGCCAGCTAAAGTAAACCCGGTGTCCCGGAAGTGGTTAACCAGGTATGCTTCAAAGTCATCGGTAACGACACC
Corynebacterium glutamicum 90 (1098) ACCACGCCAGGCTGGTTCCTCCATCATGCCAACCAAGGTCAACCCAGTGATCCAGAAGTGGTCAACCAGGTCTGCTTCAAAGTCTTCGGTAAACGATCTC
Corynebacterium glutamicum 13032 (1098) ACCACGCCAGGCTGGTTCCTCCATCATGCCAACCAAGGTCAACCCAGTGATCCAGAAGTGGTCAACCAGGTCTGCTTCAAAGTCTTCGGTAAACGATCTC

Bacillus sp. YM55-1 (1036) ACAATTACATCTGTTCTGAAGCAGGCCAATTTGAATTAATGTGATGGAACCTGTGTATTCTTCAATTTAATTCATTCGATTTTCGATATGACTAATG
Escherichia coli BKPM B-7188 (1045) ACTGTTACCATGGCAGCAGAAGCAGGTGAGCTGCAGTTGAACGTTATGGAGCCGGTCAATGGCCAGGCCATGTTGCAATCCGTTTCACATTCGACCAACG
Corynebacterium glutamicum 90 (1198) ACCGTACCATGGCTGCGGAAGCTGGCCAGTTGCAGCTCAACGTATGGAGCCAGTCAATGGGAATCCCTCTCCAGTCACTGCGCATCCTGGGCAATG
Corynebacterium glutamicum 13032 (1198) ACCGTACCATGGCTGCGGAAGCTGGCCAGTTGCAGCTCAACGTATGGAGCCAGTCAATGGGAATCCCTCTCCAGTCACTGCGCATCCTGGGCAATG

Bacillus sp. YM55-1 (1136) TCTTTAATCCTTTACAGAAAATGCTTAAAAGGTATTAAGGCAAAATGAAGAACGCATGAAAATAATGTTGAGAAAAGCATTGGAATCATTACTGCAAT
Escherichia coli BKPM B-7188 (1145) CTTGCTACAACCTGCTGGAAAAATGCATTAACGGCATCACTGCTAACAAAGAAGTGTGCGAAGGTTACGTTTACAACCTCTATCGGTATCGTTACTTACCT
Corynebacterium glutamicum 90 (1298) CAGCCAAGACTTTGCGTGAGAAGTGGTTCGTAGGAATCACCGCAACGCTGATGTTTGGCGTCTTACGTTGATAACTCCATCGGGATTATCACTTACCT
Corynebacterium glutamicum 13032 (1298) CAGCCAAGACTTTGCGTGAGAAGTGGTTCGTAGGAATCACCGCAACGCTGATGTTTGGCGTCTTACGTTGATAACTCCATCGGGATTATCACTTACCT

Bacillus sp. YM55-1 (1236) TAACCCACATGTAGGCTATGAAACAGCTG CAAAATTAGCACGTGAAGCATATCTTACAGGGGAATCCATCCGTGAACCTTGCATTAAGTATGGCGTATTA
Escherichia coli BKPM B-7188 (1245) GAACCCGTTCATCGGTCAACACACCGGTGACATCGTGGTAAAATCTGTGCCGAAACCGGTAAGAGTGTACGTGAAGTCGTTCTGGAACGCGGTCTGTG
Corynebacterium glutamicum 90 (1398) GAACCCATTCCTGGGCCACGACATTTGAGATCAGATCGGTAAGGAAGCAGCCGAAACTGGTCGACCAGTGCCTGAACCTCATCTGGAAAAGAAGCTCATG
Corynebacterium glutamicum 13032 (1398) GAACCCATTCCTGGGCCACGACATTTGAGATCAGATCGGTAAGGAAGCAGCCGAAACTGGTCGACCAGTGCCTGAACCTCATCTGGAAAAGAAGCTCATG

Bacillus sp. YM55-1 (1336) ACAGAAAGAACAGTTAAATGAAATCTTAAATCCATATGAAATGACACATCCGGGAATTGCTGGAAAGAAA-----TAA
Escherichia coli BKPM B-7188 (1345) ACTGAAAGCGAAGTTGACGATATTTCTCCGTACAGAACTGTGTCACCCGGCTTACAAAGCAAAGCGCTATACTGATGAAAGCGAACAGTAA
Corynebacterium glutamicum 90 (1498) GATGAAAAGACGCTCGAGGCAGTCTGTCCAAGGAGAACCTCATGCAACCAATGTTCCGCGGAAGGCTCTACTTGGGA-GAA-C-----TAA
Corynebacterium glutamicum 13032 (1498) GATGAAAAGACGCTCGAGGCAGTCTGTCCAAGGAGAACCTCATGCAACCAATGTTCCGCGGAAGGCTCTACTTGGGA-GAA-C-----TAA

Рисунок 4.2. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов аспартазы из разных источников. Обозначения: B. SP. YM55-1 – ген аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1, BKPM7188 – ген аспартазы из *E. coli* BKPM B-7188, B. sp. 90 – ген аспартазы из *Brevibacterium sp.* 90, C. g. 13032 – ген аспартазы из *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Желтым цветом выделены консервативные остатки, одинаковые во всех генах.

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 высокоомологичные области, содержащие аминокислотные остатки, вовлеченные в каталитический процесс.

ВКПМ7188	(1)	-----MSNNIRIEEDLLGTREVPADAYY
C. g. 90	(1)	MSKTSNKSSADSKNDAKAEDIVNGENQIATNESQSSSDSAVSEVVEPKTTVQKKFRIESDLLGELQIPSHAYY
C. g. 13032	(1)	MSKTSNKSSADSKNDAKAEDIVNGENQIATNESQSSSDSAVSEVVEPKTTVQKKFRIESDLLGELQIPSHAYY
B. sp. YM55-1	(1)	-----MNTDVRIEKDFLGEKEIPKDAYY
ВКПМ7188	(24)	GVHTLRAIENFYISNNKISDIPFVVRGMVMVKKAAAMANKELQTIISKSVANAIIAACDEVLNNGKCMDQFPVDV
C. g. 90	(75)	GVHTLRAVDNFIISRTTINHVPDFIRGMVQVKKAAALANRRLHTLPAQKAEATVWACDQILIEERCMDQFPIDV
C. g. 13032	(75)	GVHTLRAVDNFIISRTTINHVPDFIRGMVQVKKAAALANRRLHTLPAQKAEATVWACDQILIEERCMDQFPIDV
B. sp. YM55-1	(24)	GVQTIIRATENFPIITGYRIH--PELIKSLGIVKKSAAALANMEVGLLDKEVGQYIVKAADEVIEG-KWNQDFIVDP
ВКПМ7188	(98)	YGGGAGTSVNMNTNEVLANIGLELMGHQKGEYQYLNPNHDVNVKCKOSTNDAYPTGFRIAVYSSLIKLVDAINQLR
C. g. 90	(149)	FQGGAGTSLNMNTNEVVANLALAEFLGHEKGEYHILHFMDDVNMSOSTNDSYPTGFRGLGIYAGLQTLIAEIDELQ
C. g. 13032	(149)	FQGGAGTSLNMNTNEVVANLALAEFLGHEKGEYHILHFMDDVNMSOSTNDSYPTGFRGLGIYAGLQTLIAEIDELQ
B. sp. YM55-1	(95)	IQQGAGTSLNMNANEVIANRLELMGEEKGNYSKISENSHVNMSOSTNDAFPTATHIAVLSLNLQLIETTKYMQ
ВКПМ7188	(172)	EGFERKAVEFQDILKMGRTOQLQDAVPMTLGQEFRAAFSILLKEEVKNIQRTAELLLEVNLGATAIGTGLNTPKEY
C. g. 90	(223)	VAFRHKGNEFVDIIKMGRTQLQDAVPMSLGEEFRAFAHNLAEEQTVLREAAANRLLEVNLGATAIGTGVNTPAGY
C. g. 13032	(223)	VAFRHKGNEFVDIIKMGRTQLQDAVPMSLGEEFRAFAHNLAEEQTVLREAAANRLLEVNLGATAIGTGVNTPAGY
B. sp. YM55-1	(169)	QEFMKKADEFAGVIKMGRTHLQDAVPELLQGEFAYARVIARDIERIANTRNNLYDINMGATAVGTGLNADPEY
ВКПМ7188	(246)	SPLAVKKLAEVTFGPCVPAEDLIEATSDCGAYVMVHGALKRLAVKMSKICNDLRLLSGGPRAGLNEINLPELQA
C. g. 90	(297)	RHQVVAALSEVTGLELKSARDLIEATSDTGAYVHAHSAIKRAAMKLSKICNDLRLLSGGPRAGLNEINLPPROA
C. g. 13032	(297)	RHQVVAALSEVTGLELKSARDLIEATSDTGAYVHAHSAIKRAAMKLSKICNDLRLLSGGPRAGLNEINLPPROA
B. sp. YM55-1	(243)	ISIVTEHLAKFSGHPLRSAQHLVDAIQNTDCYTEVSSALKVCMINMSKIANDLRLMASGGPRAGLSEIVLPARQP
ВКПМ7188	(320)	GSSIMPAGKVNVPVPEVNVQVCFKVI GNDLITVTMAAEAGQLQLNVMEPVIGQAMFESVHILTNACYNLLEKCI NG
C. g. 90	(371)	GSSIMPTKVNVPVPEVNVQVCFKVF GNDLITVTMAAEAGQLQLNVMEPVIGESLFSRLRILGNAAKTLREKCVVG
C. g. 13032	(371)	GSSIMPAGKVNVPVPEVNVQVCFKVF GNDLITVTMAAEAGQLQLNVMEPVIGESLFSRLRILGNAAKTLREKCVVG
B. sp. YM55-1	(317)	GSSIMPGKVNVPVPEVNVQVAFQVFGNDLITISASEAGQFELNVMEPVLFNLIQSISIMTNVFKSFTENCLKG
ВКПМ7188	(394)	ITANKEVCEGYVYNSIGIVTYLNPFTIHHNGDIVGKICAE T GKS VREVVLERGLLTAELDDIFSVQNLMPAY
C. g. 90	(445)	ITANADVCRAYVDNSIGIITYLNPFLGHDIGDQIGKEAAE T GRPVR ELILEK KLMDEK TLEAVLSKENLMPMF
C. g. 13032	(445)	ITANADVCRAYVDNSIGIITYLNPFLGHDIGDQIGKEAAE T GRPVR ELILEK KLMDEK TLEAVLSKENLMPMF
B. sp. YM55-1	(391)	IKANEERMKEVVEK SIGIITAINPHVGYETA AKLAREAYL T GESI R ELICIKYGVLTBEQLNEILNPYEMTHPGI
ВКПМ7188	(468)	KAKRYTDESEQ
C. g. 90	(519)	RGRLYLEN---
C. g. 13032	(519)	RGRLYLEN---
B. sp. YM55-1	(465)	AGRK-----

Рисунок 4.3. Сравнение аминокислотных последовательностей секвенированных 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.

4.1.5. Экспрессия генов аспартаз в клетках *E. coli* и их сравнительный анализ

Клонированные на предыдущем этапе гены аспартаз из различных микроорганизмов, были экспрессированы в клетках *E. coli* BLR(DE3) под промотором T7 в одних и тех же

условиях. С этой целью клетки полученных штаммов выращивали в колбах при 37 °С на среде LB с ампициллином с добавлением MgSO₄ (0,15%) с постоянным перемешиванием до ОП₆₀₀=0,6. В среду добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1мМ и затем продолжали культивирование в течение 16 часов при 30°С. Далее проводили определение аспартазной активности на клетках как это описано в разделе 3.3.7.

Оказалось, что в этих условиях наибольшей активностью обладает штамм, содержащий аспартазу AspA из *E. coli* ВКПМ В-7188 (Рисунок 4.4):

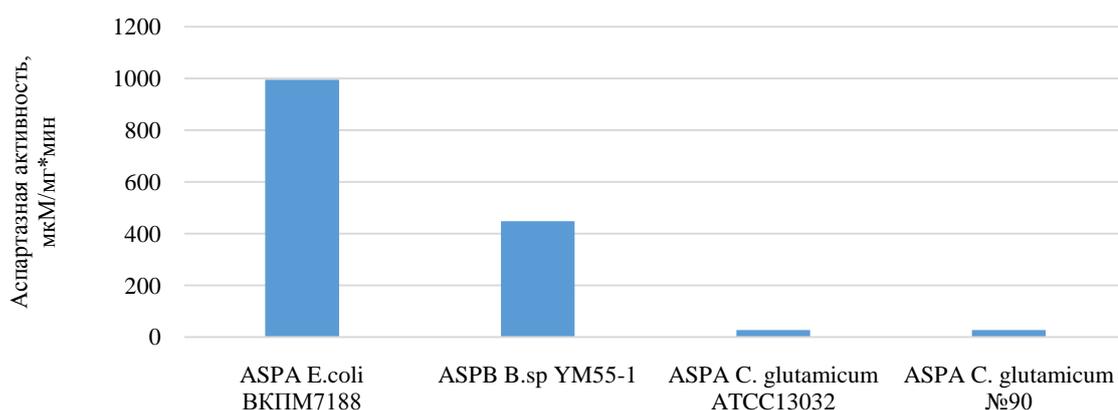


Рисунок 4.4. Удельная активность культур *E. coli*, в которых экспрессированы гены аспартаз различного происхождения под промотором T7.

В данных условиях активность культур *E. coli* существенным образом зависела от экспрессируемого гена: для гена *aspA* из *E. coli* составила 995 ед./мг клеток; для гена *aspB* из *Bacillus sp.* YM55-1 - 448 ед./мг клеток; для гена *aspA* из *C. glutamicum* - около 25 ед./мг клеток. Таким образом в условиях эксперимента наибольшей активностью обладал штамм *E. coli*, в котором был экспрессирован ген аспартазы *aspA* из *E. coli* ВКПМ В-7188. Однако стоит отметить, что клетки штамма *E. coli* pLATE31-aspA478 были чувствительны к осмотическому шоку.

Уровень синтеза различных аспартаз после индукции в клетках *E. coli* BLR (DE3) был исследован с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. С этой целью выращенные клетки разрушали ультразвуком и анализировали бесклеточные экстракты. Результаты электрофореза представлены на Рисунке 4.5.

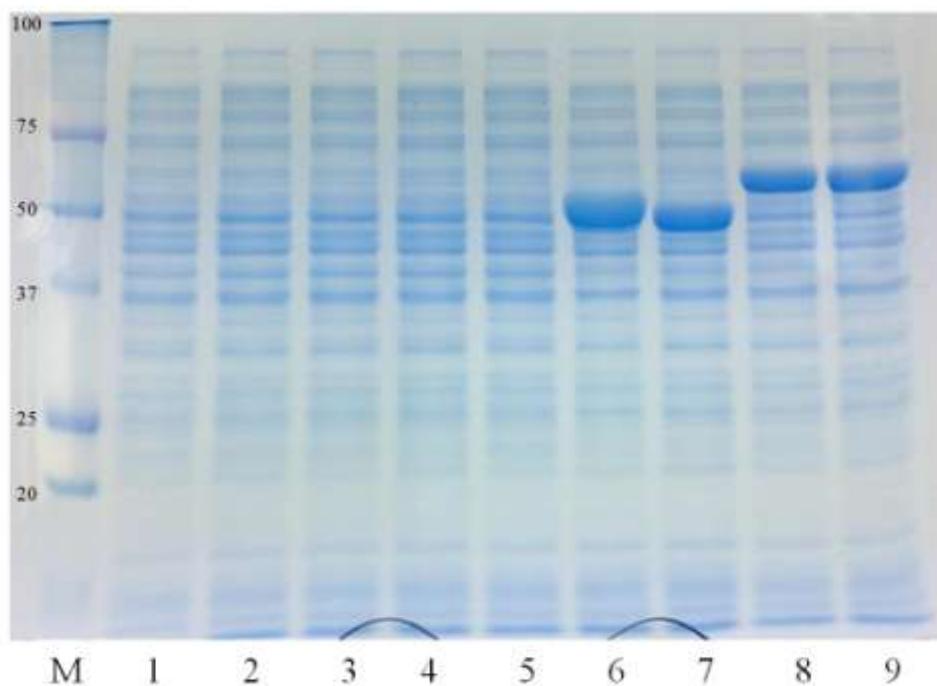


Рисунок 4.5. Результаты электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях бесклеточных экстрактов, полученных из культур *E. coli* BLR(DE3); содержащих гены аспартазы из разных источников. Обозначения: М – маркер; 1 – контроль - BLR(DE3); 2 – бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspA478 без индукции; 3 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspB без индукции; 4 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspA13032 без индукции; 5 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspA90 без индукции; 6 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspA478 с индукцией ИПТГ; 7 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspB с индукцией ИПТГ; 8 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspA13032 с индукцией ИПТГ; 9 - бесклеточный экстракт из BLR(DE3) pLATE31-aspA90 с индукцией ИПТГ. Вес маркера указан в kDa.

Можно видеть, что синтез аспартазы наблюдается только в присутствии индуктора ИПТГ. Аспартазы из разных источников отличались по размеру субъединиц: максимальный размер субъединицы (57,6 kDa) наблюдался у аспартазы из коринебактерий, минимальный (50 kDa) – у аспартазы из штамма бацилл YM55-1, что соответствовало расчетным значениям, исходя из нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов. Фермент находился в растворимом виде. Принимая во внимание, что все изученные штаммы существенно не отличались по уровню продукции аспартазы, но при этом демонстрировали разный уровень аспартазной активности, следует признать, что аспартазы из разных штаммов отличаются по уровню специфической активности: максимальной активностью обладает фермент из *E. coli*, а минимальной - из штаммов коринебактерий.

Сравнение термостабильности аспартаз из различных источников.

Было проведено сравнение термостабильности изучаемых аспартаз из различных источников в клетках *E. coli*. Для этого полученные штаммы выращивали с ампициллином при 37 °С на среде LB с добавлением MgSO₄ (0,15%) с постоянным перемешиванием до ОП₆₀₀=0,6. В среду добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и затем продолжали культивирование в течение 16 часов при 30°С. Клетки разрушали ультразвуком и получали бесклеточные экстракты. Образцы бесклеточных экстрактов инкубировали при 60°С в течение различных интервалов времени, после чего проводили определение аспартазной активности как это описано в разделе 3.3.7. Результаты этих экспериментов представлены на Рисунке 4.6. В качестве контроля были использованы образцы соответствующих экстрактов, которые не подвергались нагреву при 60 °С.

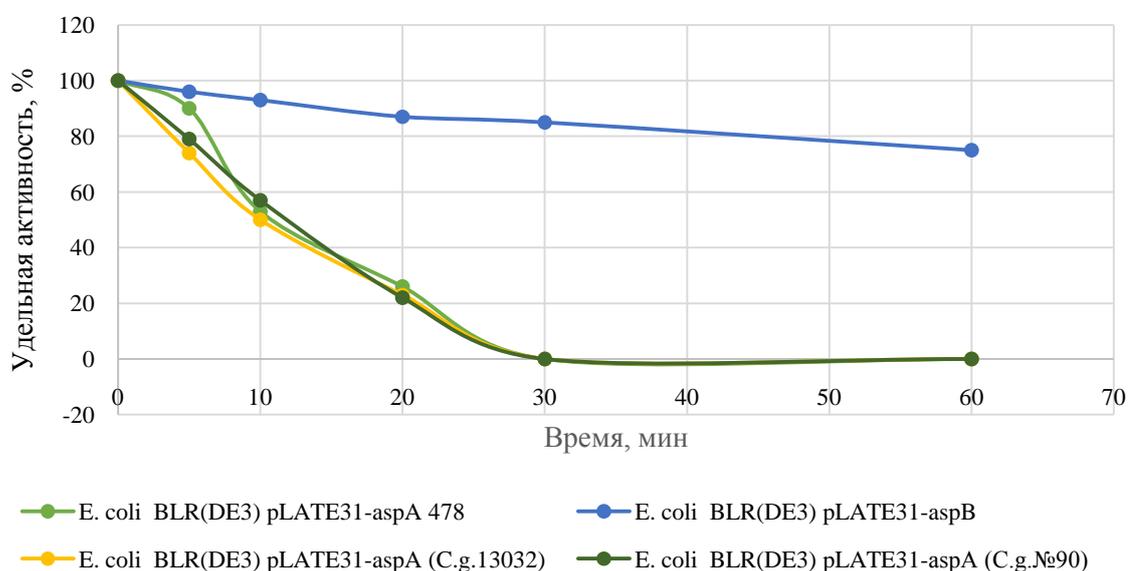


Рисунок 4.6. Определение термостабильности изучаемых аспартаз из различных источников.

Из результатов, представленных на Рисунке 4.6 следует, что образцы ферментов из *E. coli* и *C. glutamicum* полностью утрачивали активность после их выдерживания в течение 30 минут при 60°С. В отличие от этих ферментов, аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1 обладала повышенной термостабильностью: уровень активности после инкубирования образцов фермента при 60°С в течение часа снижался на 25%, что соответствовало полученным ранее данным о стабильности аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1 [Kawata Y. et al., 1999].

Влияние ионов Mg^{2+} на аспартазную активность. Также был изучен эффект ионов магния на аспартазную активность. Для этого полученные ранее штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды с генами разных аспартаз, выращивали на среде LB с ампициллином в присутствии ионов Mg^{2+} и без них до $ОП_{600}=0,6$. В среду добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и затем продолжали культивирование в течение 16 часов при 30 °С. После этого определяли аспартазную активность полученных культур. Результаты эксперимента представлены на Рисунке 4.7. За 100% бралась активность культур, выращенных с добавлением ионов Mg^{2+} .

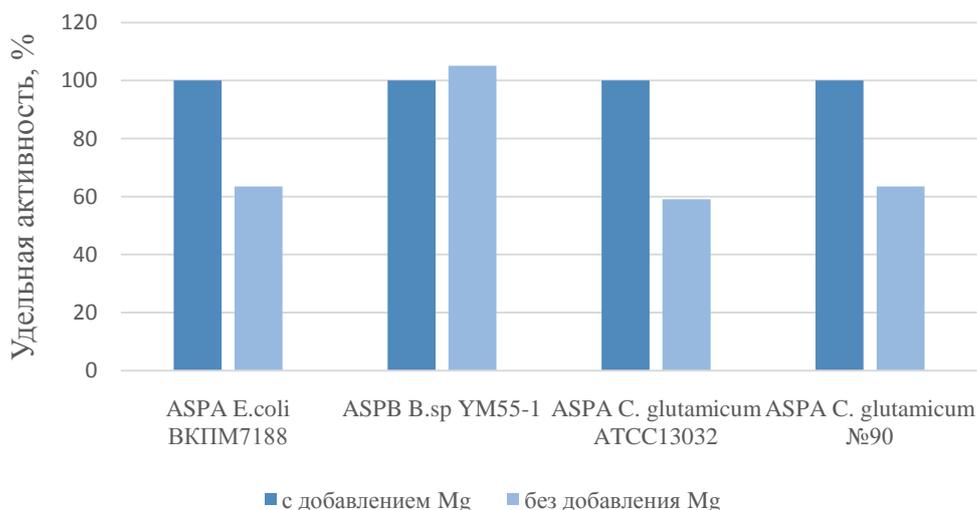


Рисунок 4.7. Влияние магния на аспартазную активность штаммов *E. coli*, содержащих плазмиды с генами аспартаз из разных источников.

Можно видеть, что добавление ионов магния в среду приводило к увеличению на 40% аспартазной активности штаммов, содержащих гены аспартаз из *E. coli* и из *C. glutamicum*. В то же время уровень активности штамма, содержащего *AspB* из *Bacillus sp.* YM55-1 не зависел от добавок ионов магния. Следовательно, аспартазы из *E. coli* и из *C. glutamicum* в щелочных условиях являются магнием-зависимыми ферментами, в отличие от аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1, для проявления активности которой в аналогичных условиях не требуются ионы магния, что соответствовало ранее полученным результатам [Kawata Y. et al., 1999].

Определение константы Михаэлиса. Определение константы Михаэлиса проводилось на бесклеточных экстрактах. Для этого культуры *E. coli* BLR(DE3), содержащие гены аспартаз из разных источников, выращивали на среде LB с ампициллином при 37 °С с добавлением $MgSO_4$ (0,15%) с постоянным перемешиванием до $ОП_{600}=0,6$. В

среду добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и затем продолжали культивирование в течение 16 часов при 30⁰С. Клетки разрушали ультразвуком и получали бесклеточные экстракты. Полученные экстракты были использованы для определения константы Михаэлиса как это описано в разделе 3.8.

Результаты измерения представлены в Таблице 4.1:

Таблица 4.1. Значения константы Михаэлиса для различных аспартаз

	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
Km, мМ	20,1	9,9	68,6	73,9

Из таблицы видно, что наибольшее значение константы Михаэлиса наблюдается для аспартазы из *C. glutamicum* (68,7-73,9 мМ). Для аспартазы из *E. coli* значение константы Михаэлиса составляло 20,2 мМ, что существенно превышает значение, полученное в работе [Mizuta K. et al., 1975] - 2,5 мМ. Различия могут быть связаны с различными методиками измерения, а также с наличием в нашем случае на С-конце белка 6 гистидинов. Наименьшее значение константы Михаэлиса получено для аспартазы из *Bacillus sp.* УМ55-1 (9,9 мМ), что близко к значениям полученным ранее [Weiner B. et al., 2008].

Таким образом, исследуемые аспартазы из *E. coli*, *C. glutamicum* и *Bacillus sp.* УМ55-1 существенным образом отличались по физико-химическим и каталитическим свойствам. У всех исследованных аспартаз отмечена низкая степень гомологии друг с другом (не более 40,6%). 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.

4.2. 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.

Задачей данной части работы было сравнение разных генетических подходов для повышения аспартазной активности штаммов и выбор оптимального решения, обеспечивающего высокий уровень аспартазной активности клеток и большой урожай биомассы активных клеток, предназначенных для создания эффективного биокатализатора синтеза L-аспарагиновой кислоты.

4.2.1. Амплификация гена аспартазы в составе мультикопийных экспрессионных плазмид

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

В качестве мультикопийной плазмиды были использованы производные плазмиды серии pUC, копияность которых составляет 500-700 на клетку. («ThermoFisher Scientific», США). В качестве промоторов для экспрессии были использованы индуцибельный промотор P_{lacUV5}, промотор P_{eftu} гена *eftu* из *Corynebacterium glutamicum* и промотор P_{G25} из бактериофага T5. Для конструирования штаммов с высокой аспартазной активностью были использованы гены *aspA* из *E. coli* и *aspB* из *Bacillus sp.* YM55-1.

4.2.1.1. Экспрессия гена аспартазы под индуцибельным промотором P_{lacUV5} в составе плазмиды pTZ57R

Фрагмент, содержащий ген *aspA* из *E. coli* ВКПМ В-7188, был амплифицирован с помощью ПЦР, используя праймеры D.lac.aspA-F (5'-AAAGGATCCTGTACGATTAAGTCTTCGCTTTCATCAGTATAGC-3') и D.lac.aspA-R (5'-

TTTGTATAAGAAAATGAGAGGG-3'). В качестве матрицы для синтеза искомого фрагмента использовалась плазида рJET1.2-Asp, полученная ранее в нашей лаборатории и содержащая ген *aspA* из штамма *E. coli* ВКПМ В-7188. Клонирование в вектор рTZ57R/Г проводили согласно рекомендациям производителя. Полученная плазида далее трансформировали в штамм *E. coli* XL1-Blue. Нужная ориентация гена по отношению к промотору была отобрана с помощью ПЦР-амплификации со стандартными праймерами F40 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') и R46 (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') и подтверждена секвенированием. Полученная плазида, обозначенная рDL-1, была введена в штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 с помощью электротрансформации и селекции на среде с ампициллином.

Динамика роста штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 рDL-1 и его аспартазная активность были изучены в колбочных экспериментах. Для этого штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 рDL-1 выращивали с ампициллином при 37 °С на среде LB с постоянным перемешиванием. После достижения оптической плотности 1,0 ед добавлялся индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование в течение 20 час. Периодически в образцах культуры определяли оптическую плотность и аспартазную активность клеток как это описано в разделе 3.3.7 «Материалы и методы». Результаты эксперимента показаны на Рисунке 4.8:

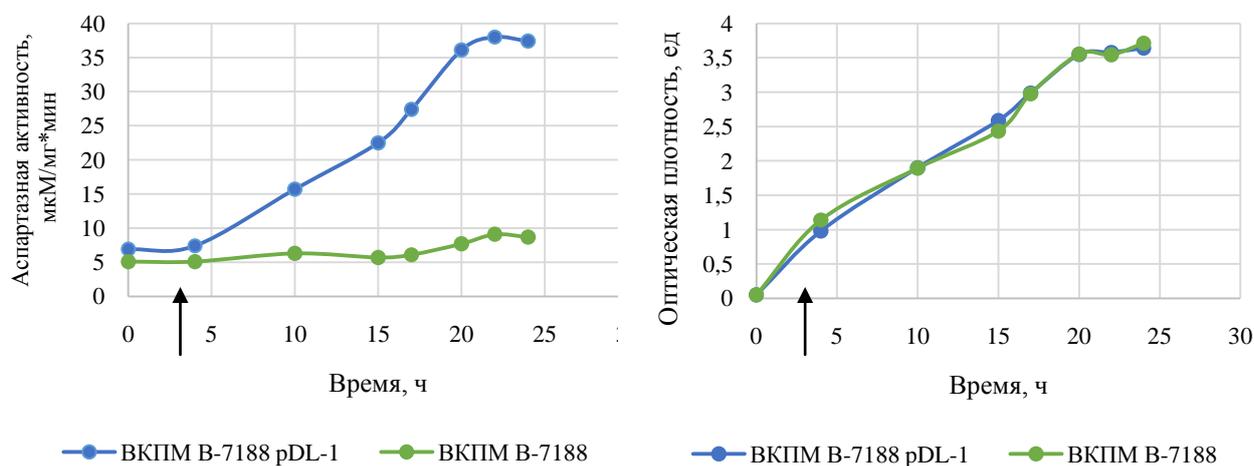


Рисунок 4.8. Аспартазная активность и рост штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 рDL-1. ИПТГ был добавлен через 4 часа после начала культивирования (обозначено черной стрелкой). Показаны средние результаты трех независимых экспериментов

После добавления индуктора аспартазная активность штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 рDL-1 возрастала и достигала максимума 38 мкМ/мг*мин к 22 часу после начала

культивирования. При дальнейшем культивировании штамм не показывал роста активности. У контрольного штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 максимальная активность достигала 6,1-9,1 мкМ/мг*мин к 22 часу культивирования.

Таким образом, использование мультикопийного вектора pTZ57R и индуцибельного промотора P_{lacUV5} позволило повысить уровень активности штамма в 4-6 раз по сравнению с исходным штаммом *E. coli* ВКПМ В-7188. Однако следует отметить, что для экспрессии аспартазы требуется использование дорогостоящего индуктора синтеза белка ИПТГ.

4.2.1.2. Экспрессия гена аспартазы под конститутивным промотором P_{eftu} из *Corynebacterium glutamicum* в составе плазмиды pTZ19R

Важнейшим недостатком применения индуцибельных промоторов для экспрессии является необходимость использования индукторов, часто дорогостоящих, которые необходимо внести в культуру на определенной стадии роста. Использование конститутивных промоторов позволяет упростить стадию наработки биомассы с высокой активностью.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что промотор P_{eftu} из *Corynebacterium glutamicum* обеспечивает высокий конститутивный уровень экспрессии в *E. coli*. С учетом этого факта, было решено клонировать ген аспартазы *aspA* из *E. coli* под этим промотором.

Наработку фрагмента для клонирования, содержащего ген *aspA* из *E. coli* ВКПМ В-7188, проводили с помощью ПЦР-амплификации используя праймеры D.asp-F (5'-TTTCCATGGCAAACAACATTCGTATCGAAGAAGATCTGTTGG-3') и D.asp-R (5'-GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTGCTTTGTAAGCCGGGTGCATC-3'). В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штамма *E. coli* ВКПМ В-7188. Фрагмент, содержащий промотор P_{eftu} , был получен с помощью ПЦР амплификации при использовании в качестве матрицы геномной ДНК штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 и праймеров D.eftu-F (5'-GGGTGACGATATCTGGCCGTTACCCTGCGAATG-3') и D.eftu-R (5'-CTTCGATACGAATGTTGTTTGTGATGTCTCCTGGACTTC-3'). Оба полученных фрагмента объединялись вместе с помощью ПЦР-амплификации с использованием праймеров D.asp-F и D.eftu-R. Объединенный фрагмент, был обработан рестриктазой SmaI и лигирован в плазмиду pTZ19R, обработанную сходным образом. Полученную плазмиду далее трансформировали в штамм *E. coli* XL1-Blue, в котором на ампициллине был отобран один клон, содержащий необходимую конструкцию. Плазмида получила название pDL-2 и

ее структура была подтверждена секвенированием с праймерами F40 и R46. Далее плазмиду pDL-2 путем электротрансформации вводили в штамм *E. coli* ВКПМ В-7188.

Оптическая плотность культуры *E. coli* ВКПМ В-7188 pDL-2 и её аспартазная активность в процессе культивирования на среде LB в течение 16 часов при 37 °С показана на Рисунке 4.9:

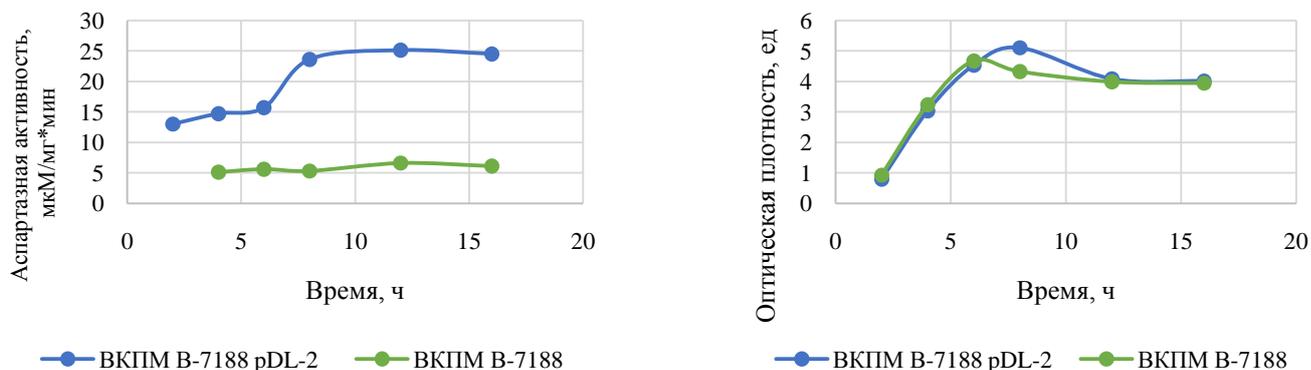


Рисунок 4.9. Аспартазная активность и рост штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 pDL-2. Показаны средние результаты трех независимых экспериментов

Из представленных результатов следует, что культура *E. coli* ВКПМ В-7188 pDL-2 обладала максимальной аспартазной активностью на ранней стационарной фазе на 8-16 час роста. При этом удельная активность культуры достигала 23,6-25,1 мкМ/мг*мин при оптической плотности 4-5 ед. У контрольного штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 максимальная активность достигала 5,1-6,1 мкМ/мг*мин к 16 часу культивирования.

Таким образом экспрессия гена аспартазы под конститутивным промотором ген *eftu* из *S. glutamicum* в составе мультикопийного вектора pTZ19R позволило повысить уровень активности исходного штамма *E. coli* ВКПМ В-7188 в 3,9-4,8 раза. Следует отметить, что в этом случае уровень аспартазной активности штаммов был ниже, чем при применении индуцибельного промотора P_{lacUV5} (24,5 против 38 мкМ/мг*мин). Однако в случае конститутивного промотора для образования активности не требовался индуктор.

4.2.1.3. Экспрессия гена аспартазы под конститутивным промотором P_{G25} из бактериофага T5 в составе плазмиды pUC57

Известно, что бактериофаги обладают сильными конститутивными промоторами. Нами был использован один из таких сильных промоторов – промотор P_{G25} из бактериофага T5 [Deusche U. et al., 1986] для повышения уровня синтеза аспартазы в клетках *E. coli*.

Гибридная плазмида, содержащая ген аспартазы *aspB* под промотором P_{G25} , была получена на основе вектора pUC57, в который по сайту Eco32I был встроены синтетический фрагмент с геном аспартазы и промотором. Фрагмент был синтезирован в ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург на коммерческой основе. Полученную плазмиду вводили в штамм *E. coli* XL1-Blue и подтверждали её структуру с помощью секвенирования. Отобранная плазмида получила обозначение pDL-3. Далее плазмиду pDL-3 путем электротрансформации вводили в штамм MG1655, являющийся производным *E. coli* K-12

Клетки штамма *E. coli* MG1655 pDL-3 выращивали с ампициллином в течение 18 часов при 37 °С на среде LB с постоянным перемешиванием. Через каждые два часа отбирали пробы и проводили определение аспартазной активности на целых клетках. В качестве контрольного штамма использовался бесплазмидный штамм MG1655. Результаты измерения представлены на Рисунке 4.10:

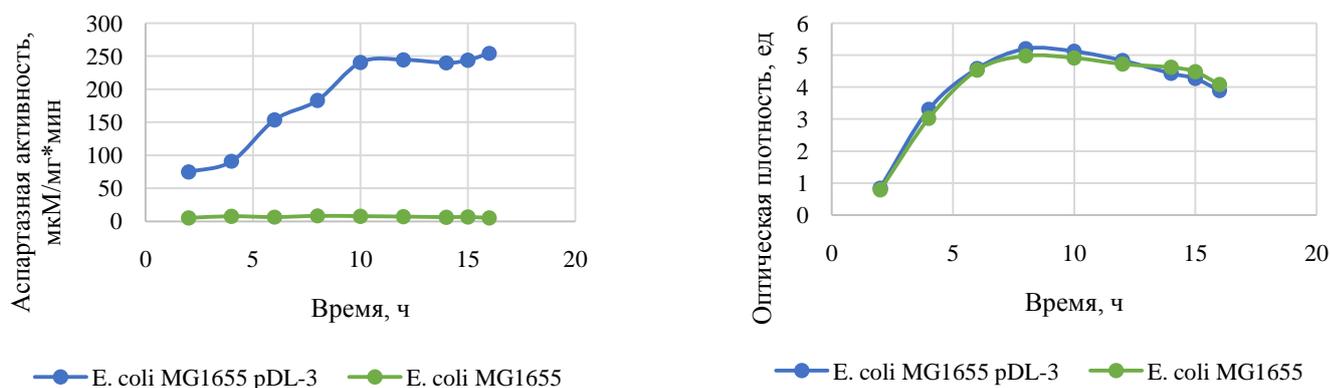


Рисунок 4.10. Аспартазная активность штамма *E. coli* MG1655 pDL-3. Показаны средние результаты трех независимых экспериментов

Из представленных результатов следует, что штамм *E. coli* MG1655 pDL-3 обладает максимальной активностью (240-254 мкМ/мг*мин) на стационарной фазе после 10 часов роста. У контрольного штамма *E. coli* MG1655 максимальная активность наблюдалась после 8 часов культивирования и составляла 5,2-8,4 ед. Следовательно, использование конститутивного промотором P_{G25} из бактериофага T5 для экспрессии гена аспартазы в составе мульткопийной плазмиды приводило к увеличению аспартазной активности культуры (в 28 раз) по сравнению с активностью исходного штамма.

Таким образом, из использованных в работе промоторов для экспрессии гена аспартазы фаговый промотор P_{G25} обеспечивал максимальный уровень аспартазной активности штаммов *E. coli*.

4.2.2. Усиление экспрессии гена аспартазы в составе хромосомы за счет замены собственного промотора на сильный промотор

Для поддержания стабильности плазмиды в лабораторных условиях используют антибиотики, создающие селективное давление. При этом микроорганизм приобретает устойчивость к антибиотику, что затрудняет использование плазмид-содержащих штаммов в промышленности, поскольку современные требования к промышленным штаммам запрещают использование любых трансмиссивных элементов.

Реальной альтернативой использованию плазмид является введение генетических изменений в хромосому и создание бесплазмидных штаммов с высокой ферментативной активностью.

Для получения бесплазмидных штаммов, обладающих высокой аспартазной активностью, была осуществлена замена собственного промотора гена аспартазы *aspA* на сильные конститутивные промоторы в составе хромосомы штамма *E. coli* MG655. В качестве сильных конститутивных промоторов были использованы фаговые промоторы - промотор P G25 фага T5 и промотор P A1 фага T7 [Deusche U. et al, 1986]. Замену промоторов проводили с помощью Red-зависимой системы рекомбинации бактериофага λ как описано в разделе 3.5.11.

Конструирование штаммов проводили в две стадии. На первой стадии перед собственным промотором гена *aspA* встраивалась кассета, содержащая гены *cat-sacB*. Кассета была наработана с помощью ПЦР с использованием матрицы pICA и праймеров D.pr.asp(CS)-F и D.pr.asp(CS)-R (Таблица 4.2). Наличие кассеты у клонов, растущих на хлорамфениколе, подтверждали путем ПЦР с парами праймеров D.pr1 и D.pr2, а также D.pr3 и D.pr4. Полученный таким образом штамм был обозначен *E. coli* D1(CS).

Таблица 4.2. Праймеры, используемые для замены промотора аспартазы

Название	5'-3' последовательность	Примечание
D.pr.asp(CS)-F	CGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAGCAAAATTTC AGATGTTTGCGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA	Клонирование кассеты <i>cat-sacB</i>
D.pr.asp(CS)-R	ATTAATTTGTGAAATAGATCACCGCTTTGGGATTA CCAAAAATAGTTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC	Клонирование кассеты <i>cat-sacB</i>
D.pr1	AGTAGGCATCAGCTGGAACCTCCC	Проверочный праймер
D.pr2	CTGTTGCATGGGCATAAAGTTGCC	Проверочный праймер
D.pr3	CAGCACGAGGGTCAGCAATAC	Проверочный праймер

D.pr4	AAACGCCTGGTGCTACGCC	Проверочный праймер
D.pr.aspA1	CGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAGCAAAATTTCA AGATGTTTGC GCAAGCTTCAGAGATTTTGCATCG	Клонирование промотора P _{G25}
D.pr.aspA2	ACTTCCCTGGTACCCAACAGATCTTCTTCGATACGAAT GTTGTTTGACATGGTTGTACCTCGTTACSTTTGGTTCG GTTAATTTCTCCTCTTTAAT	Клонирование промотора P _{G25}
D.pr.aspA3	CGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAGCAAAATTTCA AGATGTTTGC GCCAAGTCAACGCCTATCTTAAAG	Клонирование промотора P _{A1}
D.pr.aspA4	ACTTCCCTGGTACCCAACAGATCTTCTTCGATACGAAT GTTGTTTGACATGGTTGTACCTCGTTACSTTTGGTTCG GACCCCGGTGTCGATTGGGA	Клонирование промотора P _{A1}

На второй стадии проводилась замещение кассеты *cat-sacB* на фрагменты, содержащие фаговые промоторы. Для наработки фрагментов, содержащих последовательности фаговых промоторов P_{G25} и P_{A1}, использовались пары праймеров D.pr.aspA1-D.pr.aspA2 и D.pr.aspA3-D.pr.aspA4, в качестве матрицы использовалась ДНК фага T5 и T7 соответственно. Среди клонов, выросших на чашках с сахарозой, отыскивали с помощью секвенирования клоны, у которых промоторы были встроены перед геном *aspA*. Штамм *E. coli*, содержащий аспартазу *aspA* под промотором P_{G25} был обозначен *E. coli* D2, а штамм, содержащий аспартазу *aspA* под промотором P_{A1} обозначен *E. coli* D3.

Рост штаммов *E. coli* D2 и *E. coli* D3 и уровень их аспартазной активности в процессе культивирования на среде LB в течение 18 часов при 37 °С показан на рис. Рисунке 4.11 и Рисунке 4.12:

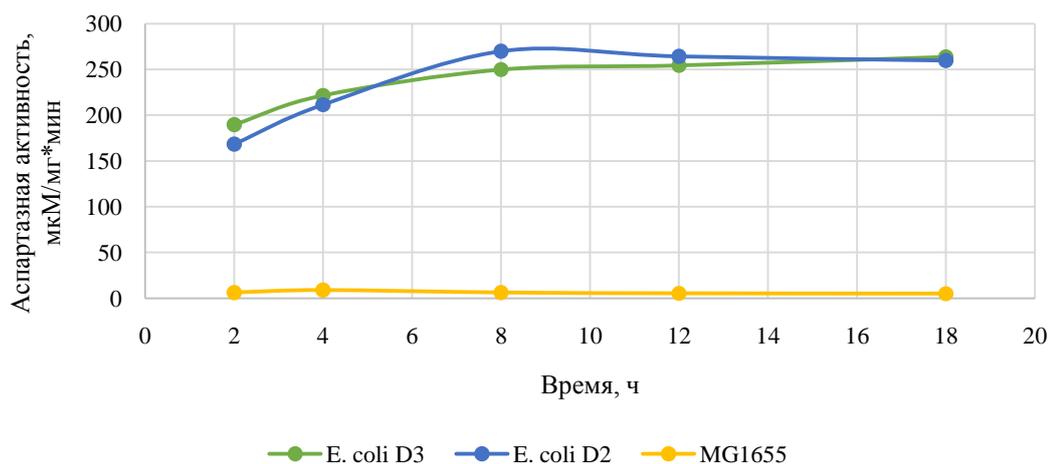


Рисунок 4.11. Аспартазная активность штаммов *E.coli*, у которых собственный промотор гена аспартазы заменен на промотор P_{G25} из фага T5 или промотор P_{A1} из фага T7.

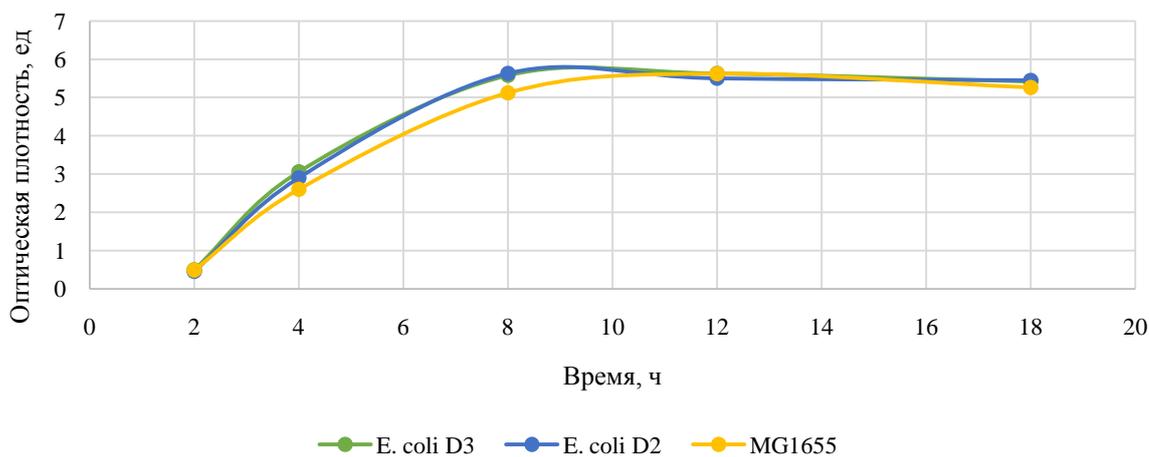


Рисунок 4.12. Рост штаммов *E. coli*, у которых собственный промотор гена аспартазы заменен на промотор P_{G25} из фага T5 или промотор P_{A1} из фага T7.

Из результатов, представленных на рисунках, 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. При дальнейшем культивировании штамм не показывал роста активности. 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 промотора аспартазы позволила повысить аспартазную активность по меньшей мере в 28 раз по сравнению с контролем. Также стоит отметить, что оба штамма показывают высокую скорость роста

4.2.3. 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. С этой целью, используя ПЦР амплификацию с праймерами, комплементарными началу гена и разным последовательностям в конце гена, было получено 5 вариантов гена, у которых утрачены разные последовательности на конце гена. Для безлигазного клонирования использовалась плазмида pLATE31. Таким способом всего были получены 5 плазмид – pLATE31-*aspA* 472,

pLATE31-aspA 471, pLATE31-aspA 469, pLATE31-aspA 467 и pLATE31-aspA 466. Делеционные варианты аспартазы состояли из 472, 471, 469,467 и 466 аминокислотных остатков, соответственно. Все полученные плазмиды была трансформирована в штамм *E. coli* BLR(DE3).

Были получены культуры *E. coli* BLR(DE3) с соответствующей плазмидой, которые выращивали до оптической плотности 1 ед. при 37 °С с постоянным перемешиванием, добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и затем продолжали культивирование в течение 15 час при 30 °С. Результаты измерения аспартазной активности культур представлены на Рисунке 4.13:

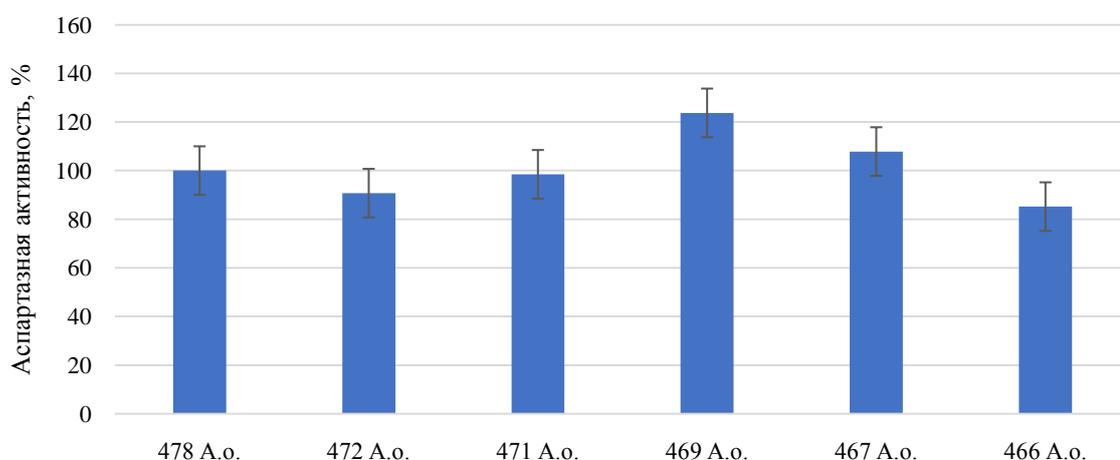


Рисунок 4.13. Аспартазная активность культур *E. coli* BLR(DE3), в которых экспрессированы укороченные варианты гена *aspA* под промотором T7. Цифрами обозначено количество аминокислотных остатков (A.o) в белке. Аспартазная активность выражена в процентах, за 100% принят вариант без делеций

Из результатов, представленных на Рисунке 4.13 следует, что 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. Эти результаты по уровню активности хорошо согласуются с полученными ранее [Jayasekera M.M. et al., 1997], однако отсутствовала корреляция между уровнем активности и размером делеции, что могло быть связано с наличием в нашем случае 6 гистидинов на С-конце аспартазы. Следует отметить, что утрата С-концевых аминокислотных последовательностей аспартазы приводит к незначительным вариациям в уровне аспартазной активности. Клетки *E. coli* BLR(DE3), в которых экспрессированы

укороченные варианты гена *aspA* под промотором T7, хотя и обладали высоким уровнем аспартазной активности, были непригодны для использования в качестве катализаторов. Они 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_{G25} и P_{A1}), 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.

4.3. Получение штаммов *Escherichia coli* с делетированными генами фумаразы и изучение их каталитических свойств

В бактериальных клетках L-аспарагиновая кислота образуется в результате реакций аминирования органических кислот. Одна из таких реакций - аминирование фумаровой кислоты с участием фермента аспартазы, положена в основу промышленного способа получения L-аспарагиновой кислоты. Однако в таких клетках фумаровая кислота также может подвергаться и другим превращениям, например, гидратации с участием фермента фумаразы с образованием яблочной кислоты (Рисунок 4.14, А):

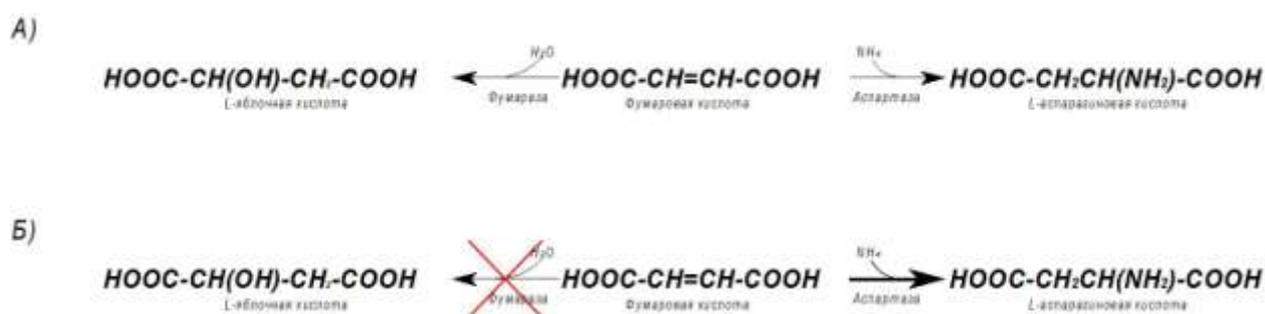


Рисунок 4.14. Ферментативные реакции превращения фумаровой кислоты в клетках *E. coli*. А) в обычной клетке; б) в мутантной клетке - биокатализаторе для производства L-аспарагиновой кислоты.

При биокаталитическом получении аспарагиновой кислоты, образующаяся под действием фумаразы яблочная кислота, является побочным продуктом, который ухудшает качество полученной L-аспарагиновой кислоты. Одним из способов снижения в бактериях фумаразной активности является инактивация генов, кодирующих фумаразу (Рисунок 4.13, Б). Известно, что клетки *Escherichia coli*, используемые для получения L-аспарагиновой кислоты, содержат три гена фумаразы – *fumA*, *fumB* и *fumC*, которые катализируют превращение фумарата в малат.

Фумараза *fumA* синтезируется в микроаэрофильных условиях и, предположительно, является компонентом ЦТК. Фумараза *fumB* синтезируется только в анаэробных условиях. Фумараза *fumC* является доминирующим ферментом в аэробных условиях, также полагают, что она активна в условиях оксидативного стресса [Zhang X. et al., 2011].

Поскольку для биосинтеза L-аспарагиновой кислоты в качестве катализатора используются не растущие клетки при микроаэрофильных условиях, заранее не представлялось возможным утверждать какая из фумараз вносит наибольший вклад в образование яблочной кислоты в процессе синтеза L-аспарагиновой кислоты.

В данном разделе представлены результаты конструирования производных штамма *Escherichia coli* MG1655 с удаленными генами *fumA*, *fumB* и *fumC* и изучение их ростовых характеристик и каталитических свойств.

4.3.1. Получение штаммов *Escherichia coli* с удаленными генами фумараз

В клетках *E. coli* содержится 3 гена, контролирующих образование фумараз, при этом 2 из них – *fumA* и *fumC* локализуются в одном локусе, образуя единую группу сцепления [Park S.J. et al., 1995], а третий ген – *fumB* - локализуется в другом локусе хромосомы [Tsenq C.P., 1997]. Для получения штаммов *E. coli* с удаленными генами фумараз был использован подход, основанный на λ Red-зависимой рекомбинации как описано в разделе 3.4.4.

В качестве исходного штамма для получения делеционных мутантов был использован вариант штамма *E. coli* MG1655, у которого активирован глиоксилатный шунт за счет делеции гена репрессора *iclR*. Ранее было показано, что активация глиоксилатного шунта является позитивным фактором для отбора мутантов с удаленными генами фумараз [Song C.W. et al., 2013].

Удаление гена *iclR* производилось в 2 этапа: на первом этапе при участии плазмиды pKD46 в хромосому *E. coli* встраивалась кассета *cat-sacB* вместо гена *iclR*. Кассета была получена с помощью ПЦР –амплификации, используя в качестве матрицы плазмиду pICA и праймеры D.iclR(CS)-F и D.iclR(CS)-R (Таблица 4.3). Клоны, содержащие вставку *cat-sacB*, отбирали на чашках LB по устойчивости к хлорамфениколу. Наличие вставки подтверждали путем ПЦР с парами праймеров D.pr5-D.pr4 и D.pr6-D.pr2. В результате был получен штамм, обозначенный *E. coli* D4(CS). В последующем все штаммы, несущие кассету *cat-sacB* в хромосоме, были обозначены номером штамма с индексом в названии «CS».

На втором этапе кассета *cat-sacB* удалялась из хромосомы путем замещения на небольшой фрагмент, имеющий на концах участки гомологии с хромосомной ДНК. Фрагмент был получен с помощью ПЦР, используя праймеры D.iclR-R и D.iclR-F и плазмиду pICA в качестве матрицы. Праймеры имели области с частичной гомологией, поэтому при отжиге друг на друге образовывали фрагмент размером 80 п.н. При этом был получен штамм, получивший обозначение *E. coli* D5, у которого удален ген *iclR*. Этот штамм в дальнейшем использовался для получения мутантов с удаленными генами фумараз.

Таблица 4.3. Праймеры, используемые для удаления генов *iclR* и *fumA/B/C*.

Номер	Название	5'-3' последовательность
1	D. <i>iclR</i> (CS)-F	CAATAAAAATGAAAATGATTTCCACGATACAGAAAAAAGAGA CTGTCATGCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
2	D. <i>iclR</i> (CS)-R	AGAATATTGCCTCTGCCCGCCAGAAAAAGTCAGCGCATTCCAC CGTACGATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
3	D. <i>iclR</i> -R	AAAAGAGACTGTCATGGTCGCACCCATTCCCGCGAAACGC
4	D. <i>iclR</i> -F	CCTCTGCCCGCCAGAAAAAGTCAGCGCATTCCACCGTACGGCG TTTCGCGGGAATG
5	D. <i>fumA</i> (CS)-F	TTGTATCTGCTGGAAGAAGTCATTTCTTTATCATCCACAAGGA TAAACGATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
6	D. <i>fumA</i> (CS)-R	AACACCCGCCAGAGCATAACCAAACCAGGCAGTAAGTGAGA GAACAATGCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
7	D. <i>fumB</i> -F	CGCGGCACGCCATTTTCGAATAACAAATACAGAGTTACAGGCT GGAAGCTCCTCTTCG
8	D. <i>fumB</i> -R	GGCCAGGGGGATCACCTGGCAGCATGCTGCCAGGCGCTGGGCC GAAGAGGAGCTTCCAGC
9	D. <i>fumB</i> (CS)-F	GGCACGCCATTTTCGAATAACAAATACAGAGTTACAGGCTGGA AGCTATGCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
10	D. <i>fumB</i> (CS)-R	GCATGCTGCCAGGCGCTGGGCCGAAGAGGTTACTTAGTGCACT TCGCGCAATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
11	D. <i>fumC</i> (CS)-F	ATTCCACGGCTGCACCTGTATGTTGCAGATTAACGCCCGCTTT CATACTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
12	D. <i>fumC</i> (CS)-R	GAAAAAATTAATCAGGTGAGGAGCAGGTCATGAATACAGTAC GCAGCGAACAGGGTTTTCCCAGTCACGA
13	D.pr2	CTGTTGCATGGGCATAAAGTTGCC
14	D.pr4	AAACGCCTGGTGCTACGCC
15	D.pr5	CGATAACTCTGGATCATGGTG
16	D.pr6	AAAGAACTACGAGGAATACGAG
17	D.pr7	CTACGGTTATTACATCCTGC
18	D.pr8	TGGTGAGTTCGCAAATCAGGG
19	D.pr9	CAACGTGCATCGCCGTCGG
20	D.pr10	CTGGACGGATTTCCATACC
21	D.pr11	GACAATGTGCAGCACCG
22	D.pr12	CACGCTTATCGCTTAACGGCACG

Всего было получено 5 типов мутантов: *E. coli* Δ fumA(CS) (удален ген *fumA*); *E. coli* Δ fumB(CS) (удален ген *fumB*); *E. coli* Δ fumC(CS) (удален ген *fumC*); *E. coli* Δ fumAC(CS) (удалены гены *fumA* и *fumC*); *E. coli* Δ fumABC(CS) (удалены гены *fumA*, *fumB* и *fumC*). Для создания первых четырех штаммов проводили первый этап рекомбинации с помощью фрагмента, содержащего кассету *cat-sacB*. Кассета была получена с помощью праймеров, указанных в Таблице 4.5 и плазмиды pICA в качестве матрицы. Клоны, содержащие вставку *cat-sacB*, отбирали на чашках LB по устойчивости к хлорамфениколу. Наличие вставки подтверждали путем ПЦР с парами праймеров, указанных в Таблице 4.4:

Таблица 4.4. Используемые пары праймеров для удаления генов фумараз

Полученный штамм	Праймеры для вставки <i>cat-sacB</i>	Праймеры для проверки наличия кассеты
<i>E. coli</i> D6 Δ fumA(CS)	D.fumA(CS)-F и D.fumA(CS)-R	D.pr9 и D.pr2; D.pr10 и D.pr4
<i>E. coli</i> D7 Δ fumB(CS)	D.fumB(CS)-F и D.fumB(CS)-R	D.pr7 и D.pr4; D.pr8 и D.pr2
<i>E. coli</i> D8 Δ fumC(CS)	D.fumC(CS)-F и D.fumC(CS)-R	D.pr11 и D.pr2; D.pr12 и D.pr4
<i>E. coli</i> D9 Δ fumAC(CS)	D.fumC(CS)-F и D.fumA(CS)-F	D.pr11 и D.pr2; D.pr10 и D.pr4

Штамм *E. coli* D11 Δ fumABC(CS) был получен из *E. coli* D7 Δ fumB(CS). Для этого проводился второй этап рекомбинации, в ходе которого кассета *cat-sacB* на месте гена *fumB* заменялась на фрагмент, полученный с помощью праймеров D.fumB-F и D.fumB-R. Праймеры имели частичные области гомологии, поэтому при отжиге друг на друге они образовывали фрагмент размером 100 п.н. При проведении рекомбинации кассета *cat-sacB* заменялась на данный фрагмент. Среди колоний, выросших среде Sula, был отобран клон, содержащую искомую вставку. Этот клон был обозначен *E. coli* D10 Δ fumB.

Для удаления генов *fumA* и *fumC* из *E. coli* D10 Δ fumB проводили первый этап рекомбинации. Для рекомбинации использовался фрагмент, полученный с помощью праймеров D.fumC(CS)-F и D.fumA(CS)-F и матрицы pICA. Среди клонов, выросших на среде LB с хлорамфениколом был отобран клон, содержащий замену генов *fumA-fumC* на кассету *cat-sacB*. Структура мутанта была подтверждена с помощью ПЦР анализа и секвенированием локуса. Полученный клон был обозначен *E. coli* D11 Δ fumABC(CS) и содержал делецию гена *fumB*, а гены *fumA-fumC* были замещены кассетой *cat-sacB*.

4.3.2. Рост штаммов с удаленными генами фумараз

Полученные на предыдущем этапе штаммы, у которых были удалены фумаразы, сравнивались по росту на среде LB. С этой целью штаммы выращивали в колбах в течение 10 часов при 37 °С с постоянным перемешиванием и через каждый час в образцах определяли оптическую плотность при 600 нм. Результаты опытов представлены на Рисунке 4.15:

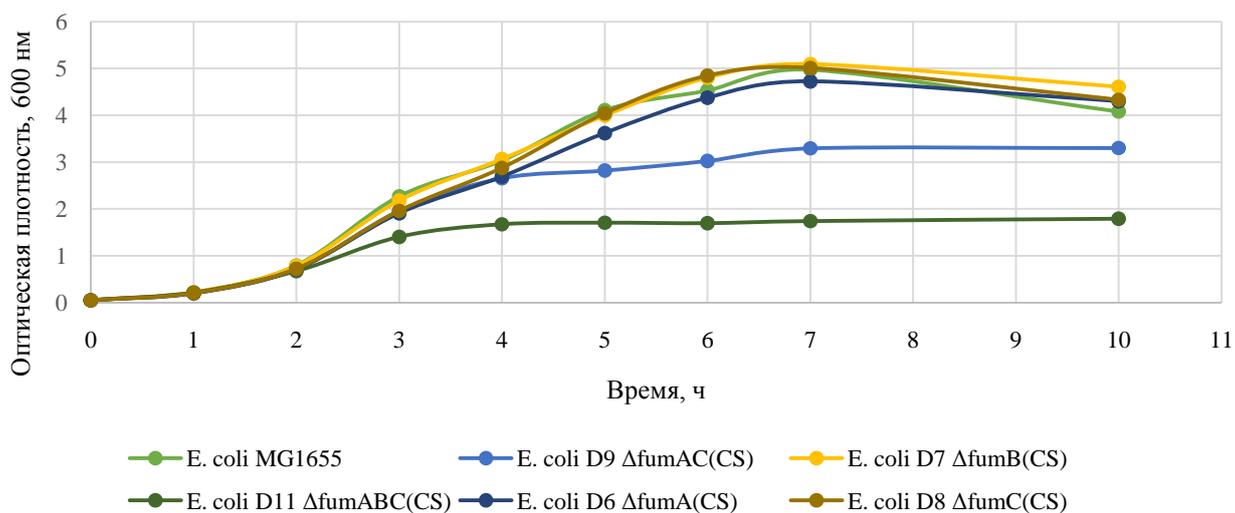


Рисунок 4.15. Рост штаммов с удаленными генами фумараз

Можно видеть, что штаммы с делецией только одного гена фумаразы практически не отличаются по характеру роста от родительского штамма. В то же время одновременное удаление генов *fumA* и *fumC* (*E. coli* D9 ΔfumAC(CS)) приводило к снижению оптической плотности культуры не менее чем на 30% по сравнению с исходным штаммом. Утрата всех трех генов фумараз у штамма *E. coli* D11 ΔfumABC(CS) приводила к существенному (не менее чем в 2 раза) снижению роста штамма по сравнению с исходным штаммом. При этом следует отметить, что различия в скорости роста наблюдались только после 2–3 ч культивирования, что, по-видимому, связано с накоплением в клетке метаболитов, ингибирующих их рост.

4.3.3. Транскрипционный анализ штаммов с удаленными генами фумараз

Уровень транскрипции генов фумараз и аспартазы в полученных штаммах был изучен с помощью ПЦР в реальном времени (Рисунок 4.16):

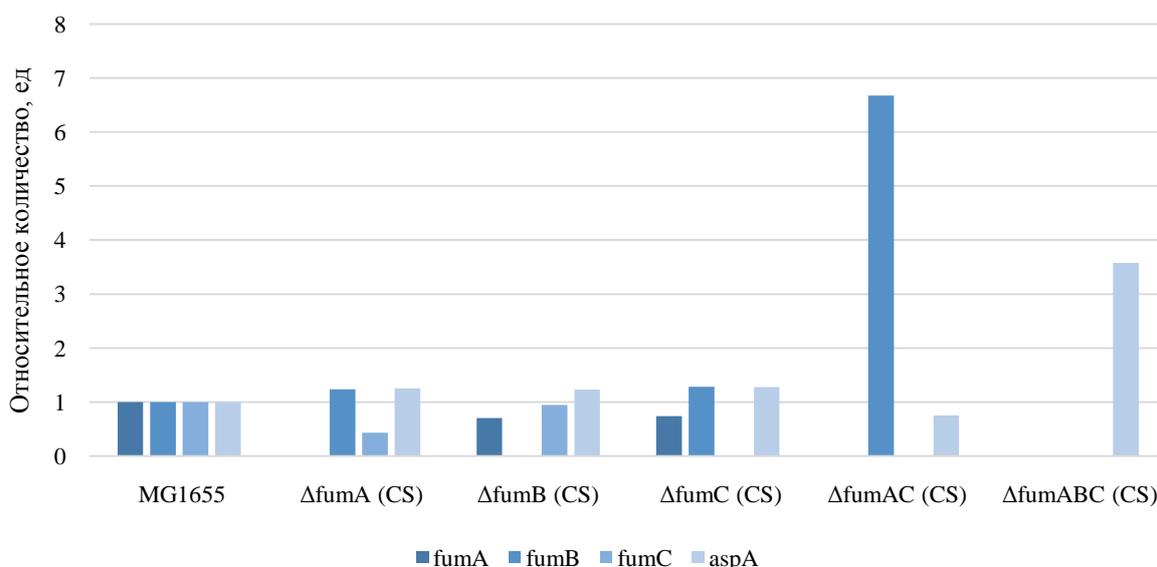


Рисунок 4.16. Уровень транскрипции генов *fumA*, *fumB*, *fumC* и *aspA* у мутантов *E. coli* с делецией генов фумараз. За единицу принят уровень транскрипции исследуемых генов в исходном штамме.

Оказалось, что уровень транскрипции генов фумараз в штаммах, у которых удален один из трех генов фумараз варьирует незначительно. При этом уровень транскрипции гена аспартазы практически не изменялся. В то же время, в штамме, в котором удалены сразу две фумаразы, FumA и FumC, наблюдается существенное в 6,7 раз увеличение транскрипции гена *fumB*. По-видимому, таким образом клетка пытается компенсировать утрату фумараз FumA и FumC, функционирующих в аэробных условиях. В этом случае уровень транскрипции гена аспартазы также не изменяется. Однако в штамме, в котором удалены сразу все фумаразы - FumA, FumB и FumC, наблюдается существенное в 3,6 раз увеличение транскрипции гена *aspA*. Это можно объяснить тем, что при удалении всех фумараз, функционирование ЦТК, по-видимому, восстанавливается за счет активизации аспартазы и использования аспаратаминотрансферазы (Рисунок 4.17).



Рисунок 4.17. Предполагаемое функционирование ЦТК при удаленных фумаразах. Черным курсивом выделены ферменты, участвующие в реакции

Вместе с тем, отсутствовала корреляция между уровнем транскрипции гена и уровнем аспартазной активности в тех же клетках (Таблица 4.5), что скорее всего связано с особенностями формирования активного фермента за счет посттрансляционных модификаций.

Таблица 4.5. Измерение аспартазной активности в штаммах с удаленными фумаразами.

Штамм	Активность, мкМ/мг*мин
<i>E. coli</i> MG1655	3
<i>E. coli</i> D6 ΔfumA (CS)	3,5
<i>E. coli</i> D7 ΔfumB (CS)	3,7
<i>E. coli</i> D8 ΔfumC (CS)	4,1
<i>E. coli</i> D9 ΔfumAC (CS)	5,7
<i>E. coli</i> D11 ΔfumABC (CS)	4,5

4.3.4. Синтез L-аспарагиновой кислоты с использованием полученных штаммов

Полученные штаммы были использованы в качестве биокатализатора синтеза L-аспарагиновой кислоты из раствора фумарата аммония. Для этого клетки каждого штамма

осаждали центрифугированием и разводили в 10 мМ фосфатном буфере до $ОП_{600} = 0,3$. Суспензию клеток обрабатывали этилацетатом и смешивали с 1 М раствором fumarата аммония. Инкубирование проводили при 37°C в течение 22 ч с постоянным перемешиванием. В полученной реакционной смеси определяли содержание L-аспарагиновой, fumarовой и яблочной кислот с помощью ВЭЖХ. В качестве контроля использовали исходный штамм *E. coli* MG1655. Результаты такого анализа представлены на Рисунке 4.18:

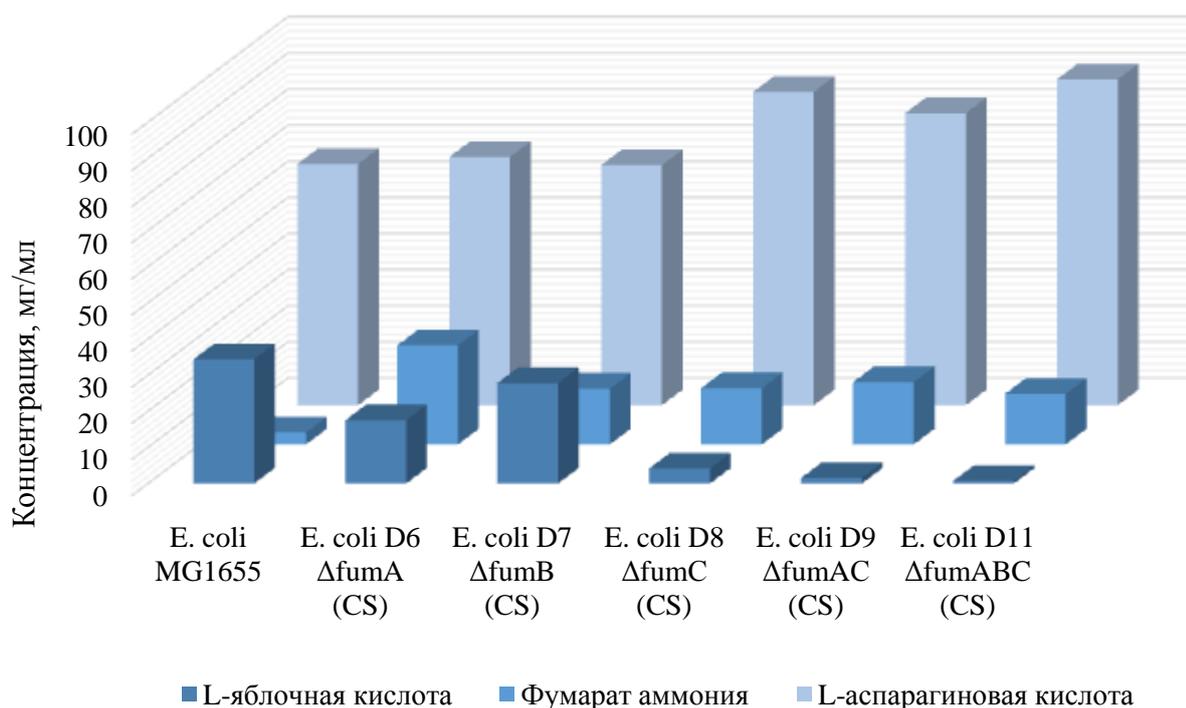


Рисунок 4.18. Содержание органических кислот в образцах реакционной смеси после окончания синтеза L-аспарагиновой кислоты при использовании в качестве биокатализаторов клеток штаммов с удаленными генами fumarаз.

Из результатов, представленных на Рисунке 4.17 следует, что максимальный уровень накопления L-аспарагиновой кислоты наблюдается в случае использования в качестве биокатализатора клеток штамма *E. coli* D11 Δ fumABC (CS) (90,2 мг/мл). Повышенный уровень накопления L-аспарагиновой кислоты наблюдается при использовании клеток штаммов *E. coli* D8 Δ fumC (CS) (86,7 мг/мл) и *E. coli* D9 Δ fumAC (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, 1,54 мг/мл и 0,7 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 Δ fumA (CS) и *E. coli* D7 Δ fumB (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 фумараз (*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 фумараз, 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 фумараз и изучению их каталитических свойств были далее использованы для получения промышленных биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты.

4.4. Создание промышленных биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты на основе штаммов *Escherichia 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, которая образуется в клетках конститутивно, независимо от присутствия индукторов в среде;
- Штаммы должны обладать низким уровнем фумаразной активности, что блокирует образование яблочной кислоты, являющейся побочным продуктом при синтезе L-аспарагиновой кислоты;
- Штаммы не должны содержать плазмид и других трансмиссивных элементов, что соответствует современным требованиям безопасности;
- Для выращивания штаммов должны использоваться простые среды, обеспечивающие получение большого количества биомассы с высокой аспартазной активностью.

Получение штаммов, удовлетворяющих этим требованиям, было достигнуто путем объединения в одном штамме модификаций промотора гена аспартазы (замещение собственного промотора гена *aspA* в хромосоме на фаговые конститутивные промоторы) и удалением генов фумараз (делеции гена *fumC* или генов *fumA-fumC*).

4.4.1. Создание штаммов для промышленных биокатализаторов

Для получения штаммов *Escherichia coli* с высокой аспартазной и сниженной фумаразной активностями в качестве исходного штамма для конструирования был использован штамм *E. coli* D2, обладающий высоким уровнем конститутивной аспартазной активности за счет замены собственного промотора гена *aspA* в хромосоме на сильный конститутивный промотор P_{G25} (раздел 4.2.2). Удаление генов *fumC* и *fumA-fumC* проводилось с использованием λ Red-зависимой системы рекомбинации как это описано в разделе 4.3.1 для получения штаммов *E. coli* D8 Δ fumC(CS) и *E. coli* D9 Δ fumAC(CS). Полученные штаммы были обозначены *E. coli* D12 P_{G25}-aspA Δ fumC(CS) и *E. coli* D13 P_{G25}-aspA Δ fumAC(CS).

4.4.2. Рост и аспартазная активность полученных штаммов

Рост и аспартазная активность полученных штаммов была изучена в колбочных экспериментах. С этой целью штаммы выращивали в колбах на среде LB в течение 16 часов при 37 °С с постоянным перемешиванием. При этом через каждый час культивирования отбирались образцы культур и определялась их оптическая плотность при длине волны 600 нм, а также аспартазная активность. Результаты опыта представлены на Рисунке 4.19 и Рисунке 4.20:

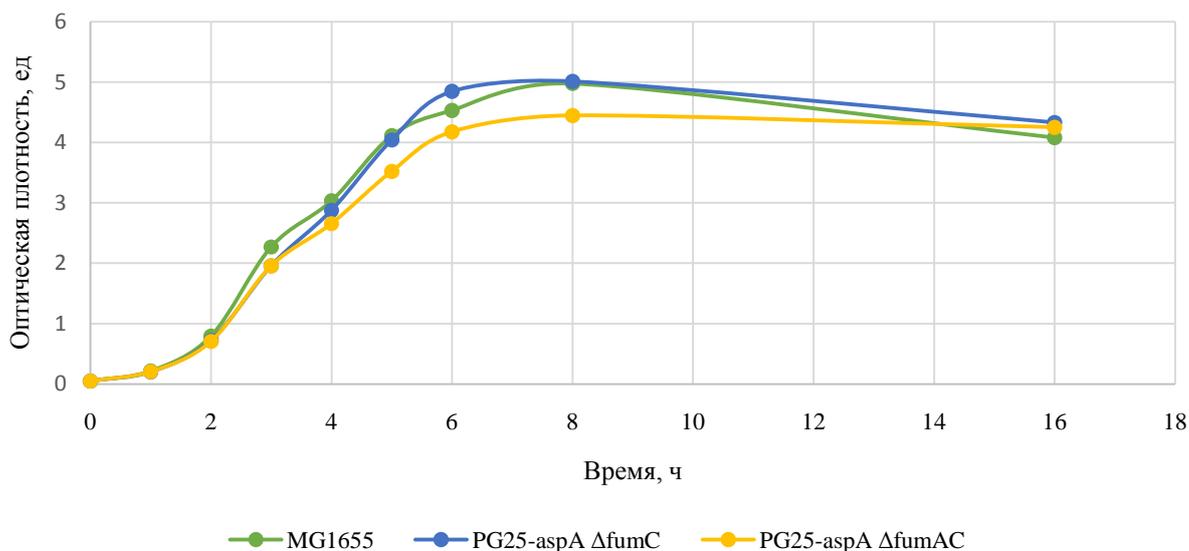


Рисунок 4.19. Рост штаммов-биокатализаторов *E. coli* D12 P_{G25-aspA} Δ*fumC*(CS) и *E. coli* D13 P_{G25-aspA} Δ*fumAC*(CS)

Можно видеть, что по характеру роста штамм с делецией гена *fumC* практически не отличается от родительского штамма *E. coli* MG1655. Делеция обоих генов *fumA* и *fumC* (штамм D13 Δ*fumAC*(CS)) приводила к незначительному снижению его роста (10-14%) по сравнению с родительским штаммом.

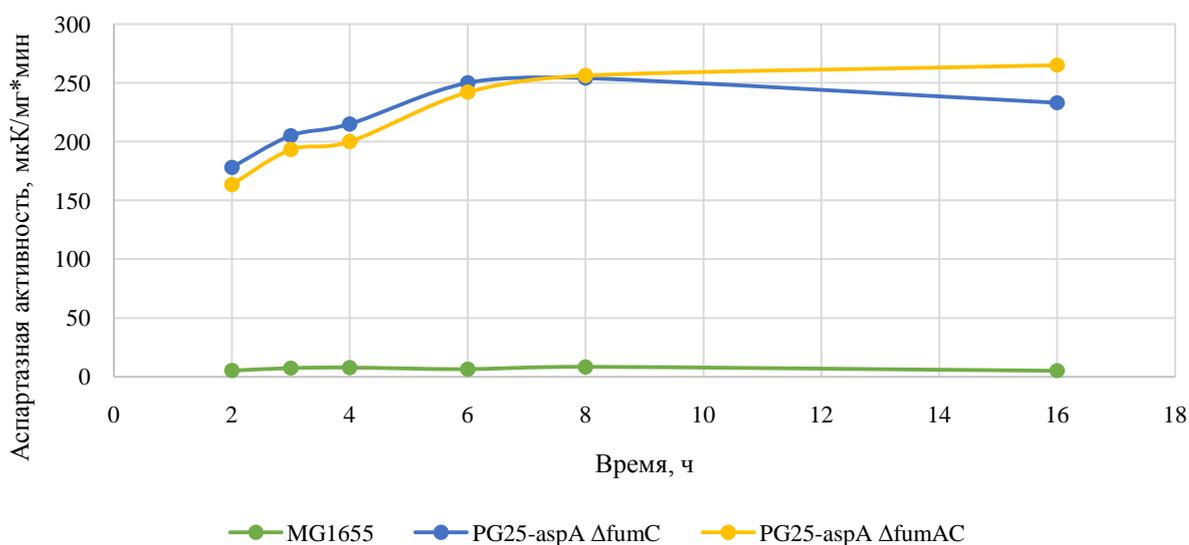


Рисунок 4.20. Аспартазная активность штаммов-биокатализаторов *E. coli* D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и *E. coli* D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS)

Результаты определения аспартазной активности показывают, что штамм *E. coli* D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) проявляет максимальную активность после 6-8 часов культивирования, которая составляет 250-254 мкМ/мг*мин. При дальнейшем культивировании активность не увеличивается. Штамм *E. coli* D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) также показывает высокую активность после 6-8 часов культивирования и составляла 242-256 мкМ/мг*мин. Максимальная активность для клеток этого штамма наблюдалась после 16 часов культивирования и составляла 265 мкМ/мг*мин. Активность родительского штамма *E. coli* MG1655 не превышала 8,4 мкМ/мг*мин.

Таким образом, полученные в ходе конструирования штаммы, предназначенные для создания промышленных биокатализаторов, обладали высокой аспартазной активностью (около 250 ед\мг), что почти в 30 раз превышало уровень активности родительского штамма.

4.4.3. Биосинтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония с использованием штаммов D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS)

Предварительно выращенные на среде LB клетки штаммов D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) были использованы в качестве биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония. Для этого клетки каждого штамма осаждали центрифугированием и разводили в 10 мМ фосфатном буфере до ОП₆₀₀ = 0,3. Суспензию клеток обрабатывали этилацетатом и смешивали с 1 М раствором фумарата аммония. Инкубирование проводили при 37°C в течение 22 ч с постоянным перемешиванием. В реакционной смеси определяли содержание L-аспарагиновой, фумаровой и яблочной кислот

с помощью ВЭЖХ. В качестве контроля использовали биомассу родительского штамма *E. coli* MG1655, а также штамма *E. coli* ВКПМ В-7188, применяющегося в настоящее время на ЗАО «Биоамид». Результаты этого анализа представлены на Рисунке 4.21:

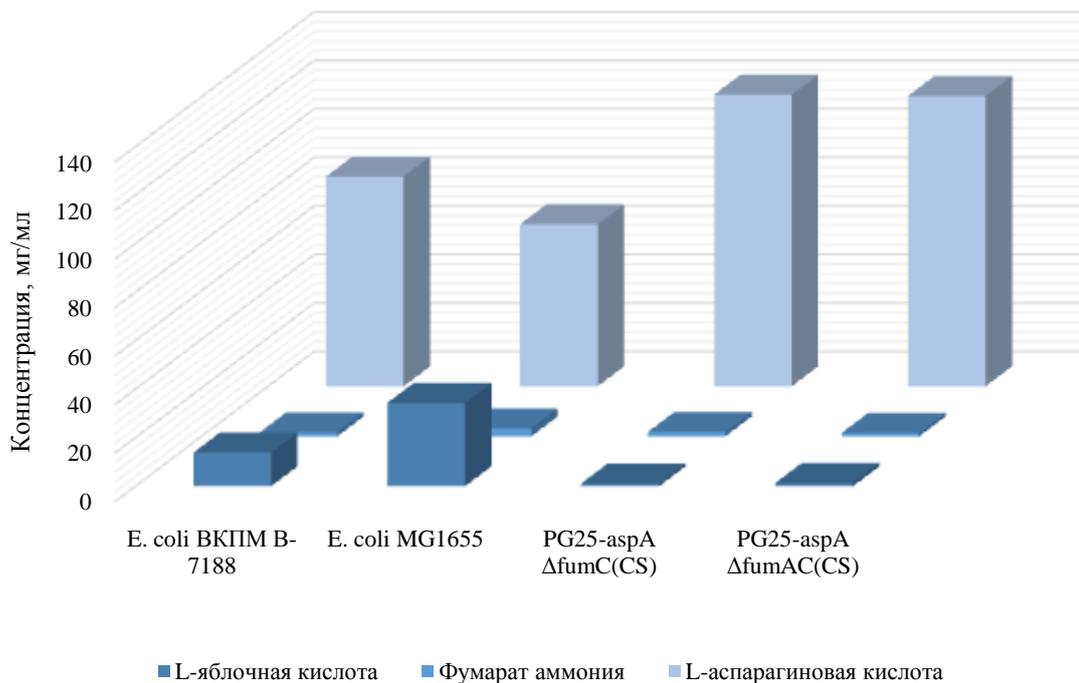


Рисунок 4.21. Содержание органических кислот в образцах реакционной смеси после окончания синтеза L-аспарагиновой кислоты при использовании в качестве биокатализаторов клеток штаммов D12 P_{G25-aspA} ΔfumC(CS) и D13 P_{G25-aspA} ΔfumAC(CS).

Из результатов, представленных на рисунке 4.20, следует, что полученные штаммы D12 P_{G25-aspA} ΔfumC(CS) и D13 P_{G25-aspA} ΔfumAC(CS) являются более эффективными катализаторами по сравнению с родительским штаммом MG1655 и штаммом ВКПМ В-7188, используемым в настоящее время в промышленности. Выход L-аспарагиновой кислоты составил для разных штаммов: D12 P_{G25-aspA} ΔfumC(CS) - 120,2 мг/мл; D13 P_{G25-aspA} ΔfumAC(CS) - 119,7 мг/мл; MG1655 - 66,8 мг/мл; ВКПМ В-7188 – 86,5 мг/мл. Применение полученных штаммов повысило выход L-аспарагиновой кислоты на 40% по сравнению со штаммом ВКПМ В-7188. При этом содержание яблочной кислоты в реакционной смеси также было существенно снижено: в случае штамма D12 P_{G25-aspA} ΔfumC(CS) – 1,2 мг/мл и D13 P_{G25-aspA} ΔfumAC(CS) – 1,4 мг/мл, в то время как в случае родительского штамма MG1655 содержание яблочной кислоты достигало 34,4 мг/мл, а в случае штамма ВКПМ В-7188 – 13,9 мг/мл. Содержание субстрата – фумарата во всех образцах не превышало 3 мг/мл.

Таким образом, использование в качестве биокатализатора клеток штаммов D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) с высокой аспартазной и низкой фумаразной активностями позволило не менее чем на 40% повысить выход L-аспарагиновой кислоты и не менее чем в 10 раз снизить содержание L-яблочной кислоты по сравнению со штаммом *E. coli* ВКПМ В-7188.

4.4.4. Нарботка биомассы штаммов в лабораторном ферментере и получение иммобилизованной формы биокатализаторов BD12 и BD13

Нарботку биомассы штаммов *E. coli* D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и *E. coli* D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) проводили в лабораторном ферментере объемом 20 л. Работы проводились совместно с сотрудником ЗАО «Биоамид» Синолицким Максимом Константиновичем на пилотной установке ЗАО «Биоамид». Для нарботки биомассы была использована среда следующего состава: КН₂РО₄ – 4 г/л, ледяная уксусная кислота – 5 г/л, NaOH – 5,1 г/л, дрожжевой экстракт – 50 г/л, MgSO₄ – 0,5 г/л, pH 7,0. Клетки выращивали в течение 22-27 часов (Таблица 4.6).

Таблица 4.6. Сравнение штаммов D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) при культивировании в 20 л ферментере

Показатели	ВКПМ В-7188	D12 P _{G25} -aspA ΔfumC(CS)	D13 P _{G25} -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

Урожай биомассы составил для штамма D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) – 15,1 г/л на 22 час культивирования, а для штамма D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) – 10,1 г/л на 27 час культивирования. Удельная активность клеток штамма D12 составила 58,2 мкМ/мин*мг и D13 - 67,1 мкМ/мин*мг. При этом общая активность культуры D12 превысила 2400 мкМ/мин*мл КЖ, а D13 – 1800 мкМ/мин*мл КЖ. В этих же условиях штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 обладал следующими характеристиками: урожай клеток - 6,5 г/л после 16 часов культивирования, удельная активность - 15 мкМ/мин*мг и общая активность – 268 мкМ/мин*мл КЖ. Таким образом созданные штаммы при их выращивании в ферментерах по

всем показателям (урожай клеток, удельная активность клеток, общая активность культуры) превосходили штамм *E. coli* ВКПМ В-7188.

Промышленная форма биокатализатора получения L-аспарагиновой кислоты представляет собой биомассу клеток, иммобилизованную в матрицу сшитого полиэтиленimina и измельченную в виде гранул. Для создания промышленных форм биокатализаторов полученную биомассу штаммов *E. coli* D12 P_{G25}-aspA ΔfumC(CS) и *E. coli* D13 P_{G25}-aspA ΔfumAC(CS) иммобилизовали в матрицу сшитого полиэтиленimina как это описано в разделе 3.10 и измельчали в виде гранул размером 0,5-1,5. Иммобилизованные биокатализаторы были обозначены BD12 и BD13.

4.4.5. Изучение каталитических свойств промышленных форм иммобилизованных биокатализаторов

Полученные биокатализаторы BD12 и BD13 были исследованы в процессах синтеза L-аспарагиновой кислоты в реакторах колонного типа. С этой целью через реакторы, заполненные гранулами биокатализаторов прокачивался 1,3 М раствор фумарата аммония (рН=8,5), а состав выходящего из реактора раствора анализировался с помощью ВЭЖХ. Скорость прокачки субстрата подбиралась таким образом, чтобы в выходящем растворе отсутствовал фумарат аммония. По мере снижения активности биокатализатора скорость прокачки снижалась. Период времени, за который скорость прокачки снижалась в 2 раза, соответствовал периоду полуинактивации. 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 BD12 и BD13 превысила 1400 кг аспарагиновой кислоты /кг БК, что превысило в 7 раз продуктивность базового биокатализатора (Таблица 4.7).

Таблица 4.7. 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 ΔfumC(CS)**	<i>E. coli</i> D13 ΔfumAC(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.

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_{G25}) 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.

4.5. Модификация аспартазной активности у *Corynebacterium glutamicum* и оценка их влияния на биосинтез лизина

Штаммы *Corynebacterium* широко используются для получения в промышленных масштабах аминокислот аспарагинового семейства, прежде всего, лизина. Известно, что штаммы *Corynebacterium glutamicum* не обладают аспартазной активностью [Menkel E. et al., 1989]. Однако секвенирование геномов ряда штаммов *Corynebacterium glutamicum* во всех случаях выявляет присутствие в геномах генов аспартазы. На предыдущем этапе работы (раздел 4.1.3.) нами были клонированы гены аспартазы из двух штаммов *C. glutamicum* ATCC13032 и 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*.

Представляло значительный интерес выяснить какое влияние оказывает изменение уровня аспартазной активности у *Corynebacterium glutamicum* на биосинтез лизина. Эта работа была выполнена с использованием штамма *Corynebacterium glutamicum* H115 (ранее известного как *Brevibacterium lactofermentum*) - продуцента лизина, сконструированного в ФГБУ «ГосНИИгенетика» в рамках выполнения Соглашения с Минобрнауки РФ о предоставлении субсидии от 17 ноября 2014 г. № 14.626.21.0003. Уровень аспартазной активности штаммов *C. glutamicum* был изменен с помощью методов геной инженерии за счет экспрессии в этих штаммах гена *aspA* из *E.coli*.

4.5.1. Конструирование плазмиды для экспрессии гена *aspA* из *E. coli* в штаммах *Corynebacterium glutamicum*

Рекомбинантная плазида с геном *aspA* из *E. coli*, способная автономно поддерживаться в клетках *Corynebacterium glutamicum* и обеспечивать экспрессию гена *aspA*, была создана на основе плазмиды pNS-cat72 [Тарутина М.Г. и др., 2015].

Наработку фрагмента для клонирования, содержащего ген аспартазы *aspA*, проводили с помощью ПЦР-амплификации используя праймеры D.aspA2-F (5'-GAAGTCCAGGAGGACATACCATGTCAAACAACATTCGTAT-3') и D.aspA2-R (5'-TTTCTCGGATCCACCGGTCATGGCCTACCTCCTTTTCATCGGAGCTTACTGTTTCGCTTTCA TCAGTA-3'). В качестве матрицы для синтеза использовалась хромосома штамма *E. coli* ВКПМ В-7188. Фрагмент, содержащий промотор *P eftu*, был получен с помощью ПЦР амплификации при использовании в качестве матрицы геномной ДНК штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 и праймеров D.eftu2-F (5'-

АТАСГААТГТТГТТТГАСАТГГТАТГТССТССТГГАСТТС-3') и D.eftu2-R (5'-TGCAGTCGACTTTGTCGACGATATCTGGCCG-3'). Оба полученных фрагмента соединялись вместе с помощью ПЦР-амплификации с использованием праймеров D.eftu2-F и D.aspA2-R. Объединенный таким образом фрагмент, был обработан рестриктазами BamHI и SalI и лигирован в плазмиду pNS-cat72, обработанную сходным образом.

Полученную плазмиду далее трансформировали в штамм *E. coli* XL1-Blue, в котором на хлорамфениколе был отобран один клон, содержащий необходимую конструкцию. Плазида получила название pDL-4 и ее структура была подтверждена секвенированием. Далее плазмиду pDL-4 путем электротрансформации вводили в штамм *Corynebacterium glutamicum* H115. При этом был получен штамм, обозначенный *C. glutamicum* H115 pDL-4.

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

Рост штамма *C. glutamicum* H115 pDL-4 в условиях, при которых происходит активный синтез лизина был изучен в колбочных экспериментах (Таблица 4.8). Штаммы растили с добавлением различных концентраций fumarата аммония (от 25 до 150 мМ). В случае экспрессии гена *aspA* в клетках *C. glutamicum* fumarат аммония мог служить субстратом для синтеза L-аспарагиновой кислоты с помощью аспартазы. Образцы культур через 24 и 48 часов культивирования анализировали на оптическую плотность и аспартазную активность, измеряемую на целых клетках как это описано в разделе 3.3.7. В качестве контроля использовали культуру штамм *C. glutamicum* H115. Результаты этого опыта представлены в Таблице 4.8:

Таблица 4.8 Рост штаммов *C. glutamicum* на средах с добавлением fumarата аммония

Штамм	Оптическая плотность культур, выросших на ферментационной среде* с добавлением 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

*Состав ферментационной среды: KH_2PO_4 – 1 г/л, NH_4Cl – 25 г/л, 50% гидролизат пшеницы – 100 мл/л, 50% глюкоза – 20 мл/л, 0,01% биотин – 0,1 мл/л, 0,02% тиамин – 0,1 мл/л, 10% MgSO_4 – 10 мл/л, мел – 25 г/л, значение pH среды до 7,0.

Из результатов, представленных в таблице следует, что введение плазмиды с геном аспартазы практически не сказалось на росте штаммов. Можно отметить незначительное

снижение оптической плотности культур *C. glutamicum* H115 pDL-4 на 24 час, растущих в присутствии фумарата аммония. Уровень аспартазной активности полученных культур *C. glutamicum* представлен в Таблице 4.9.

Таблица 4.9. Аспартазная активность культур *C. glutamicum* на средах с добавлением фумарата аммония

Штамм	Активность культур, выросших при добавлении фумарата 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

Культуры штамма *C. glutamicum* H115 независимо от среды и времени культивирования (24 или 48 час) не обладали аспартазной активностью, что совпадает с ранее полученными данными на других штаммах *C. glutamicum* [Menkel E., 1989]. В то же время введение в штамм *C. glutamicum* H115 плазмиды с геном *aspA* привело к возрастанию аспартазной активности. После 24 часов культивирования уровень аспартазной активности штамма *C. glutamicum* H115 (pDL-4) составил 13,3 – 15,9 мкМ/мг*мин. При этом аспартазная активность незначительно снижалась с ростом концентрации фумарата аммония в среде. После 48 часов активность плазмидного штамма снижалась до 7 мкМ/мг*мин (Таблица 4.9).

4.5.3. Уровень синтеза лизина в штамме *C. glutamicum* H115 с повышенной аспартазной активностью

В культуральной жидкости штаммов *C. glutamicum*, выращенных на ферментационной среде (раздел 4.5.2) было определено содержание лизина. Кроме того, в этих же образцах было определено содержание аспарагиновой, фумаровой и яблочной кислот с помощью ВЭЖХ. Результаты такого анализа представлены на Рисунке 4.22 и Рисунке 4.23.

Через 24 час культивирования, содержание лизина в культуральной жидкости в случае штамма *C. glutamicum* H115 pDL-4, экспрессирующего аспартазу, 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 рекомбинантного штаммов. При этом в культуральной жидкости отмечается увеличение содержания фумарат аммония в случае родительского

штамма. В случае рекомбинантного штамма с высокой аспартазной активностью, в КЖ отсутствует фумарат аммония, однако появляется аспарагиновая кислота, содержание которой возрастает (с 0 до 19,8 г/л) с увеличением количества добавленного фумарата аммония. Накопление аспарагиновой кислоты свидетельствует о функциональной активности аспартазы в клетках *C. glutamicum* H115 pDL-4 в условиях синтеза лизина.

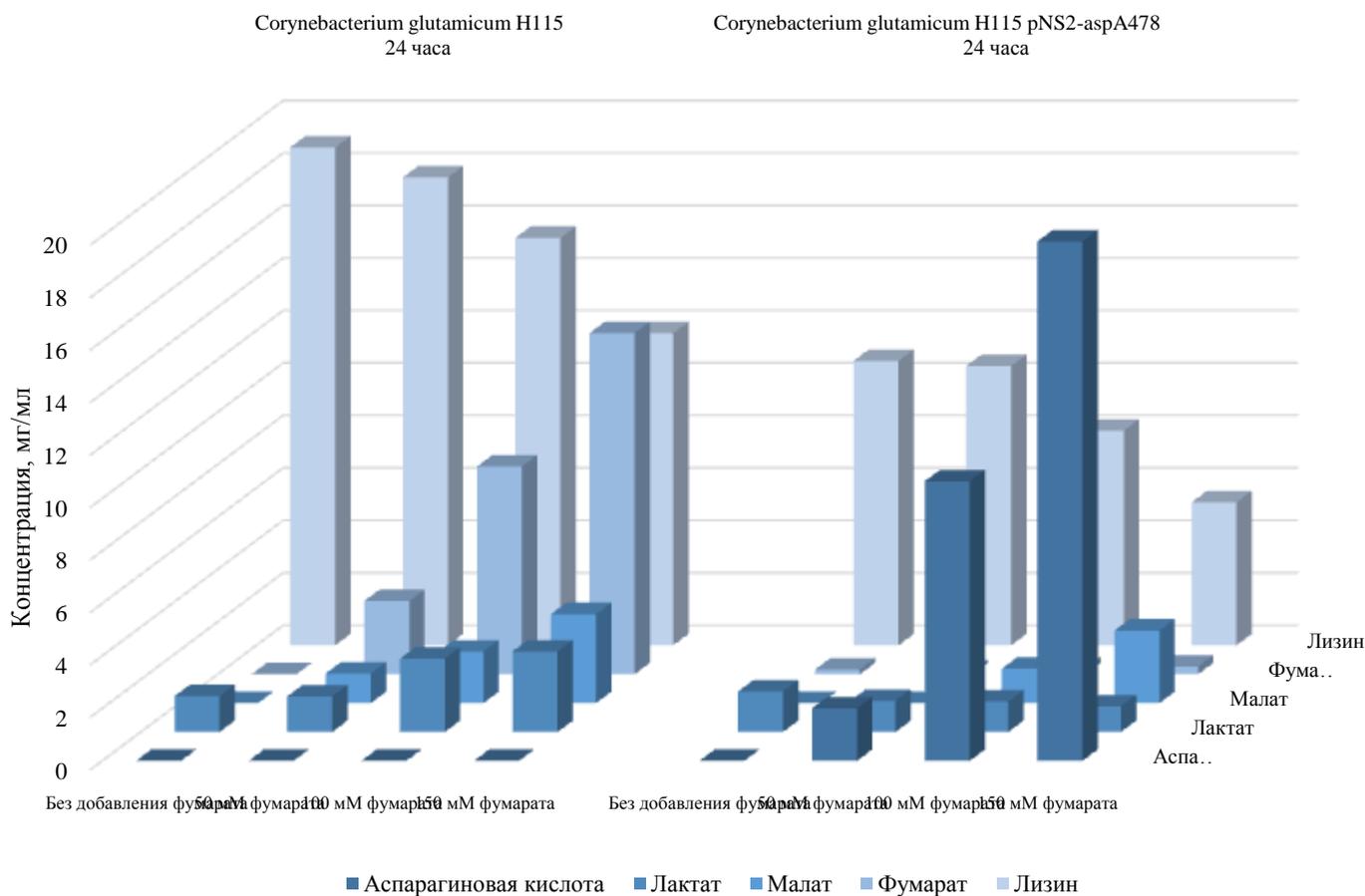


Рисунок 4.22. Содержание лизина и органических кислот в культуральной жидкости после выращивания штаммов *C. glutamicum* в течение 24 часов.

Через 48 час культивирования, содержание лизина в культуральной жидкости увеличивается до 33-34 г/л для обоих штаммов – контрольного и плазмидного (Рисунок 4.23). При добавлении фумарата аммония в обоих случаях (контрольный и плазмидный штаммы) 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)

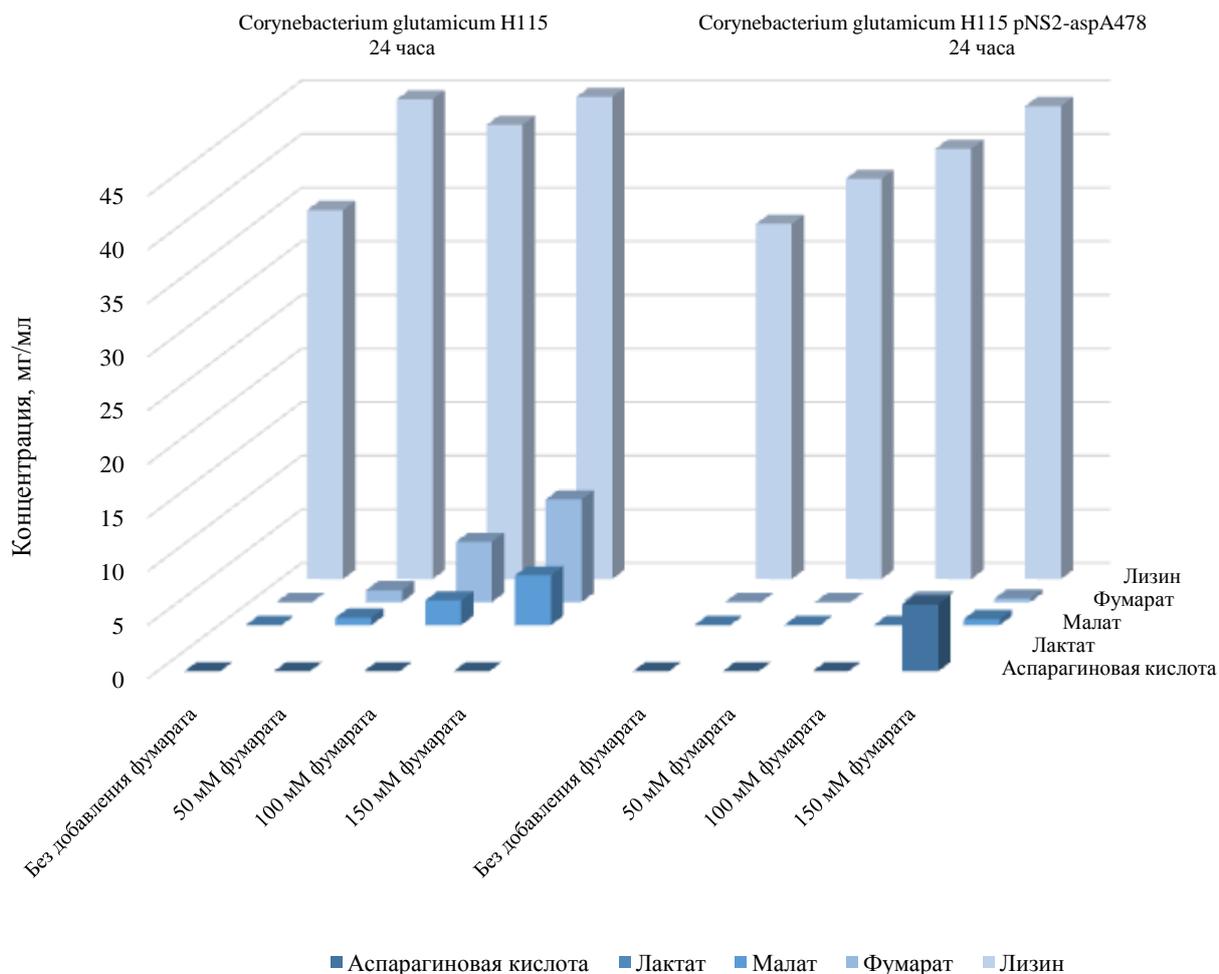


Рисунок 4.23. Содержание лизина и органических кислот в культуральной жидкости после выращивания штаммов *C. glutamicum* в течение 48 часов.

Таким образом, добавление в среду фумарата аммония увеличивало образование лизина. В случае штамма с высокой аспартазной активностью в КЖ накапливалась аспарагиновая кислота, которая образовывалась из фумарата аммония, что указывало на наличие лимитирующей стадии в процессе превращения аспартата в лизин. На этом основании был сделан вывод, что в штамме *C. glutamicum* H115 доступность аспартата не является лимитирующей стадией для синтеза лизина.

Заключение

Бактериальный фермент аспарат-аммоний лиаза (аспартаза) является в настоящее время одним из наиболее востребованных ферментов в промышленной биотехнологии. На сегодняшний день все производство L-аспарагиновой кислоты в мире базируется на использовании клеток, имеющих высокую аспартазную активность, в качестве биокатализатора процесса аминирования фумаровой кислоты. В связи с высокой востребованностью L-аспарагиновой кислоты в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и медицине, объемы её производства превысили 40 тыс. тонн в год и продолжают увеличиваться примерно на 5% каждый год (по данным консалтингового агентства Grand View Research). В этой связи сохраняют актуальность работы по созданию новых, более эффективных биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты на основе бактериальных штаммов, которые обладают высокой аспартазной активностью и у которых отсутствуют побочные активности.

Настоящая работа была посвящена сравнительному исследованию аспартаз из разных источников и конструированию с применением ДНК технологий новых бактериальных штаммов, обладающих высоким уровнем аспартазной активности; низким уровнем побочной фумаразной активности, приводящей к образованию яблочной кислоты; соответствующих требованиям безопасного использования и созданию на их основе эффективных биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты.

Объектами исследований настоящей работы являлись аспартазы из бактерий *E. coli*, *Bacillus sp.* YM55-1 и *Corynebacterium glutamicum*. Выбор этих аспартаз в качестве объектов исследований был обусловлен уникальностью штаммов, содержащих эти ферменты: штамм *E. coli* ВКПМ В-7188 применяется в настоящее время в России для промышленного получения аспарагиновой кислоты; штаммы *Corynebacterium glutamicum* широко применяются в биотехнологии производства аминокислот; в то же время аспартаза из штамм *Bacillus sp.* YM55-1 обладает уникальными каталитическими свойствами.

Сравнительный анализ физико-химических и каталитических свойств изучаемых аспартаз позволил сделать выбор в пользу использования аспартазы из *E. coli* для создания на её основе нового семейства биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты. Из трех изученных аспартаз именно аспартаза из *E. coli* обладала максимальной удельной активностью, что является существенным преимуществом для использования этого фермента в качестве катализатора синтеза аспарагиновой кислоты. В то же время следует отметить, что аспартаза из *Bacillus sp.* YM55-1 обладала более высокой термостабильностью,

чем аспартазы из *E.coli* и для проявления её активности не требовались ионы магния, что является важным преимуществом для биокаталитического получения аспарагиновой кислоты. Однако её удельная активность была почти в два раза ниже активности аспартазы из *E.coli*. Ранее, в работе [Kawata Y. et al., 1999] было показано, что удельная активность аспартазы из *Bacillus sp.* YM55-1 в четыре раза выше чем активность аспартазы из *E.coli*, что не нашло подтверждения в нашей работе. Требуются дальнейшие исследования для выяснения причин этих отличий.

Бактериальные штаммы, на основе которых разрабатываются промышленные биокатализаторы синтеза L-аспарагиновой кислоты должны соответствовать, по крайней мере, двум главным критериям – обладать высоким уровнем аспартазной активности и низким уровнем фумаразной активности – побочной активности, приводящей к образованию яблочной кислоты в процессе синтеза аспарагиновой кислоты. Кроме того, современные требования к промышленным штаммам запрещают использование плазмид и мобильных элементов. Для конструирования штаммов, отвечающим этим требованиям, нами была выбрана стратегия осуществления генетических изменений в составе хромосомы, направленных на усиление аспартазной активности и снижение фумаразной активности. Результатом таких изменений является создание бесплазмидных штаммов с высокой ферментативной активностью. Система рекомбинации фага лямбда (λ Red система) обеспечила быстрый и эффективный способ введения генетических модификаций в хромосоме *E.coli*. С помощью этой системы была осуществлена 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 этих промоторов позволила повысить аспартазную активность клеток с 6,2-8,8 мкМ/мг*мин до 250-264 мкМ/мг*мин, т.е не менее чем в 28 раз по сравнению с родительским штаммом. Такие штаммы обладали хорошими ростовыми характеристиками на простых средах и проявляли активность в отсутствие индуктора в среде.

Аналогичный подход был использован для снижения фумаразной активности штамма. Решение этой проблемы осложнялось тем обстоятельством, что бактерии *E.coli* содержат три гена фумараз – *fumA*, *fumB* и *fumC*, которые катализируют превращение фумарата в малат при разных условиях. Фумараза *fumA* синтезируется в микроаэрофильных условиях. Фумараза *fumB* синтезируется только в анаэробных условиях. Фумараза *fumC* является доминирующим ферментом в аэробных условиях, также полагают, что она активна в условиях оксидативного стресса. С использованием системы рекомбинации фага λ были получены штаммы, у которых были инактивированы либо один из генов, кодирующих

фумаразу, либо комбинация этих генов. Изучение каталитических свойств этих мутантов позволило сделать вывод о том, что для снижения содержания L-яблочной кислоты в реакционной смеси в процессе синтеза L-аспарагиновой кислоты необходимым условием является инактивация, по крайней мере, одного гена - *fumC*. Удаление этого гена позволило снизить количество образующейся яблочной кислоты с 34,4 мг/мл до 4,2 мг/мл. Еще более сильное снижение содержания яблочной кислоты наблюдалось при инактивации двух (*fumA* и *fumC*) или трех генов (*fumA*, *fumB*, *fumC*). Однако в последнем случае наблюдалось существенное снижение роста штаммов. На этом основании было принято решение о том, что для создания промышленного штамма с пониженной фумаразной активностью достаточно инактивации только одного гена *fumC* или двух генов *fumA* и *fumC*.

Таким образом бактериальный штамм, в полной мере отвечающий требованиям, предъявляемым к биокатализаторам, был получен путем объединения двух генетических модификаций: замены собственного промотора гена аспартазы на сильный конститутивный промотор и делеции гена фумаразы. Полученные штаммы *E.coli* D12 P_{G25}-aspA Δ*fumC* и D13 P_{G25}-aspA Δ*fumAC* в условиях пилотной установки промышленного партнера (ЗАО «Биоамид») показали, что в ферментерах удается получить культуры, аспартазная активность которых в 10 раз превышает уровень аспартазной активности штамма *E. coli* ВКПМ В-7188, на основании которого создан биокатализатор, используемый в настоящее время в промышленности.

На основе сконструированных штаммов были получены биокатализаторы, представляющие собой клетки, иммобилизованные в матрицу сшитого полиэтиленimina. Исследования каталитических свойств новых биокатализаторов в процессах синтеза L-аспарагиновой кислоты в реакторах колонного типа позволили выявить главные преимущества созданных биокатализаторов. Период инактивации у новых биокатализаторов превысил 150 суток, в то время как для базового катализатора (ВКПМ В-7188) период инактивации составил 90 суток. При использовании новых биокатализаторов в реакционной среде резко снижалось содержание яблочной кислоты с 5-6 г/л (базовый катализатор) до 0,5 г/л. За весь период работы продуктивность биокатализаторов BD12 и BD13 составила 1400 кг аспарагиновой кислоты/кг БК, что в 7 раз превысило продуктивность базового катализатора.

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 G25 и сниженной фумаразной активностью за счет делеции генов *fumC* или

fumAC, на основе которых созданы промышленные биокатализаторы для производства L-аспарагиновой кислоты. Анализ научной и патентной литературы показал, что созданные в настоящей работе штаммы по уровню аспартазной активности превосходят многие известные аналоги (Таблица 5.1)

Таблица 5.1. Сравнение удельной аспартазной активности штаммов, применяемых для производства L-аспарагиновой кислоты

Используемый штамм	Удельная активность, мкМ/мин*мг (сух.кл.)	Наличие плазмид	Ссылка
<i>Escherichia coli</i> EAPc244	47,3	Нет	[Nishimura N. et.al., 1984]
<i>Escherichia coli</i> K12 pYT471	50-95	Да	[Nishimura N. et.al., 1987]
<i>Pseudomonas putida</i>	0,4-1,3	Нет	[Maalej S. et al., 1990]
<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue pUaspE2	111	Да	[Mukouyama M. et. al., 2004]
<i>Escherichia coli</i> D12 P _{G25} -aspA ΔfumC(CS)	250-254	Нет	Эта работа
<i>Escherichia coli</i> D13 P _{G25} -aspA ΔfumAC(CS)	242-265	Нет	Эта работа

Значение аспартаз не ограничивается только биокаталитическим производством L-аспарагиновой кислоты. В бактериальной клетке аспартазы вовлечены в метаболические пути биосинтеза аминокислот аспарагинового семейства. Активность этого фермента оказывает влияние на содержание в клетке аспарагиновой кислоты, являющейся предшественником синтеза лизина, треонина и метионина. В промышленности для производства этих аминокислот обычно используются штаммы *Corynebacterium glutamicum*. Известно, что штаммы *Corynebacterium glutamicum* практически не имеют аспартазной активности. Экспрессия гена аспартазы *aspA* из *E.coli* в клетках *Corynebacterium glutamicum* H115 - продуцентах лизина обеспечила появление аспартазной активности в клетках и позволила исследовать влияние уровня аспартазной активности у *Corynebacterium glutamicum* на биосинтез лизина. Оказалось, что в отсутствие добавок fumarата аммония продукция лизина не зависела от уровня аспартазной активности. При добавлении fumarата аммония продукция лизина возрастала независимо от уровня аспартазной активности. Анализ клеточных метаболитов позволил сделать вывод о том, что в разных штаммах fumarат аммония утилизируется по разным путям. В культуральной жидкости родительского штамма H155 без аспартазной активности обнаруживается яблочная кислота,

что указывает на участие фумаразы и аспаратаминотрансферазного пути в ассимиляции фумарата. В то же время, в культуральной жидкости штамма H155, экспрессирующего аспартазу, происходило быстрое накопление аспарагиновой кислоты, что указывает на функционирование в клетках аспартазы. Высокие концентрации аспартата указывали на наличие лимитирующей стадии в дальнейшем процессе превращения аспартата в лизин, что позволило сделать вывод о том, что в штамме *C. glutamicum* H115 доступность аспартата не является лимитирующей стадией для синтеза лизина. Этот вывод имеет большое значение для разработки дальнейшей стратегии по совершенствованию штаммов-продуцентов лизина.

Таким образом сравнительное исследование ферментов аспарат-аммоний-лиаз из разных видов бактерий, генетическое конструирование штаммов с высоким уровнем аспартазной активности, а также их использование в биокаталитических и ферментационных процессах показало, что аспарат-аммоний-лиазы обладают значительным потенциалом применения в биотехнологиях получения аминокислот.

Выводы

1. Экспрессия генов аспартаз из 3 различных источников (бактерии *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* УМ55-1 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 сокращений, использованных в работе

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

GeneBank NCBI

П.н. – пар нуклеотидов

SQ -

Нм - нанометр

А.о. – аминокислотные остатки

КЖ – культуральная жидкость

Список использованной литературы

1. **Araki M., Sugimoto M., Yoshihara Y., Nakamatsu T.** Method for producing L-lysine. // US Patent 6,004,773, 21.12.1999.
2. **Bae H.A., Kang M.G., Lee H.H., Kim H.W., Lee S.G.** Microorganism of the genus *Corynebacterium* with enhanced ability to produce L-arginine and method for producing L-arginine using the same (as amended). // US Patent 20160145661 A1, 26.05.2016.
3. **Bradford M.M.** A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. 1976, Pp. 248-254
4. **Chen H.H., Chen J.T., Tsai H.** Site-directed mutagenesis of cysteinyl residues in aspartase of *Escherichia coli*. // Ann NY Acad Sci. 1996,799. Pp. 70-73.
5. **Chen H.H., Chen J.T., Tsai H.** Site-directed mutagenesis of histidiny residues in aspartase of *Escherichia coli*. // Protein Eng. 1997, 10, P 60.
6. **Chibata I., Tosa T., Sato T.** Immobilized aspartase-containing microbial cells: preparation and enzymatic properties. // Appl Microbiol. 1974, 27(5), Pp. 878-885.
7. **Datsenko K.A., Wanner B.L.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. // Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12), Pp. 6640-6645.
8. **de Villiers M., Puthan Veetil V., Raj H., de Villiers J., Poelarends G.J.** Catalytic mechanisms and biocatalytic applications of aspartate and methylaspartate ammonia lyases. // ACS Chem Biol. 2012, 7(10), Pp. 1618-1628.
9. **Deusche U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H.** Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. // EMBO J. 1986, 5(11), Pp. 2987-2994.
10. **Drauz K., Gröger H., May O.** Enzyme catalysis in organic synthesis. // Wiley-VCH 2012, Vol. 2, 3, P. 2038.
11. **Dunn M.S., Smart B.W.** A new synthesis of aspartic acid. // J Biol Chem. 1930, 89, Pp. 41-50.
12. **Ellfolk N.** Studies on aspartase. On the chemical nature of aspartase. // Acta Chem Scand. 1953, 8, Pp. 1155-1063.
13. **Emery T.F.** Aspartase-catalyzed synthesis of N-hydroxyaspartic acid. // Biochemistry 1963, 5, Vol. 2, Pp. 1041-1045.

14. **Ertel S.I., Kohn J.** Evaluation of amino acid derived polymers as biomaterials. // PMSE 1992, 66, Pp. 224-225.
15. **Falzone C.J., Karsten W.E., Conley J. D., Viola R.E.** L-Aspartase from *Escherichia coli*: substrate specificity and role of divalent metal ions. // Biochemistry 1988, 27(26), Pp. 9089-9093.
16. **Fibriansah G., Puthan Veetil V., Poelarends G.J., Thunnissen A.M.** Structural basis for the catalytic mechanism of aspartate ammonia lyase. // Biochemistry 2011, 50(27), Pp. 6053-6062.
17. **Flickinger M.C., Drew S.W.** Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. // John Wiley & Sons, Inc., 1999, Vol. I : V.
18. **Fujii T., Sakai H., Kawata Y., Hata Y.** Crystal structure of thermostable aspartase from *Bacillus sp.* YM55-1: structure-based exploration of functional sites in the aspartase family. // J Mol Biol. 2003, 328(3), Pp. 635-654.
19. **Fusee M.C.** Industrial production of L-aspartic acid using polyurethane-immobilized cells containing aspartase. // Methods Enzymol. 1987, 136, Pp. 463-471.
20. **Fusee M.C., Swann W.E., Calton G.J.** Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartase activity with polyurethane and its application for L-aspartic acid production. // Appl Environ Microbiol. 1981, 42(4), Pp. 672-676.
21. **Giorgianni F., Beranova S., Wesdemiotis C., Viola R.E.** Mapping the mechanism-based modification sites in L-aspartase from *Escherichia coli*. // Arch Biochem Biophys. 1997, 341, Pp. 329-336.
22. **Giselbrecht K.H., Schaller J.** Process for preparing L-aspartic acid. // US Patent 6,258,572 B1, 10.07.2001.
23. **Giselbrecht K.H., Schaller J.** Process for preparing L-aspartic acid. // US Patent 5,952,206, 14.09.1999.
24. **Gou X.J., Li S., Kong, X.D., Liu W., Sun Y.H., Zhang J.** Directed evolution of L-aspartase by mobility of domains. // Chem. Res. Chin. Univ. 2004, 20, Pp. 50-54
25. **Green M.R., Sambrook J.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, Vol. 1, 3, P 2028.
26. **Grunwald P.** Industrial Biocatalysis. // Oxfordshire : Taylor & Francis Group, 2015, Vol. I, p. 391-395.
27. **Halpern Y.S., Umbarger H.E.** Conversion of ammonia to amino groups in *Escherichia coli*. // J Bacteriol. 1960, 80, Pp. 285-288.

- 28. Hu Y. Lu P., Zhang Y., Li L., Chen S.** Characterization of an aspartate-dependent acid survival system in *Yersinia pseudotuberculosis*. // FEBS Lett. 2010, 584, Pp. 2311-2314.
- 29. Ichihara K., Kanagawa H., Uchida M.** Studies on aspartase. // J Biochem. 1955, 42, Pp. 439-447.
- 30. Ida N., Tokushige M.** Assignment of catalytically essential cysteine residues in aspartase by selective chemical modification with N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarynyl)maleimide. J Biochem. 1985, 98, Pp. 793-797.
- 31. Ida N., Tokushige M.** Chemical modification of essential histidine residues in aspartase with diethylpyrocarbonate. J Biochem. 1984, 96, Pp. 793-797.
- 32. Jacobsohn K.P., Pereira F.B.** L'action du magnesium sur le systeme de l'aspartase. // Comp Rend Seanc Soc Biol Lisb. 1936, 120, Pp. 551-554.
- 33. Jayasekera M.M., Saribas A.S., Viola R.E.** Enhancement of catalytic activity by gene truncation. Activation of L-aspartase from *Escherichia coli*. // Biochem Biophys Res Commun. 1997, 238, Pp. 411-414.
- 34. Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L.** NCBI BLAST: a better web interface. // Nucleic Acids Res. 2008. 36(Web Server issue), Pp. W5-W9..
- 35. Kawata Y., Tamura K., Kawamura M., Ikei K., Mizobata T., Nagai J., Fujita M., Yano S., Tokushige M., Yumoto N.** Cloning and over-expression of thermostable *Bacillus sp.* YM55-1 aspartase and site-directed mutagenesis for probing a catalytic residue. // Eur J Biochem. 2000, 267(6), Pp. 1847-1857.
- 36. Kawata Y., Tamura K., Yano S., Mizobata T., Nagai J., Esaki N., Soda K., Tokushige M., Yumoto N.** Purification and characterization of thermostable aspartase from *Bacillus sp.* YM55-1. // Arch Biochem Biophys. 1999, 366 (1), Pp. 40-46.
- 37. Kazuoka T., Masuda Y., Oikawa T., Soda K.** Thermostable aspartase from a marine psychrophile, *Cytophaga sp.* KUC-1: molecular characterization and primary structure. // J. Biochem. 2003, 133, Pp. 51-58.
- 38. Kinnersley A.M., Koskan L.P., Strom D.J., Meah A.R.Y.** Method for more efficient uptake of plant growth nutrients. US Patent 5,593,947, 14.01.1997.
- 39. Kisumi M., Ashikaga Y., Chibata I.** Studies on the fermentative preparation of L-aspartic acid from fumaric acid. // Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 1960, 24, Pp. 296-305.
- 40. Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970, 227(5259), Pp. 680-685.

41. **Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M.** Principles of Biochemistry. // New York: W. H. Freeman 2000, 3rd ed
42. **Liese A., Seelbach K., Wandrey C.** Industrial Biotransformations. // Wiley-VCH 2006, Vol. 1, P. 570.
43. **Maalej S., Cochet N., Lebeault J.M.** Production of *Pseudomonas putida* cells with high aspartase activity. // Biotechnology letters 1990, 12(8), Pp. 557-562
44. **Mazur R.H.** Aspartic acid-based sweeteners. // Symposium: sweeteners. Westport, CT: AVI Publishing, 1974, Pp. 159-163.
45. **Menkel E., Thierbach G., Eggeling L., Sahm H.** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. // Appl Environ Microbiol. 1989, 55(3), Pp. 684-688
46. **Mescam M., Vinnakota K.C., Beard D.A.** Identification of the catalytic mechanism and estimation of kinetic parameters for fumarase. // J Biol Chem. 2011, 286 (24), Pp. 21100-9.
47. **Miers J.M.** Production of aspartic and malic acids with *Microbacterium*. US Patent 6,238,895 B1, 29.05.2001.
48. **Min K.H., Lee H.J., Kim K., Kwon I.C., Jeong S.Y., Lee S.C.** The tumor accumulation and therapeutic efficacy of doxorubicin carried in calcium phosphate-reinforced polymer nanoparticles. // Biomaterials 2012, 33 (23), Pp. 5788-5797
49. **Mizuta K., Tokushige M.** Studies on aspartase: II. Role of sulfhydryl groups in aspartase from *Escherichia coli*. // Biochimica et Biophysica Acta 1975, 403, Pp. 221-231.
50. **Mizuta K., Tokushige M.** Trypsin-catalyzed activation of aspartase. // Biochem Biophys Res Commun. 1975, 67, Pp. 741-746.
51. **Mukouyama M., Komatsuzaki S.** Method for producing L-aspartic acid. US Patent 6,214,589 B1, 10.04.2001.
52. **Mukouyama M., Yasuda S., Komatsuzaki S.** Methods for producing L-aspartic acid. US Patent 6,821,760 B1, 23.11.2004.
53. **Murase S., Kawata Y., Yumoto N.** Identification of an active dimeric form of aspartase as a denaturation intermediate. // J. Biochem. 1993, 114, Pp. 393-397.
54. **Murase S., Takagi J.S., Higashi Y., Imaishi H., Yumoto N., Tokushige M.** Activation of aspartase by site-directed mutagenesis. // Biochem Biophys Res Commun. 1991, 177(1), Pp. 414-419.
55. **Nishida Y., Sato T., Tosa T., Chibata I.** Immobilization of *Escherichia coli* cells having aspartase activity with carrageenan and locust bean gum. // Enzyme Microb Techno. 1979, 1, Pp. 95-99.

56. **Nishimura N., Komatsubara S., Kisumi M.** Increased production of aspartase in *Escherichia coli* K-12 by use of stabilized *aspA* recombinant plasmid. // Appl Environ Microbiol. 1987, 53(12), Pp. 2800-2803.
57. **Nishimura N., Kisumi M.** Aspartase-hyperproducing mutants of *Escherichia coli* B. // Appl Environ Microbiol. 1984, 48(6), Pp. 1072-1075
58. **Nishimura N., Taniguchi T., Komatsubara S.** Hyperproduction of aspartase by a catabolite repression-resistant mutant of *Escherichia coli* B harboring multicopy *aspA* and *par* recombinant plasmids. // Journal of Fermentation and Bioengineering 1989, 2(67), Pp. 107-110.
59. **Nuiry I.I., Hermes J.D., Weiss P.M., Chen C.Y., Cook P.F.** Kinetic mechanism and location of rate-determining steps for aspartase from *Hafnia alvei*. // Biochemistry 1984, 23, Pp. 5168-5175.
60. **Owczarzy R., Tataurov A.V., Wu Y., Manthey J.A., McQuisten K.A., Almabrazi H.G., Pedersen K.F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N.O., Sailor C.A., Dawson R.B., Peek A.S.** IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. // Nucleic Acids Res. 2008. 36(Web Server issue), W163-9.
61. **Park S.J., Gunsalus R.P.** Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. // J Bacteriol. 1995, 177(21), Pp. 6255-6262.
62. **Patel R.N.** Biocatalytic synthesis of chiral alcohols and amino acids for development of pharmaceuticals. // Biomolecules 2013, 3, Pp. 741-777.
63. **Plow E.F., Herren T., Redlitz A., Miles L.A., Hoover-Plow J.L.** The cell biology of the plasminogen system. // FASEB J. 1995, 9(10), Pp. 939-945.
64. **Poppe L., Retey J.** Properties and synthetic applications of ammonia-lyases. // Curr. Org. Chem. 2003, 7, Pp. 1297-1315.
65. **Quastel J.H., Woolf B.** The equilibrium between L-aspartic acid, fumaric acid and ammonia in the presence of resting bacteria. // Biochem J. 1926, 20, Pp. 545-555.
66. **Reyrat J.M., Pelicic V., Gicquel B., Rappuoli R.** Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. // Infect Immun. 1998, 66(9), Pp. 4011-4017.
67. **Rudolph F.B., From H.J.** The purification and properties of aspartase from *Escherichia coli*. // Arch Biochem Biophys. 1971, 147, Pp. 92-98.
68. **Saribas A.S., Schindler J.F., Viola R.E.** Mutagenic investigation of conserved functional amino acids in *Escherichia coli* L-aspartase. // J Biol Chem. 1994, 269, Pp. 6313-6319.

- 69. Sato T., Nishida Y., Tosa T., Chibata I.** Immobilization of *Escherichia coli* cells containing aspartase activity with kappa-carrageenan. Enzymic properties and application for L-aspartic acid production. // *Biochim Biophys Acta*. 1979, 570(1), Pp. 179-186.
- 70. Schindler J.F., Viola R.E.** Mechanism-based inactivation of L-aspartase from *Escherichia coli*. // *Biochemistry* 1994, 33, Pp. 9365-9370.
- 71. Sharma S., Dua A., Malik A.** Polyaspartic acid based superabsorbent gels with different cross-linkers- a comparative study. // *J Appl Chem*. 2016, 9, Pp. 56-66.
- 72. Shi W., Kidd R., Giorgianni F., Schindler J.F., Viola R.E., Farber G.K.** Crystallization and preliminary X-ray studies of L-aspartase from *Escherichia coli* // *J Molec Biol*. 1993, 234, Pp. 1248-1249.
- 73. Shi W., Kidd R., Giorgianni F., Schindler J.F., Viola R.E., Farber G.K.** The structure of L-aspartate-ammonia-lyase from *Escherichia coli*. // *Biochemistry* 1997, 36, Pp. 9136-9144.
- 74. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G.** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. // *Mol. Syst. Biol*. 2011, 7, P. 539.
- 75. Sjöström I., Gröndahl H., Falka G., Kronvall G., Ullberg M.** Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. // *Biochimica et Biophysica Acta* 1997, 1324, Pp. 182-190.
- 76. Song C.W., Kim D.I., Choi S., Jang J.W., Lee S.Y.** Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid. // *Biotechnol Bioeng*. 2013, 110(7), Pp. 2025-2034.
- 77. Sun D.X., Setlow, P.** Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* ans operon, which codes for L-asparaginase and L-aspartase. // *J Bacteriol*. 1991, 173(12), Pp. 3831-3845.
- 78. Sun W., Wang S., Curtiss R. 3rd** Highly efficient method for introducing successive multiple scarless gene deletions and markerless gene insertions into the *Yersinia pestis* chromosome. // *Appl Environ Microbiol*. 2008, 74(13), Pp. 4241-4245.
- 79. Suzuki S., Yamaguchi J., Tokushige M.** Studies on aspartase. I. Purification and molecular properties of aspartase from *Escherichia coli*. // *Biochim Biophys Acta*. 1973, 321 (1), Pp. 369-381.

- 80. Takagi J.S., Tokushige M., Shimura Y., Kanehisa M.** L-Aspartate ammonia-lyase and fumarate hydratase share extensive sequence homology. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, 138, Pp. 568-572.
- 81. Tosa T., Sato T., Mori T., Chibata I.** Basic Studies for Continuous Production of L-Aspartic Acid by Immobilized *Escherichia coli* Cells. // *Appl Microbio.* 1974, 27, Pp. 886-889.
- 82. Tosa T., Sato T., Mori T., Matuo Y., Chibata I.** Continuous production of L-aspartic acid by immobilized aspartase. // *Biotechnol. Bioeng.* 1973, 15, Pp. 69-84.
- 83. Tsenq C.P.** Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products. // *FEMS Microbiol Lett.* 1997, 157(1), Pp. 67-72.
- 84. Tsuchida T., Kubota K., Hirose Y.** Method for producing L-aspartic acid by fermentation. // US Patent 4,000,040, 28.12.1976.
- 85. Veetil V.P., Fibriansah G., Raj H., Thunnissen A.W.H.** Aspartase/Fumarase Superfamily: a common catalytic strategy involving general base-catalyzed formation of a highly stabilized aci-carboxylate intermediate. // *Biochemistry* 2012, 51, Pp. 4237-4243.
- 86. Viola R.E., Jayasekera M.M.K., Saribas A.S.** Truncated aspartase enzyme derivatives and uses thereof. // US Patent 6,133,013, 17.10.2000.
- 87. Viola R.E., Jayasekera M.M.K., Saribas A.S.** Truncated aspartase enzyme derivatives and uses thereof. // US Patent 5,993,807, 30.11.1999.
- 88. Viola R.E.,** L-aspartase: new tricks from an old enzyme. // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 2000, 74, Pp. 295-341.
- 89. Virtanen A.I., Tarnanen J.** Die enzymatische spaltung und synthese der asparaginsäure. // *Biochem. Z.* 1932, 250, Pp. 193-211.
- 90. Virtanen A.I., Ellfolk N.** Aspartase. // *Methods Enzymol.* 1955, 2, Pp. 386-390.
- 91. Wang L.J., Kong X.D., Zhang H.Y., Wang X.P., Zhang J.** Enhancement of the activity of l-aspartase from *Escherichia coli* W by directed evolution. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 276, Pp. 346-349.
- 92. Weaver T.,** Structure of free fumarase C from *Escherichia coli*. // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2005, 61(Pt 10), Pp. 1395-1401.
- 93. Weaver T.M., Levitt D.G., Banaszak L.J.** Purification and crystallization of fumarase C from *Escherichia coli*. // *J Mol Biol.* 1993, 231(1), Pp. 141-144.
- 94. Weiner B., Poelarends G.J., Janssen D.B., Feringa B.L.** Biocatalytic enantioselective synthesis of N-substituted aspartic acids by aspartate ammonia lyase. // *Chemistry* 2008, 14(32), 10094-100.

95. **Wilkinson J.S., Williams V.R.** Partial purification of bacterial aspartases by starch electrophoresis. // Arch Biochem Biophys. 1961, 93, Pp. 80-84.
96. **Woolf B.** Some enzymes in *B. coli communis* which act on fumaric acid. // Biochem J. 1929, 23, Pp. 472-482.
97. **Yoon M.Y., Park J.H., Choi K.J., Kim J.M., Kim Y.O., Park J.B., Kyong J.B.** Purification and characterization of aspartase from *Hafnia alvei*. // J Biochem and Molecular Biology 1998, 31(4), Pp. 345-349.
98. **Yoon. M.Y.** Kinetic studies of aspartase from *Hafnia alvei* by temperature dependence activity changes. // Bull. Korean Chem. Soc. 2000, 21, Pp. 379-382.
99. **Yumoto N., Murase S., Imaishi H., Tokushige M.** Determination of the subunit contact region of aspartase. // Biochem. Int. 1992, 28, Pp. 413-422.
100. **Yumoto N., Tokushige M., Hayashi R.** Studies on aspartase. VI. Trypsin-mediated activation releasing carboxy-terminal peptides. // Biochim Biophys Acta. 1980, 616, Pp. 319-328.
101. **Zhang X., Wang X., Shanmugam K.T., Ingram L.O.** L-Malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. // Applied and Environmental Microbiology 2011, Pp. 427-434.
102. **Берегатнова Е.В.** Рынок продукции глубокой переработки зерна в РФ: состояние, перспективы. // Центр развития 2017, 17, стр. 1-32.
103. **Воронин С.П., Иёжица И.П., Петров В.И., Спасов А.А., Синолицкий М.К., Синолицкая С.В.** Пероральное лекарственное средство для восполнения дефицита магния в организме. // Патент RU 2229879 С1, 10.06.2004.
104. **Дербиков Д.Д., Новиков А.Д. Губанова Т.А. Тарутина М.Г. Гвилава И.Т. Бубнов Д.М. Яненко А.С.** Синтез аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализаторов штаммов *Escherichia coli* с удаленными генами фумараз. // Биотехнология 2016, 32(5), стр. 38-48
105. **Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года.** // Москва, 24.04.2012, утв. Правительством РФ 24.04.2012 N 1853п-П8
106. **Куваева Т.М., Смирнов С.В., Иванова О.Н., Киверо А.Д., Каташкина Ж.И.** Бактерия семейства *Enterobacteriaceae* - продуцент L-аспарагиновой кислоты или метаболитов, производных L-аспарагиновой кислоты, и способ получения L-аспарагиновой кислоты или метаболитов, производных L-аспарагиновой кислоты. // Патент : RU 2 472 853 С2, 14.01.2011.

- 107. Мохова О.Н., Куваева Т.М., Голубева Л.И., Колоколова А.В., Каташкина Ж.И.** Бактерия, принадлежащая к роду *Pantoea*, - продуцент L-аспартата или метаболита, являющегося производным L-аспартата, и способ получения L-аспартата или метаболита, являющегося производным L-аспартата. // Патент RU 2 411 289 С2, 10.02.2011.
- 108. Овчинников В.А., Москвина Л.М.** Способ получения D,L-аспарагиновой кислоты. // Патент RU 2176637 С2, 10.12.2001.
- 109. Синолицкий М.К., Атрахимович Н.И., Воронин С.П., Клыгина О.Ю., Козулин С.В., Ларикова Г.А., Леонова Т.Е., Полунина Е.Е., Петров П.Т., Синтин А.А., Синолицкая С.В., Трухачева Т.В., Царенков В.М., Яненко А.С.** Способ получения L-аспарагиновой кислоты. // Патент RU 2 174 558 С1, 10.10.2001.
- 110. Синолицкий М.К., Воронин С.П., Дебабов В.Г., Довгалецкий П.Я, Петров В.И., Спасов А.А., Яненко А.С.** Лекарственно средство "Аспаркам-L" для регуляции метаболических процессов и способ его получения. // Патент RU 2 229 879 С1, 28.02.2003.
- 111. Тарутина М.Г., Раевская Н.М., Шустикова Т.Е., Рябченко Л.Е., Яненко А.С.** Оценка эффективности промоторов *Corynebacterium glutamicum* и их использование для усиления активности генов у лизин-продуцирующих бактерий. // Биотехнология, 2015, стр. 16-24.
- 112. Шейко И., Радчиков В., Саханчук А., Линкевич С., Кот Е., Фесина В., Воронин С., Воронин Д.** Премиксы. Баланс экономии и продуктивности. // Белорусское сельское хозяйство 2014, 3(143), стр. 40-43.
- 113. Кондратьева Е.Н., Егоров Н.С., Березин И.В., Красильникова Е.Н., Яковлева В.И., Малофеева И.В.** Штамм *Escherichia coli* 85 – продуцент L-аспарагиновой кислоты. //Авторское свидетельство №644833, 30.01.79

Приложение А

Таблица 3.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Праймеры для проведения секвенирования ВКПМ В-7188			
Номер	Название	5'-3' последовательность	Примечание
1	F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Анализ 16S рРНК
2	R1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Анализ 16S рРНК
2	D1-R	CGGCTGGAAAAGTCTCTATGC	Секвенирование гена <i>aspA</i>
3	D2-R	CTCCTGTAATAGCAGCCGGT	Секвенирование гена <i>aspA</i>
4	D3-R	CAGGTA CTCCG TAAACATGAAC	Секвенирование гена <i>aspA</i>
5	D4-R	AGTGGTTAACCAGGTATGCT	Секвенирование гена <i>aspA</i>
6	D5-R	CGATGTCATCTCCATTATCATGG	Секвенирование гена <i>aspA</i>
7	D6-R	CATGGGTCTGGTTGAAAAACC	Секвенирование гена <i>aspA</i>
8	D1-F	GATGTTAGTCGGCGGGAA	Секвенирование гена <i>aspA</i>
9	D2-F	GTGAAACGTT CAGTGCCAGA	Секвенирование гена <i>aspA</i>
10	D3-F	GCAGATGGAGGTAGCTGATG	Секвенирование гена <i>aspA</i>
11	D4-F	ATTCTGTACGGAGAAAATATCGT	Секвенирование гена <i>aspA</i>
12	D5-F	ACTTCCAGCAGCAGTTCAGC	Секвенирование гена <i>aspA</i>
13	D6-F	AATGTTGTTTGACATGTGAACC	Секвенирование гена <i>aspA</i>
14	D7-F	GGTTTGCTGCTTTTATTACCG	Секвенирование гена

			<i>aspA</i>
Праймеры для клонирования аспартаз в pLATE31			
1	D.EC478-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCTGTTCGCTTTCATCAGTATAGC	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)
2	D.EC478-F	AGAAGGAGATATAACTATGTCAAACAACATTCGTATCGAAGAAGATCTGTTGG	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)
3	D.BS55-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTTTTCTTCCAGCAATTCCCG	Клонирование гена <i>aspB</i> (<i>Bacillus sp</i> YM55-1)
4	D.BS55-F	AGAAGGAGATATAACTATGAATACCGATGTTCGTATTGAG	Клонирование гена <i>aspB</i> (<i>Bacillus sp</i> YM55-1)
5	D.CG-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTCTCCAAGTAGAGCCTTC	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>Corunebacterium g.</i>)
6	D.CG-F	AGAAGGAGATATAACTATGTCTAAGACGAGCAACAAGTC	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>Corunebacterium g.</i>)
7	D.EC472-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCATAGCGTTTTGCTTTGTAAGCC	Клонирование укороченного гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)
8	D.EC471-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGCGTTTTGCTTTGTAAGCCGG	Клонирование укороченного гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)
9	D.EC469-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTGCTTTGTAAGCCGGGTGCAT	Клонирование укороченного гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)
10	D.EC467-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTAAGCCGGGTGCATCAGATTC	Клонирование укороченного гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)

11	D.EC466-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCAGCCGGGTGCATCAGATTCTGT	Клонирование укороченного гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188)
Праймеры для клонирования аспартаз			
1	D.lac.asp A-F	AAAGGATCCTGTACGATTACTGTTTCGCTTTCATCAGTATAGC	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188) в pTZ57R под промотором lacUV5
2	D.lac.asp A-R	TTTGTATAAGAAAATGAGAGGG	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188) в pTZ57R под промотором lacUV5
3	F40	GTTTTCCCAGTCACGAC	Проверочный праймер
4	R46	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Проверочный праймер
5	D.asp-F	TTTCCATGGCAAACAACATTCGTATCGAAGAAGATCTGTTGG	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188) в pTZ19R под промотором P Eftu
6	D.asp-R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTGCTTTGTAAGCCGGGTGCATC	Клонирование гена <i>aspA</i> (<i>E.coli</i> ВКПМ В-7188) в pTZ19R под промотором P Eftu
7	D.eftu-F	GGGTGACGATATCTGGCCGTTACCCTGCGAATG	Клонирование промотора P Eftu в pTZ19R
8	D.eftu-R	CTTCGATACGAATGTTGTTTGTGTATGTCTCCTGGACTTC	Клонирование промотора P Eftu в pTZ19R
9	D.eftu2-F	ATACGAATGTTGTTTGACATGGTATGTCCTCCTGGACTTC	Клонирование промотора P Eftu в pNS2-cat72
10	D.eftu2-R	TGCAGTCGACTTTGTCGACGATATCTGGCCG	Клонирование промотора P Eftu в pNS2-cat72

11	D.aspA2-F	GAAGTCCAGGAGGACATACCATGTCAAACAACATTCGTAT	Клонирование гена <i>aspA</i> в pNS2-cat72
12	D.aspA2-R	TTTCTCGGATCCACCGGTCATGGCCTACCTCCTTTCATCGGAGCTTACTGTTTCGCTTTCATCAGT	Клонирование гена <i>aspA</i> в pNS2-cat72
Праймеры для замены промотора аспартазы			
1	D.pr.asp(CS)-F	CGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAGCAAAAATTTCAAGATGTTTGCGCCAGGGTTTTCCCAGT CACGA	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> перед геном <i>aspA</i>
2	D.pr.asp(CS)-R	ATTAATTTGTGAAATAGATCACCGCTTTGGGATTACTACCAAAAATAGTTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGC	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> перед геном <i>aspA</i>
3	D.pr1	AGTAGGCATCAGCTGGAACCTCCC	Проверочный праймер
4	D.pr2	CTGTTGCATGGGCATAAAGTTGCC	Проверочный праймер
5	D.pr3	CAGCACGAGGGTCAGCAATAC	Проверочный праймер
6	D.pr4	AAACGCCTGGTGCTACGCC	Проверочный праймер
7	D.pr.aspA1	CGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAGCAAAAATTTCAAGATGTTTGCGCAAGCTTCAGAGATTT TGCATCG	Замена промотора перед геном <i>aspA</i>
8	D.pr.aspA2	ACTTCCCTGGTACCCAACAGATCTTCTTCGATACGAATGTTGTTTGACATGGTTGTTACCTCGTT ACCTT	Замена промотора перед геном <i>aspA</i>
9	D.pr.aspA3	CGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAGCAAAAATTTCAAGATGTTTGCGCCAAGTCAACGCCTAT CTTAAAG	Замена промотора перед геном <i>aspA</i>
10	D.pr.aspA4	ACTTCCCTGGTACCCAACAGATCTTCTTCGATACGAATGTTGTTTGACATGGTTGTTACCTCGTT ACCTTTGGTCGGACCCCGGTGTCGATTGGGA	Замена промотора перед геном <i>aspA</i>
Праймеры для удаления гена <i>iclR</i>			
1	D.iclR(CS)-F	CAATAAAAATGAAAATGATTTCCACGATACAGAAAAAAGAGACTGTCATGCAGGGTTTTCCCA GTCACGA	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>iclR</i>
2	D.iclR(CS)-R	AGAATATTGCCTCTGCCCGCCAGAAAAAGTCAGCGCATTCCACCGTACGATGTTGTGTGGAATT GTGAGC	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>iclR</i>
3	D.pr5	CGATAACTCTGGATCATGGTG	Проверочный праймер
4	D.pr6	AAAGAACTACGAGGAATACGAG	Проверочный праймер
5	D.iclR-R	AAAAGAGACTGTCATGGTCGCACCCATTCCC GCGAAACGC	Удаление конструкции <i>cat-sacB</i> из локуса гена

			<i>iclR</i>
6	D. <i>iclR</i> -F	CCTCTGCCCGCCAGAAAAAGTCAGCGCATTCCACCGTACGGCGTTTCGCGGGAATG	Удаление конструкции <i>cat-sacB</i> из локуса гена <i>iclR</i>
Праймеры для удаления фумараз			
1	D. <i>fumB</i> (CS)-F	GGCACGCCATTTTCGAATAACAAATACAGAGTTACAGGCTGGAAGCTATGCAGGGTTTTCCCAGTCACGA	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>fumB</i>
2	D. <i>fumB</i> (CS)-R	GCATGCTGCCAGGCGCTGGGCCGAAGAGGTTACTTAGTGCAGTTCGCGCAATGTTGTGTGGAAT	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>fumB</i>
3	D. <i>pr7</i>	CTACGGTTATTACATCCTGC	Проверочный праймер
4	D. <i>pr8</i>	TGGTGAGTTCGCAAATCAGGG	Проверочный праймер
5	D. <i>fumA</i> (CS)-F	TTGTATCTGCTGGAAGAAGTCATTTCTTTATCATCCACAAGGATAAACGATGTTGTGTGGAAT	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>fumA</i>
6	D. <i>fumA</i> (CS)-R	AACACCCGCCAGAGCATAACCAAACCAGGCAGTAAGTGAGAGAACAATGCAGGGTTTTCCCA	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>fumA</i>
7	D. <i>pr9</i>	CAACGTGCATCGCCGTCGG	Проверочный праймер
8	D. <i>pr10</i>	CTGGACGGATTTCCATACC	Проверочный праймер
9	D. <i>fumC</i> (CS)-F	ATTCCACGGCTGCACCTGTATGTTGCAGATTAACGCCCGCTTTCATACTATGTTGTGTGGAATT	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>fumC</i>
10	D. <i>fumC</i> (CS)-R	GAAAAAATTAATCAGGTGAGGAGCAGGTCATGAATACAGTACGCAGCGAACAGGGTTTTCCCA	Вставка конструкции <i>cat-sacB</i> вместо гена <i>fumC</i>
11	D. <i>pr11</i>	GACAATGTGCAGCACCG	Проверочный праймер
12	D. <i>pr12</i>	CACGCTTATCGCTTAACGGCACG	Проверочный праймер
13	D. <i>fumB</i> -F	CGCGGCACGCCATTTTCGAATAACAAATACAGAGTTACAGGCTGGAAGCTCCTCTTCG	Удаление конструкции <i>cat-sacB</i> из локуса гена <i>fumB</i>
14	D. <i>fumB</i> -R	GGCCAGGGGGATCACCTGGCAGCATGCTGCCAGGCGCTGGGCCGAAGAGGAGCTTCCAGC	Удаление конструкции <i>cat-sacB</i> из локуса гена

			<i>fumB</i>
Примеры для ПЦР в реальном времени			
1	D.RT.fum A-F	GGATGTAGTGAGCGAAGTAT	ПЦР гена <i>fumA</i>
2	D.RT.fum A-R	GCGATGTGGAAGCTGGAAAA	ПЦР гена <i>fumA</i>
3	D.RT.fum B-F	GGTGAGCGACAAACGAGTGGA	ПЦР гена <i>fumB</i>
4	D.RT.fum B-R	AGGCGAAGCGGTGAAAGTTGA	ПЦР гена <i>fumB</i>
5	D.RT.fum C-F	CGTGAGGCAGGCTGTATTCG	ПЦР гена <i>fumC</i>
6	D.RT.fum C-R	TAACGCTGGGGCAGGAGATT	ПЦР гена <i>fumC</i>
7	D.RT.asp A-F	AGTCCACTAACGACGCCTAC	ПЦР гена <i>aspA</i>
8	D.RT.asp A-R	CGCAGTTGGTTAATCGCATCTA	ПЦР гена <i>aspA</i>
9	D.RT.RN Apol-F	TCCGCTCTGCTAACTGCCTTA	ПЦР housekeeping - гена
10	D.RT.RN Apol-R	GCTCAACCTCGGTACGCTGTA	ПЦР housekeeping - гена

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность заведующему Лаборатории молекулярной биотехнологии №22 НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика, д.б.н., проф. **Яненко Александру Степановичу**, н.с. лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «ГосНИИГенетика» **Новикову Андрею Дмитриевичу** за наставничество и вдумчивое руководство работой.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «ГосНИИГенетики» за постоянную поддержку, а в частности:

Калининой Татьяне Игоревне, Леоновой Татьяне Евгеньевне и Токмаковой Ирине Петровне за ценные замечания в процессе работы;

Губановой Татьяне Александровне за помощь на разных стадиях выполнения работы.

Автор благодарит научного сотрудника ЗАО «Биоамид» **Синолицкого Максима Константиновича**, научного сотрудника отдела медицинских нанобиотехнологий РНИМУ им. Н.И. Пирогова **Кошкина Филиппа Александровича**, ведущего научного сотрудника БРЦ ВКПМ **Юзбашева Тиграна Владимировича** и инженера БРЦ ВКПМ **Гвилаву Илия Теймуразовича**.