

**Гусятинер Михаил Маркович**

**Создание продуцентов аминокислот на основе бактерий  
*Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*;  
исследование механизмов продукции**

Специальность 03.02.07 – "Генетика"

Автореферат на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва - 2017



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Аминокислоты, строительные блоки белков, являются важнейшими компонентами питания животных и человека. Обладая широким разнообразием в питательной ценности, вкусе, воздействии на организмы, в химических свойствах, они находят применение в качестве добавок в корм сельскохозяйственных животных, добавок в пищу человека, при создании лекарственных препаратов и косметики, а также полимерных материалов. По мере появления новых сфер применения аминокислот потребность в них быстро нарастает, стимулируя развитие технологий их производства. Мировое производство аминокислот превышает 6 млн тонн в год, а глобальный рынок – 12 миллиардов долларов. Эксперты оценивают ежегодный прирост производства в 5-10% и ожидают, что к 2020 году объем рынка аминокислот превысит 20 млрд долларов США. Наибольшую долю (более половины) в производстве занимают так называемые кормовые аминокислоты (лизин, метионин, треонин, триптофан). Второй по объему сегмент рынка аминокислот – это рынок усилителей вкуса (глутамат) и аминокислоты, используемые для синтеза заменителя сахара – аспартама (аспарат и фенилаланин).

В промышленных масштабах почти все аминокислоты (за исключением метионина) получают с помощью микробиологических процессов методом ферментации, с использованием относительно дешевого углеводного сырья. Первый промышленный процесс получения аминокислоты (60-е годы) был основан на способности найденного в природе микроорганизма (*Corynebacterium glutamicum*) продуцировать глутаминовую кислоту при использовании определенных сред. Для производства всех остальных аминокислот потребовалось получать всевозможные мутации, чтобы вызвать сверхпродукцию желаемой аминокислоты.

Новым этапом развития микробных продуцентов аминокислот явилось внедрение методов генной инженерии в конструирование продуцентов. Уже в 1978 году с участием автора данной работы был получен продуцент треонина на основе кишечной палочки *Escherichia coli*. Гены треонинового оперона, кодирующие мутантные ферменты, десенсибилизированные к ингибированию треонином, были амплифицированы путем их клонирования на мультикопийной плазмиде. Успех данной работы предопределил использование кишечной палочки *Escherichia coli* в качестве продуцента аминокислот, а не только *C. glutamicum*, как это было ранее.

Конструирование современных продуцентов – это генетическая перестройка метаболизма, которая приводит к превращению бактерий в биохимическую машину, метаболизм которой подчинен цели – продукции желаемой аминокислоты с минимальными затратами на все остальные жизненно важные процессы в клетке. Оптимизируются следующие

процессы: потребление из среды источников углерода и азота, центральный метаболизм (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса), собственно путь биосинтеза целевого продукта, экспорт целевой аминокислоты в культуральную жидкость. Кроме того, блокируются пути возможной деградации целевой аминокислоты, а также ее предшественников, устраняются транспортные белки, способные выделять в среду предшественники целевого продукта, и, наоборот, усиливается продукция белков, импортирующих из среды выделившиеся в нее молекулы предшественников. Для решения этих задач меняется экспрессия соответствующих генов от полной блокировки их активности до сверх-экспрессии, включая поиск промежуточного оптимального уровня экспрессии. Десенсибилизация ферментов пути биосинтеза желаемой аминокислоты к ингибированию конечным продуктом достигается как отбором мутантов, устойчивых к аналогам этой аминокислоты, так и методами белковой инженерии, основанными на сайт-специфическом мутагенезе. В настоящей работе продемонстрировано использование современных методов конструирования продуцентов аминокислот на ряде примеров получения актуальных в настоящее время штаммов-продуцентов, предназначенных для промышленного применения.

**Цель исследования.** Разработка и использование методов получения и усовершенствования продуцентов аминокислот на основе *S. glutamicum* (фенилаланин, гамма-аминомасляная кислота) и *E.coli* (треонин, цистеин). Минимализация побочной продукции и биохимической деградации целевых аминокислот.

**Задачи исследования:**

- Разработать и применить методы пермеабиллизации клеток *S.glutamicum* и *E.coli* для их использования при изучении свойств аллостерических ферментов и в целях биоконверсии.
- Разработать и применить метод пенициллинового обогащения применительно к *S.glutamicum* для селекции негативных мутаций.
- Учитывая арогенатный путь биосинтеза тирозина у *S.glutamicum*, объяснить механизм продукции фенилаланина мутантами по гену *tyrA* и предложить пути усиления продукции фенилаланина.
- Исследовать деградацию фенилаланина *S.glutamicum* и генетический контроль этого процесса, найти подходы к ее устранению.
- Изучить генетический контроль деградации треонина клетками *E.coli* с целью её предотвращения. Сконструировать продуценты треонина, не деградирующие треонин с участием треониндегидрогеназы. Оценить вклад 3-х путей метаболизации треонина.
- Основываясь на структуре активного центра ключевого фермента биосинтеза цистеина, O-серинацетилтрансферазы, чувствительного к конкурентному ингибированию цистеином, методом сайт-специфического мутагенеза получить мутанты, утратившие чувствительность к ретроингибированию, но полностью сохранившие каталитическую

активность. Использовать полученные мутации при создании продуцентов цистеина.

- Исследовать природу накопления 2-гидроксиглутаровой кислоты, O-ацетилсерина, S-сульфоцистеина при продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты, полученными на основе *E.coli*, и найти способы минимализации накопления указанных веществ.

#### **Научная новизна**

- Разработан и использован новый метод пенициллинового обогащения (комбинирование действия пенициллина и лизоцима) мутантами культуры *S. glutamicum*.

- Разработан и использован новый метод пермеабиллизации клеток *S. glutamicum* с помощью грамицидина С, позволяющий проводить измерения ферментативной активности ферментов, свойства которых нарушаются при применении обычных способах разрушения клеток

- Разработан и использован термический метод пермеабиллизации клеток *E.coli* для биоконверсии глутаминовой кислоты в гамма-аминомасляную кислоту при высокой активности глутаматдекарбоксилазы. На данный метод получен патент РФ, научная статья с описанием метода имеет более 70 цитирований.

- Показано, что тирозиновые ауксотрофы *S. glutamicum* продуцируют не фенилаланин, как предполагалось ранее, а арогенат, который при подкислении среды неферментативно превращается в фенилаланин.

- Обнаружена деградация фенилаланина клетками *S. glutamicum*. Ауксотрофность по тирозину в результате блокирования гена *tyrA* предотвращает деградацию фенилаланина клетками *S. glutamicum*.

- Впервые блокирован ген, кодирующий треонидегидрогеназу *E.coli*, и определено его местоположение на генетической карте.

- Впервые сконструирован продуцент треонина на основе *E.coli*, у которого блокирована деградация треонина, инициируемая треонидегидрогеназой.

- Впервые показано, что серинтрансгидроксиметилаза (ген *glyA*) *E.coli*, участвует в деградации треонина.

- Предложен новый механизм продукции 2-гидроксиглутаровой кислоты клетками *E.coli* с участием 3-фосфоглицератдегидрогеназы, объясняющий накопление этого вещества продуцентами цистеина.

- Показано, что восстановление S-сульфоцистеина до цистеин клетками *E.coli* катализирует глутаредоксин С (ген *grxC*). Повышенная экспрессия гена *grxC* увеличивает продукцию цистеина продуцентами цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы.

- Показано, что S-сульфоцистеин поглощается клетками *E.coli* с помощью трансмембранного белка *UdjN*.

- Показано, что известный экспортер дипептидов *YdgR* участвует импорте предшественника цистеина O-ацетилсерина.

**Теоретическая значимость работы.** Представляются теоретически значимыми следующие результаты работы:

- Продукция фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *S. glutamicum* происходит арогенатным путем: накапливается арогенат, а не фенилаланин.
- Установлено положение на генетической карте *E.coli* гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу
- Треонинальдолазная активность в *E.coli* обусловлена вторичной активностью серинтрансгидроксиметилазы (ген *glyA*) и участвует в деградации треонина.
- Предложен механизм первой реакции в пути биосинтеза серина в *E.coli*, катализируемой 3-фосфоглицератдегидрогеназой (ген *serA*), объясняющий неизбежность продукции этим ферментом 2-гидроксиглутарата. 3-фосфоглицерат окисляется за счет восстановления 2-кетоглутарата до 2-гидроксиглутарата.
- ген *udjN* кодирует трансмембранный белок-транспортер, импортирующий S-сульфоцистеин из среды.
- Фермент глутаредоксин С участвует в превращении предшественника цистеина, S-сульфоцистеина, в цистеин в клетках *E.coli*.

**Практическая значимость работы.**

- Предложены генетические и биохимические методы исследования глутаматпродуцирующих бактерий (*S. glutamicum*) для селекции негативных мутантов (метод обогащения), а также для определения чувствительности аллостерических ферментов к ингибированию конечными продуктами (пермеабилзация клеток с помощью антибиотика грамицидина С).
- Разработан метод промышленного получения лекарственного препарата (гамма-аминомасляная кислота), основанный на рекомбинатном продуценте фермента, катализирующего декарбоксилирование глутамата с образованием гамма-аминомасляной кислот, предусматривающий получение биомассы продуцента с последующей технологичным методом активации клеток термической обработкой.
- Блокирование наиболее важного пути деградации треонина с участием треониндегидрогеназы привело к созданию эффективных продуцентов треонина, которые нашли применение в производстве треонина на всех предприятиях, производящих эту аминокислоту.
- Десенсбилизация серинацетилтрансферазы, ключевого фермента биосинтеза цистеина, привело к созданию продуцентов этой аминокислоты, которые используются для получения цистеина в производстве (Япония).
- Обнаружение участия глутаредоксина С в процессе превращения S-сульфоцистеин в цистеин и сверх-экспрессия этого белка позволило существенно улучшить промышленную продукцию цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы.
- Практическая значимость исследований Гусятинера М.М. подтверждается российскими и международными патентами на

изобретения методов получения аминокислот, а также присуждением ему в числе соавторов премии Правительства Российской Федерации за 2011 год «за разработку и внедрение инновационных биотехнологических процессов производства природных аминокислот для агропромышленного комплекса» (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 6 февраля 2012 г. N 146-р г.).

### **Методология и методы исследования**

Достоверность научных положений и выводов, сформулированных в работе, обеспечивается использованием комплекса современных методов генетики и селекции микроорганизмов, включающих методы генной инженерии и биоинформатики. Используются также современные методы физико-химического анализа продуктов метаболизма: тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC), автоматические хроматографы, методы радиоавтографии. Применялись современные методы ферментации в лабораторных ферментерах, оборудованные автоматической системой поддержания заданных параметров. Достоверность результатов подтверждается также получением российских и зарубежных патентов на изобретения, которые переданы по лицензионным соглашениям ряду зарубежных биотехнологических компаний и используются ими в промышленности получения аминокислот.

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

- Метод обогащения негативными мутантами культуры *S. glutamicum*, предназначенный для научных исследований данного микроорганизма.
- Методы пермеабилзации клеток *S. glutamicum* и *E. coli*, предназначенные для научных исследований и использования в биотехнологической промышленности.
- Механизм продукции фенилаланина у ауксотрофных по тирозину и аналогорезистентных мутантов *S. glutamicum*, учитывающий арогенатный путь биосинтеза. Феномен деградации фенилаланина клетками *S. glutamicum*.
- Обнаружение гена, кодирующего треониндегидрогеназу в *E. coli* (ген *tdh*), определение положения гена *tdh* на генетической карте, инаktivация гена *tdh* инсерцией транспозона Tn5, использование данной инаktivации для улучшения продукции треонина плазмидными продуцентами треонина и для снижения накопления продуктов деградации треонина.
- Обнаружение пути деградации треонина с участием сернитрансгидроксиметилазы (ген *glyA*) и оценка роли этого пути в деградации треонина.
- Гипотеза о механизме реакции ключевого фермента пути биосинтеза серина и цистеина, 3-фосфоглицератдегидрогеназы, *E. coli* (ген *serA*), предусматривающего обязательное образование 2-гидроксиглутаровой кислоты из 2-кетоглутаровой кислоты в ходе этой реакции.
- Получение мутантов в гене *cysE* кишечной палочки, кодирующем серин-О-ацетилтрансферазу, путем сайт-специфического мутагенеза в

каталитическом центре с целью устранения ретроингибирования цистеином и создания продуцентов цистеина.

- Ферментативная природа восстановления S-сульфоцистеина до цистеина с участием ряда белков-глутаредоксинов и использование сверх-экспрессии генов, их кодирующих, для улучшения продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты.

- Участие трансмембранных белков YdjN и YdgR в поглощении клетками E.coli, соответственно, S-сульфоцистеина и O-ацетилсерина, предшественников цистеина, и их использование для улучшения продукции цистеина.

**Апробация диссертации** состоялась 7 апреля 2017 на совместном заседании заседании секции «Генетика микроорганизмов» Ученого Совета ФГБУ «ГосНИИгенетика» и Научно-технического совета НИИ «Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», и «Список литературы» (последний раздел состоит из 332 ссылок). Работу иллюстрируют 60 рисунков и 26 таблиц. Общий объем диссертации 236 страниц.

### **Основное содержание**

#### **Пермеабиллизация клеток *S. glutamicum* с помощью антибиотика грамицидин С**

Клеточная стенка *S. glutamicum* отличается необычной структурой: слой ее каркаса, пептидогликана, усилен слоем полисахарида арабиногалактана, к которому ковалентно присоединен слой миколовых кислот, представляющих собой внутренний слой миколатной мембраны. Эта структура клеточной стенки является препятствием для создания продуцентов белков и других продуктов, которые не могут выйти в культуральную жидкость. Кроме того, такая клеточная стенка с трудом поддается механическим способам разрушения для определения уровня клеточных ферментов и их свойств. Для разрушения ультразвуком клеток большинства бактерий достаточно 30 – 90 секунд, тогда как для клеток *S. glutamicum* обычно требуется 15 – 30 мин циклами большей мощности.

Мы испытывали сложности при определении активности и аллостерических свойств ферментов в бесклеточных экстрактах, полученных с помощью ультразвука. Для преодоления этой проблемы был испытан целый ряд известных мембранотропных агентов, способных нарушить барьер проницаемости клеточной стенки. Наиболее эффективным оказался отечественный антибиотик грамицидин С. Использовали спиртовой раствор грамицидина С, который добавляли к суспензии клеток *S. glutamicum* (конечная конц. 0,05%). Ферментативная активность



обнаруживалась практически мгновенно, то есть грамицидин С быстро обеспечивал проницаемость клеток для субстратов и продуктов реакций. Так как обработка грамицидином С позволяет измерять активность в условиях, приближенных к условиям *in vivo*, то чувствительность ферментов к аллостерическому ингибированию в бесклеточном экстракте, полученном обработкой ультразвуком, и в пермеабилizированных грамицидином С клетках отличается. Так, активность префенатдегидратазы *S. glutamicum* в бесклеточном экстракте, полученном УЗ-обработкой, ингибировалась на 50% при концентрации фенилаланина (аллостерический ингибитор) около 0,1 мМ, тогда как при обработке грамицидином фермент оказался на порядок более чувствительным к ингибированию ( $I_{50}=0,01$  мМ).

Данная методика пермеабилizации использована при изучении ферментативной активности мутантов *S. glutamicum* в данной работе.

### **Пермеабилizация клеток кишечной палочки на примере метода получения гамма-аминомасляной кислоты**

В процессах биотрансформации система целых клеток предпочтительна, поскольку исключаются этапы изоляции и очистки ферментов. Для использования целых клеток необходимо устранить барьер проницаемости, чтобы обеспечить диффузию субстратов внутрь клетки и выход в среду продуктов реакции. Пермеабилizацию клеток проводят с помощью мембранотропных химических агентов (ацетон, толуол, цетилтриметил бромид аммония (СТАВ), ЭДТА и др.). Во всех случаях химического воздействия возникает необходимость в дополнительных этапах очистки конечного продукта, что нежелательно при промышленных масштабах.

Нами разработан метод термической пермеабилizации клеток *E. coli* для промышленного получения гамма-аминомасляной кислоты (далее ГАМК), получаемой биотрансформацией глутаминовой кислоты под действием глутаматдекарбоксилазы по уравнению (глутаминовая кислота = ГАМК + CO<sub>2</sub>). ГАМК является нейромедиатором в ЦНС человека и животных и используется как пищевая добавка в европейских странах и в США, а также в качестве лекарственного препарата и в виде соединений со вспомогательными молекулами с целью преодоления гематоэнцефалического барьера. ГАМК применяется также для синтеза биоразлагаемого полимера «нейлон 4», производство которого ограничивается его высокой себестоимостью.

*E. coli* способна синтезировать ГАМК из глутамата, обладая двумя изомерными глутаматдекарбоксилазами (далее ГДК) *GadA* (ген *gadA*) и *GadB* (*gadB*). Есть также антипортер глутамат/ГАМК (ген *gadC*), и в принципе кишечная палочка способна превращать глутамат в ГАМК, поглощая глутаминовую кислоту из среды и экскретируя ГАМК. Оказалось, что при сверх-экспрессии генов, кодирующих глутаматдекарбоксилазы,

потенции GadC как для эффективного поглощения глутамата из среды, так и для выхода в среду ГАМК недостаточно.

Для разработки эффективного метода получения в ГАМК ген *gadA* из *E.coli* K12 был амплифицирован в составе экспрессионной плазмиды pGEMEX («Promega») и помещен в хвостовую часть гена 10 бактериофага T7 в составе этого вектора, что позволяет использовать для его экспрессии регуляторные элементы гена 10. Полученная плазида (pGAD1), была перенесена в штамм *E.coli* B BL21(DE3) фирмы «Novagen», в хромосоме которого содержится ген РНК-полимеразы фага T7 для экспрессии гена 10 и, соответственно, вшитого в него гена *gadA*. Полученный плазмидный устойчивый к ампициллину штамм назван *E.coli* GAD1. Дополнительно получен штамм *E.coli* GAD10, устойчивый одновременно к ампициллину и канамицину. Подробно получение обоих штаммов описано в патенте Российской Федерации №2143002 (Гусятинер М.М. и др. «Способ получения гамма-аминомасляной к-ты»). Штамм *E.coli* GAD10 обладал несколько большей активностью ГДК и использовался в дальнейших экспериментах. Данный штамм характеризуется многократным (10 – 40 раз) увеличением активности ГДК по сравнению со штаммом *E.coli* C600 дикого типа при приблизительно равном накоплении биомассы.

Для использования штамма в промышленных условиях необходимо было подобрать метод пермеабилзации клеток, из которых наиболее технологичным выглядел метод термического воздействия. Клетки выращивали в благоприятных для роста условиях, сепарированные клетки хранили в замороженном состоянии. Для каждой операции получения ГАМК клетки оттаивались и подвергались термической обработке для нарушения целостности мембран. В ряде проведенных экспериментов было показано, что наилучшую активность биомасса приобретала при выдерживании при 53°C в течение до 50 мин. При данной обработке происходило лишь незначительное (на 40%) снижение внутриклеточной активности ГДК, определяемое при разрушении клеток ультразвуковой обработкой (рис. 1).

При сравнении с химическими методами пермеабилзации и разрушением ультразвуком показано (рис. 2), что термический метод пермеабилзации превосходит по эффективности прочие методы. Ферментативная активность пермеабилзированной клеток снижается после 4-х часов процесса. В связи с этим предусматривается дробная или непрерывная подача свежих порций биомассы.

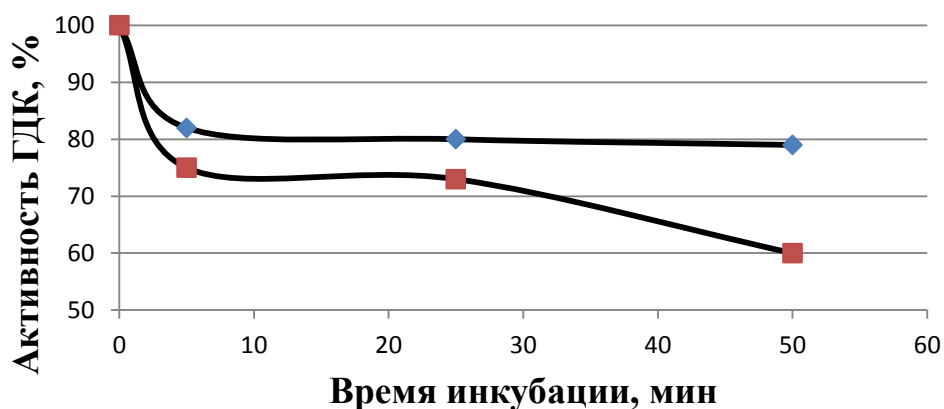


Рис. 1. Инактивация (53°C) ГДК штамма *E.coli* GAD10

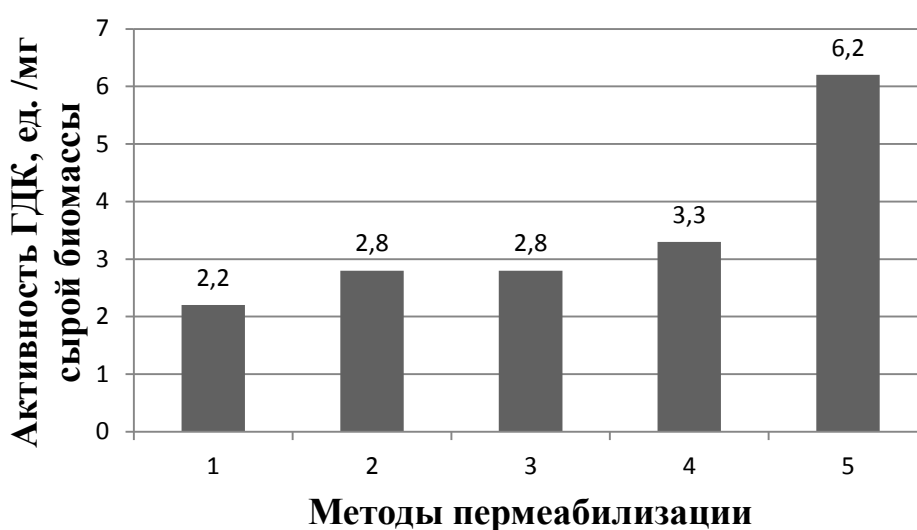


Рис. 2. Сравнение методов пермеабиллизации клеток

Без обработки (контроль); 2. ультразвук; 3. этилацетат; 4. толуол; 5. термическая активация

При использовании данного процесса было продемонстрировано, что штамм GAD10 способен в течение суток продуцирует ГАМК со скоростью 5 г/час в объеме 1 л. За 35 часов из 200 г глутаминовой кислоты образовывалось 138 г ГАМК (99% от теоретически возможного количества). При этом 1 г сырой биомассы пермеабиллизированных клеток продуцировал 23 г ГАМК.

### Разработка метода пенициллинового обогащения биохимическими мутантами *Corynebacterium glutamicum*

Для изучения биохимических и генетических механизмов биосинтеза аминокислот на основе *C. glutamicum*, а также для конструирования продуцентов аминокислот на его основе необходимо мутанты, неспособные к росту в отсутствие необходимого фактора роста или к усвоению источника углерода, азота, серы и т.п. Для отбора такого рода мутантов с утраченной

функцией используется метод пенициллинового обогащения, основанный на избирательной гибели растущих в данных условиях клеток. Применительно к *S. glutamicum* такого метода не существовало.

Известно, что клетки *S. glutamicum* высокочувствительны к действию пенициллина, однако не было ясно, приводит ли действие пенициллина, ингибирующего рост, к гибели растущих клеток. Пенициллин подавлял рост клеток, начиная от концентрации 1 ед./мл, однако титр живых клеток, способных образовывать колонии на полноценном агаре (L-агар), снижался незначительно ( в 5 – 7 раз) при концентрации пенициллина от 10 ед. и выше (табл. 1).

Таблица 1. Гибель клеток штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032 при действии пенициллина

Пенициллин, ед./мл	Оптическая плотность и титр			
	В момент внесения пенициллина		Через 3 часа	
	ОП <sub>540</sub>	Титр	ОП <sub>540</sub>	Титр
0,0	0,52	1,6x10 <sup>8</sup>	3,5	5,7x10 <sup>8</sup>
1,0			1,2	6,5x10 <sup>7</sup>
100,0			0,87	2,5x10 <sup>7</sup>

Существовали литературные данные о том, что обработка клеток *S. glutamicum*, подвергшихся действию пенициллина, позволяет получить протопласты, неспособные к росту на обычных средах в отсутствие осмопротекторов. Принимая это во внимание, оценивали действие лизоцима на обработанные и необработанные пенициллином (10 ед., 3 часа) клетки, которые инкубировали с лизоцимом в течение 16 часов при 37°C.

Таблица 2. Гибель клеток штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032, обработанных пенициллином, при последующем действии лизоцима

Концентрация		Оптическая плотность и титр					
		В момент добавления				Через 16 часов	
		пенициллина		лизоцима			
Пениц. ед. /мл	Лизоцим мкг/мл	ОП <sub>540</sub>	Титр	ОП <sub>540</sub>	Титр	ОП <sub>540</sub>	Титр
10	0	0,39	1,1x10 <sup>8</sup>	0,78	1,5x10 <sup>7</sup>	0,39	3x10 <sup>5</sup>
10	100			0,14	2x10 <sup>3</sup>		
0	100			2,2	6,1x10 <sup>8</sup>	51	6x10 <sup>12</sup>

Если обработка пенициллином снижала титр клеток менее, чем на порядок, то последующее инкубирование с лизоцимом приводило к

снижению титра на 4 порядка (табл. 2). Таким образом, действие пенициллина с последующей обработкой лизоцимом в 100 – 150 раз более эффективно, чем действие одного пенициллина. Действие же лизоцима на клетки, не имевшие контакта с пенициллином, как видно из табл. 2, неэффективно. Оценивали действие пенициллина и лизоцима на культуру метионинового ауксотрофа, полученного от штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032. В культуру после остановки роста на среде, лишенной метионина, вносили пенициллин 10 ед./мл (3 час, 30°C) и затем - лизоцим (0,1 мг/мл), инкубировали 12 час. В контрольную культуру вносили метионин (50 мкг/мл) одновременно с добавлением пенициллина. Титр голодающей культуру снижался незначительно, тогда как титр клеток растущих в присутствии метионина упал на 4 порядка. Если культура состояла из ауксотрофных по метионину и прототрофных клеток, смешанных в отношении 1:7, то после одного цикла обогащения по данному методу доля ауксотрофных клеток возрастала в 315 раз (табл. 3).

Таблица 3. Обогащение смешанной культуры ауксотрофных по метионину и прототрофных клеток *S. glutamicum* при последовательной обработке пенициллином и лизоцимом

Отношение числа ауксотрофных и прототрофных клеток до и после обогащения		
До обработки пенициллином	После инкубации с лизоцимом	
	Через 2 часа	Через 12 часов
1:7	29:1	45: 1

На основе разработанной методики обогащения были отобраны и использованы для исследований: мутанты по биосинтезу ароматических аминокислот; все известные классы мутантов, недостаточных по метионину (*metA*, *metB*, *metC*, *metE*) по трем заключительным стадии биосинтеза треонина (*thrA2*, *thrB*, *thrC*), неспособные усваивать серин в качестве единственного источника углерода (на основе промышленного продуцента серина); по гену *rusA* (пируваткиназа) центрального метаболизма.

### **Механизм продукции фенилаланина ауксотрофными по тирозину и аналогорезистентными мутантами *S. glutamicum***

Создание продуцентов ароматических аминокислот – важная задача биотехнологии. В частности, фенилаланин широко используется как основное сырье в производстве аспартама, безвредного подсластителя, применяемого вместо сахара в некоторых диетах. Ранее предполагалось, что завершающие стадии биосинтеза тирозина и фенилаланина из префената, общего их предшественника в *S. glutamicum*, такие же, как у *E. coli* и *Vac.*

*subtilis* (рис. 3). В 1980 г. было установлено, что у *S. glutamicum* действует иной путь биосинтеза тирозина, так называемый арогенатный путь (рис. 3). В связи с этим представляло интерес создать новые продуценты фенилаланина и дать более точное описание механизмов сверхпродукции тирозина и фенилаланина мутантами, продуцирующими эти аминокислоты, учитывая иной путь биосинтеза и химические свойства его интермедиатов.

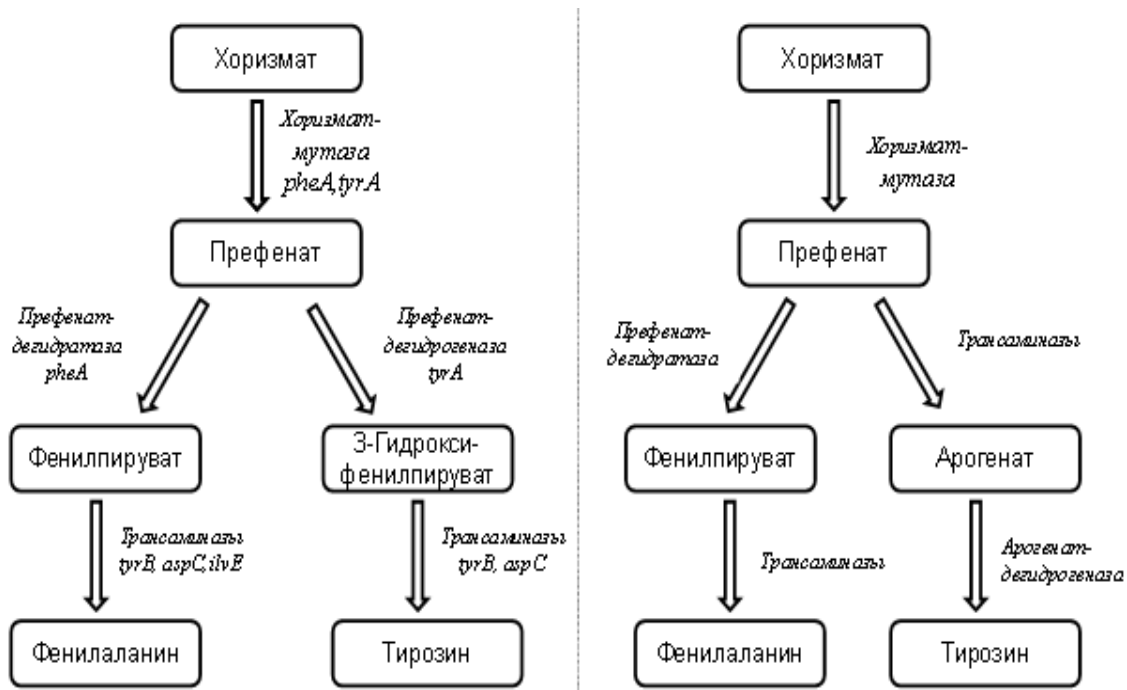


Рис.3. Обычный (гидроксифенилпироватный) путь биосинтеза тирозина (слева) и арогенатный путь, обнаруженный у *S. glutamicum* (справа).

**Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *S. glutamicum*.** Используя разработанные нами метод получения негативных мутантов, получена серия мутантов от штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC13032, нуждающихся в тирозине. Все они продуцировали фенилаланин в ходе их выращивания в ферментационных средах, помещенных в колбы или пробирки. Ниже (рис. 4) показана зависимость количества накопленного к концу ферментации (3-е суток) от концентрации тирозина, добавленного в минимальную ферментационную среду, при использовании одного из полученных тирозин-недостаточных мутантов (туг-б).

Ранее продукция фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами данного микроорганизма объяснялась увеличением потока в пути биосинтеза ароматических аминокислот вследствие дефицита в клеточном пуле тирозина и освобождением первого фермента этого пути, ДАГФ-синтазы, которая ингибируется только в присутствии одновременно двух конечных продуктов – фенилаланина и тирозина. Оставался неясным вопрос, каким образом

префенатдегидратаза, активность которой ингибируется накапливающимся фенилаланином, участвует в продукции.

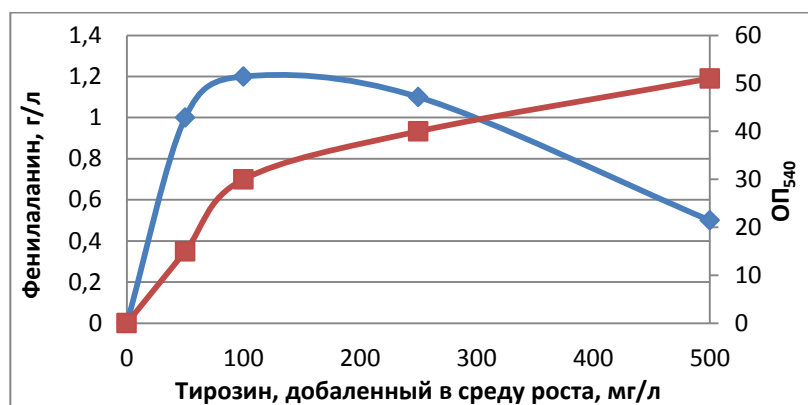


Рис. 4. Влияние тирозина на рост и накопление фенилаланина мутантом *tyr-6* (колбы, минимальная ферментационная среда).

Чтобы преодолеть это противоречие мы предположили, что накопление фенилаланина происходит неферментативным путем без участия префенатдегидратазы. На самом деле тирозиновые ауксотрофы, у которых мутацией блокирован арогенадегидрогеназа (см. рис.3) накапливают предшественник тирозина – арогенат, который при естественном подкислении ферментационной среды спонтанно превращается в фенилаланин. Действительно, известные химические свойства арогената указывают на эту возможность (рис. 5). Точно также префенат в кислой среде превращается в неаминированный предшественник фенилаланина – фенилпируват.

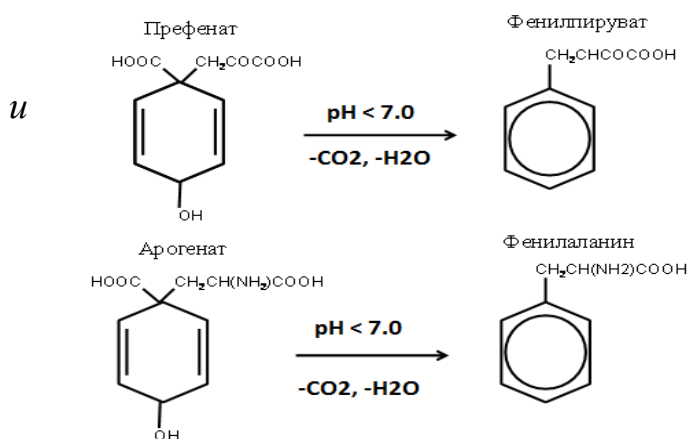


Рис.5. Превращение префената арогената при значениях pH ниже 7

От штамма *tyr-6* были получены мутанты с дополнительной потребностью в фенилаланине, в которых блокирован ген, кодирующий префенатдегидратазу. Полученные двойные *tyr phe* мутанты сохранили способность к накоплению фенилаланина, что подтверждает предположение о неферментативном синтезе фенилаланина из арогената.

При автоматическом pH-статировании среды в ходе выращивания штамма *tyr-6* в слабощелочных условиях (pH 7,5) продуцируется арогенат и

префенат (табл.4). В слабокислых условиях (рН 6) оба эти вещества спонтанно превращаются, соответственно, в фенилаланин и фенилпируват, который может поглощаться клетками и аминироваться с образованием фенилаланина. Если рН среды не поддерживался, то в среде также обнаруживался фенилаланин, поскольку в ходе ферментации спонтанно происходит подкисление среды по мере потребления сахаров за счет выделения клетками кислых продуктов.

Таблица 4. Влияние рН среды на накопление фенилаланина и его предшественников при выращивании ауксотрофного по тирозину мутанта *tyr-6* в лабораторных ферментерах.

рН среды в ходе ферментации	Концентрация фенилаланина и его предшественников, г/л.			
	Префенат	Арогенат	Фенилаланин	Фенилаланин после подкисления
6,0	0,11	0,00	1,58	1,30
7,0	0,82	0,67	0,13	0,80
7,5	1,07	1,35	0,13	1,48
Без рН-статирования	0,17	0,14	1,07	1,21

Таким образом, мутанты *S. glutamicum* нуждающиеся в тирозине, продуцируют арогенат и некоторое количество префената, а не фенилаланин, как это считалось ранее. Фенилаланин образуется из арогената и частично из префената при подкислении среды роста. Рис. 6 иллюстрирует механизм «продукции» фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *S. glutamicum*, а также других микроорганизмов, имеющих арогенатный (претирозиновый) путь биосинтеза тирозина.



Рис. 6. Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *S. glutamicum*, а также мутантами с двойной потребностью в фенилаланине и тирозине.

**Механизм продукции фенилаланина и мутантов, устойчивых к мета-фторфенилаланину, отобранных от прототрофного штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC13032.** От штамма дикого типа *S. glutamicum* ATCC 13032 были получены мутанты, устойчивые к структурному аналогу фенилаланина – м-фторфенилаланину. Изучение продукции аминокислот у



100 из них показало, что они накапливают смесь тирозина и фенилаланина. При исследовании регуляторных ферментов биосинтеза ароматических аминокислот, ДАГФ-синтазы, хоризматмутаза и префенатдегидратазы была выявлена десенсбилизация первого фермента общей части ароматического биосинтеза – ДАГФ-синтазы к согласованному ингибированию фенилаланином и тирозином (см. рис.7 слева), где представителем данных мутантов взят штамм Д28. Хоризматмутаза (катализирует превращение хоризмата в префенат) штамма Д28 также была полностью освобождена от ингибирования, что и следовало ожидать, так как активности ДАГФ-синтазы и хоризматмутаза регулируются общим аллостерическим центром (данные не приведены). В то же время, префенатдегидратаза, фермент специфического фенилаланинового пути, сохранил чувствительность к ингибированию фенилаланином (рис.7 справа).

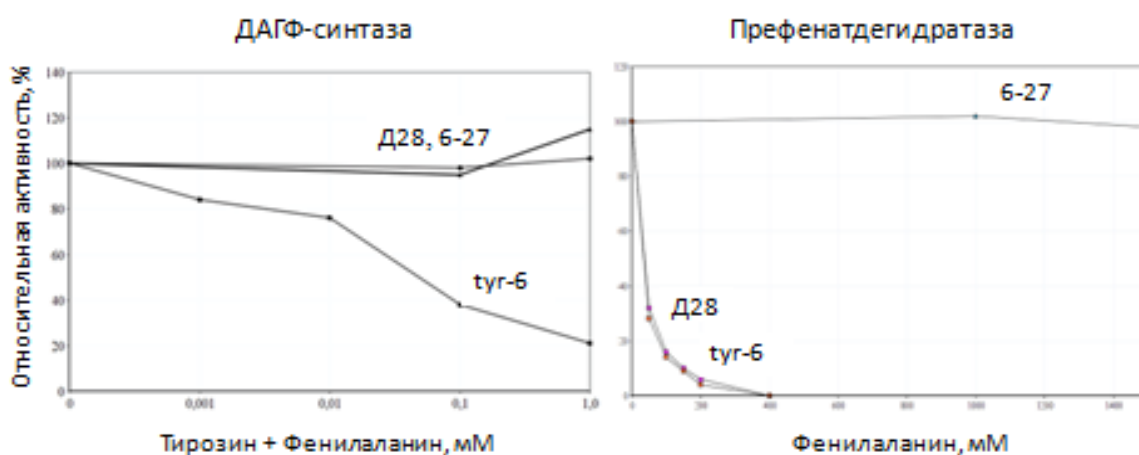


Рис.7. Ингибирование ДАГФ-синтазы и префенатдегидратазы эквимольной смесью фенилаланина и тирозина или фенилаланином у мутантов, устойчивых к мФФ, а также тирозинового ауксотрофа tyr-6.



Рис.8 Превращение префената в фенилаланин арогенатным путем протофными мутантами штамма ATCC 13032, резистентными к мФФ, у которых произошла десенсбилизация только ДАГФ-синтазы (мутант Д28).

Учитывая высокую чувствительность префенатдегидратазы к ингибированию фенилаланином и одновременно отсутствие ингибирования ДАГФ-синтазы и хоризматмутаза, мы предполагаем, что у такого рода штаммов, как и у тирозиновых ауксотрофов, происходит накопление арогената, который затем под действием арогенатдегидрогеназы превращается в тирозин, избыток которого выделяется в среду.

Выделившийся в среду арогенат неферментативно при снижении рН превращается в фенилаланин (рис. 8).

**Механизм продукции фенилаланина и мутантов, устойчивых к метафторфенилаланину (мФФ), отобранных от тирозиновых ауксотрофов.** От 6-ти независимо полученных ауксотрофных по тирозину штаммом отобрано по 100 клонов, устойчивых к мФФ. Уровень продукции фенилаланина был повышен практически у всех полученных мутантов с 0,8 - 1,0 г/л до 3 г/л (ферментационная минимальная среда с 100 мг/л L-тирозина). Среди полученных аналогорезистентных мутантов встречались прототрофные по тирозину ревертанты, которые продуцировали одновременно фенилаланин и тирозин, подобно аналогорезистентным мутантами, полученным от прототрофного штамма дикого типа ATCC 13032. Свойства ключевых ферментов биосинтеза фенилаланина у наиболее продуктивного продуцента, устойчивого к мФФ (штамм 6-27), полученного от ауксотрофного по тирозину штамма *tyr-6* отличаются от таковых прототрофных аналогорезистентных мутантов: у этого штамма выявлена не только десенсбилизация регуляторных ферментов общего пути, ДАГФ-синтазы (рис. 7 слева) и хоризматмутаза (данные не приведены) к согласованному ингибированию фенилаланином и тирозином, но также и префенатдегидратазы к ингибированию фенилаланином (рис. 7, справа).

У штамма 6-27 синтез фенилаланина происходит в основном ферментативно без существенного накопления арогената или префената, несмотря на блокирование арогенатдегидрогеназы. Это подтверждается опытами с рН-статированием в лабораторных ферментерах (табл. 5, рис. 9).

Таблица 5. Влияние рН среды на накопление фенилаланина и его предшественников при выращивании аналогорезистентного продуцента фенилаланина 6-27, нуждающегося в тирозине

рН среды ферментации	Концентрация фенилаланина и его предшественников, г/л.			
	Префенат	Арогенат	Фенилаланин	Фенилаланин после подкисления пробы
6,0	0,0	0,2	2,3	2,5
7,5	0,1	0,4	2,1	2,5



Рис. 9. Превращение префената в фенилаланин ферментативным путем клетками штамма 6-27, нуждающимся в тирозине с десенсбилизацией ДАГФ-синтазы и префенатдегидратазы

**Возможности дальнейшего повышения уровня продукции фенилаланина.** Несмотря на полную десенсibilизацию к ингибированию тирозином и фенилаланином ключевых ферментов в штамме 6-27, предполагалось, что мутации резистентности к другим ароматическим аналогам могут вызвать дополнительные изменения в биосинтезе фенилаланина, способствующие продукции. Индуцированы нитрозогуанидином мутанты (по 100-150) устойчивые к следующим аналогам: 5-метилтриптофан, 3,4-дигидроксифенилаланин, 2-метилфенилаланин, 3-аминотирозин. Однако селекция на устойчивость к указанным веществам не улучшила продукцию. В то же время, мутации, вызывающие повышенную устойчивость к уже использованному аналогу, м-ФФ, усиливали продукцию фенилаланина. Для индукции мутаций, сообщающих более высокую степень устойчивости к мФФ, в качестве источника тирозина для штамма 6-27 использовали дипептид лейцил-тирозин, не конкурирующий с мФФ за транспорт внутрь клеток. Присутствие тирозина во внутриклеточном пуле должно способствовать ингибирующему действию мФФ. Вначале получены мутанты, устойчивые к мФФ в концентрации 7 мг/мл, а затем от некоторых из них были индуцированы мутанты с большей устойчивостью (до 20 мг/мл мФФ). У мутантов с улучшенной продукцией фенилаланина изменений уровня ферментативных активностей ключевых ферментов по отношению к их родительскому штамму 6-27 не обнаружено (Табл. 6). Отмечается повышение внутриклеточного содержания ДАГФ – продукта первой реакции синтеза ароматических аминокислот, ДАГФ-синтазы, что, очевидно, связано с увеличением уровня синтеза субстратов реакции для ДАГФ-синтазы, эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата, синтез которых происходит в пентозофосфатном пути и гликолизе. Повышение внутриклеточного пула ДАГФ у наиболее активных продуцентов свидетельствует о недостаточной активности ферментов общей части пути ароматического синтеза.

Таблица 6. Некоторые биохимические свойства продуцентов фенилаланина, обладающих повышенной устойчивостью к мФФ

Штамм	Ферментативная активность, %		Фенил-аланин г/л	ДАГФ, пул
	ДАГФ-синтаза	Хоризматмутаза		
Тур-6	100	100	2,8	1
6-27	122	467	6,6	9,0
20	162	376	10,6	15,2
16	91	335	11,9	17,7
54	160	390	12,4	18,1

**Влияние плазмидной амплификации гена *pheA* на продукцию фенилаланина.** Поскольку продукция фенилаланина штаммом 6-27 происходит с участием префенатдегидратазы (ген *pheA*), то увеличение активности этого фермента путем амплификации мутантного (нечувствительного к ретроингибированию фенилаланином) могло бы увеличить отток префената и хоризмата в сторону синтеза фенилаланина. В соответствии с этой идеей был клонирован ген *pheA* из штамма 6-27 (плазида pRJ627, вектор pHY416).

Таблица 7. Эффект плазмидной амплификации гена *pheA* из хромосомы аналогорезистентного продуцента фенилаланина *S. glutamicum* 6-27

Штамм/ плазида	Активность ферментов, отн. ед.		Фенилаланин, г/л
	ПД	ХМ	
13032	1	1	0,0
13032/pRJ627	6	1	4,0
Тур-6	1	1	1,0
Тур-6/pRJ627	6	1	2,6

Введение плазмиды pRJ627 в клетки штамма дикого типа обуславливало устойчивость к аналогу фенилаланина и продукцию этой аминокислоты (табл. 7). Эффект амплификации в тирозиновом ауксотрофе тур-6, который накапливает арогенат, превращающийся затем в фенилаланин, был не столь значительным. По-видимому, пул префената, субстрата для префенатдегидратазы, снижен в результате оттока префената в арогенат и выделения последнего в среду. В то же время, у продуцента фенилаланина 6-27 и полученных от него более продуктивных мутантов (16, 20, 54), у которых префенатдегидрогеназа полностью освобождена от ингибирования фенилаланином, амплификация гена *pheA* не влияла на продукцию фенилаланина. Очевидно, лимитирующая стадия в синтезе фенилаланина у штамма 6-27 находится в более ранних участках биосинтеза, например, на уровне хоризматмутаза.

Чтобы оценить влияние амплификации гена, кодирующего хоризматмутазу, соответствующий ген *pheA* из хромосомы *E.coli* был клонирован. Этот ген кодирует бифункциональный фермент префенадегидратаза-хоризматмутаза, который превращает хоризмат непосредственно в фенилпириват, при этом промежуточный продукт, префенат, остается связанным с этим белком и не поступает в клеточный пул. Этот фермент предназначен для синтеза фенилаланина, но не тирозина, и его активность ингибируется только фенилаланином. Предварительно были получены мутации в гене *pheA* вызвавшие полную десенсибилизацию как префенатдегидратазы, так и хоризматмутаза к ингибированию фенилаланином, а затем на сконструированной плазмиде pVEB62 введены в клетки продуцентов фенилаланина (табл. 8).

Таблица 8. Влияние амплификации гена *pheA* из *E.coli* на ферментативную активность и продукцию фенилаланина штаммами *S.glutamicum*, продуцирующими фенилаланин

Штамм/плазмида	Ферментативная активность		Продукция фенилаланина, г/л
	Префенат-дегидратаза	Хоризматмутаза	
Д28	0,05	0,14	1,8
Д28/pVEB62	1,34	1,04	3,4
Тур-6	0,02	0,06	2,9
Тур-6/pVEB62	2,15	1,09	5,8
6-27	0,04	0,14	9,0
6-27/pVEB62	2,15	1,09	10,0
47	0,03	—	16,0
47/pVEB62	—	—	13,8

У полученных трансформантов активность ПД и ХМ значительно возросла, но продукция фенилаланина улучшилась, только у тех штаммов, у которых собственные ферменты не были десенсibilизированы к ингибированию фенилаланином (*tyr-6* и Д28). У штамма 6-27 усиление данной ферментативной активности не повлияло на продукцию фенилаланина, а в случае штамма 47 (мутант штамма 6-27, обладающий повышенной устойчивостью к мФФ) даже несколько снизило продуктивность. Очевидно, превращение хоризмовой кислоты в фенилаланин у штамма 6-27 и его производных не лимитирует продукцию фенилаланина. Данные указывают на недостаточную активность ферментов, оперирующих в промежутке от ДАГФ до хоризмата, где, очевидно, находится узкое место, лимитирующее продукцию фенилаланина.

**Мутация в гене *pheA* *S.glutamicum*, вызывающая десенсibilизацию префенадегидратазы к ингибированию фенилаланином** При анализе нуклеотидной последовательности не обнаружено мутаций в регуляторной зоне, тогда как в структурной части гена *pheA* выявлены три нуклеотидные замены: С215 ->Т, А258->G, Т704->С. Только последняя нуклеотидная замена привела к аминокислотной замене: Ser235->Pro.

Как показали более поздние биоинформационные исследования (Кунин с соавт., 1999), эта мутация находится в универсальном регуляторном домене АСТ. Домен АСТ характеризуется чередованием альфа- и бета спиралей :  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  протяженностью около 80 аминокислотных остатков.

Мутация Ser235Pro, полученная нами в гене *pheA* *S.glutamicum*, кодирующем префенатдегидратаза и сообщающую полную устойчивость к ингибированию фенилаланином, находится в структуре АСТ-домена (рис.10). Поскольку кристаллическая структура PheA из *S.glutamicum*. пока не установлена, мы наложили С-концевые последовательности ряда префенатдегидратаз (Рис.10). Из этого наложения (alignment) очевидна

определенная гомология в некоторых консервативных участках и, в частности, в позиции 235, в которой нами обнаружена мутация. Используя доступные программы анализа структуры белка, мы показали, что С-концевой участок имеет структуру  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ , которая в точности соответствует установленной рентгеноструктурным анализом структуре этого белка из *St. aureus*. Таким образом, есть достаточные основания полагать, что С-конец префенатдегидратазы *C. glutamicum* представляет собой АСТ-домен, а мутация Ser235Pro расположена в структуре  $\beta 2$ , что должно искажать ее структуру, что, видимо, препятствует связыванию фенилаланина.

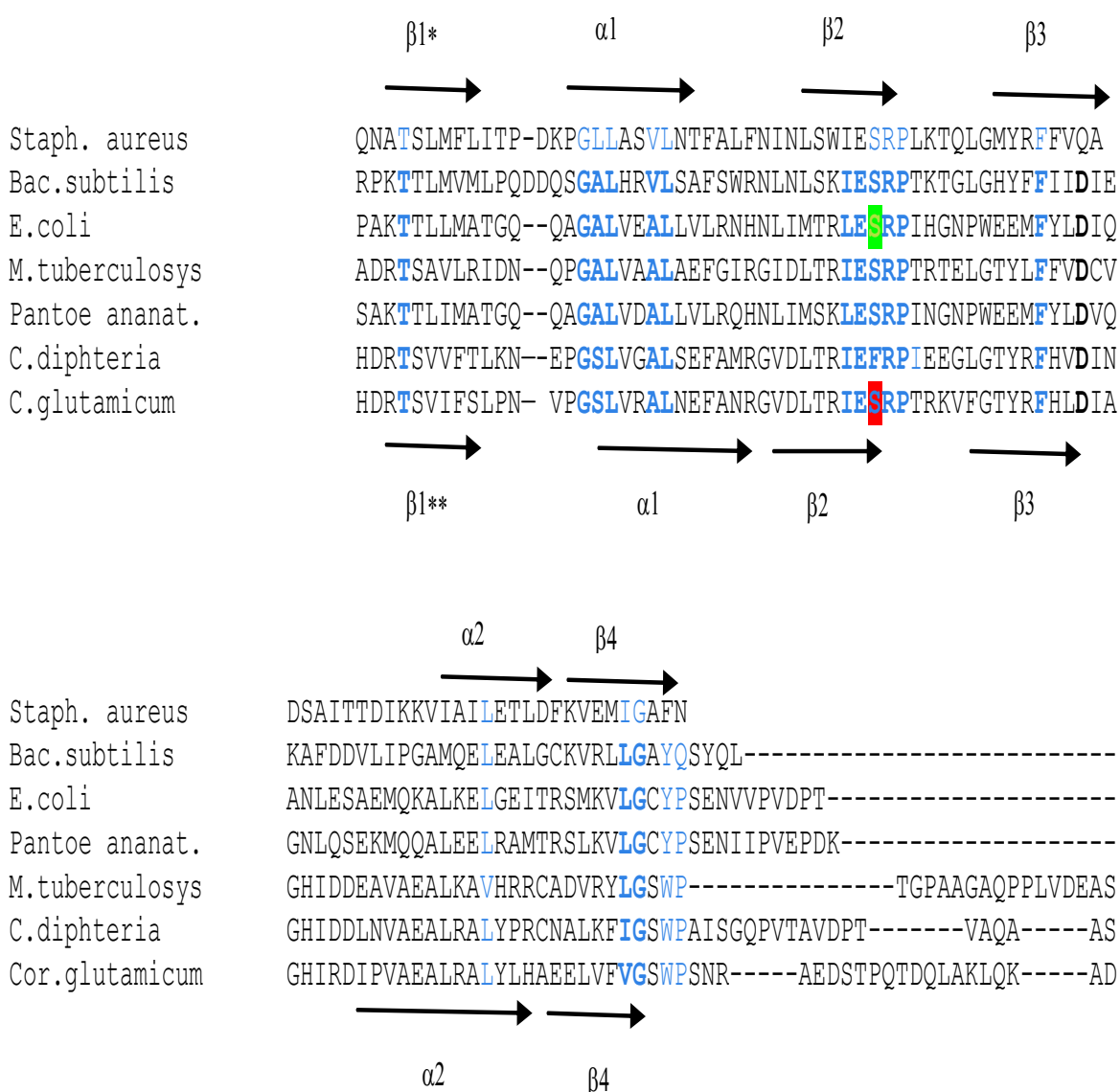


Рис. 10. Сравнение последовательности аминокислот С-конца префенатдегидратазы из некоторых микроорганизмов. Красным шрифтом указана замена, обнаруженная в настоящей работе (штамм 6-27).

Учитывая широкое распространение АСТ-доменов в структурах ферментов, подверженных ретроингибированию, а также в белках-репрессорах, по нашему мнению является целесообразным поиск в них АСТ

последовательностей методами биоинформатики с целью внесения в них мутаций, нарушающих их структуру и освобождения от ретроингибирования.

**Деградация фенилаланина клетками *C. glutamicum*.** Известно, что некоторые микроорганизмы способны метаболизировать фенилаланин, но нам не удалось обнаружить какие-либо данные о деградаци фенилаланина клетками *C. glutamicum*. Для того чтобы выбрать исходный штамм для получения эффективных продуцентов фенилаланина, важно знать, способны ли данные микроорганизмы деградировать эту аминокислоту.

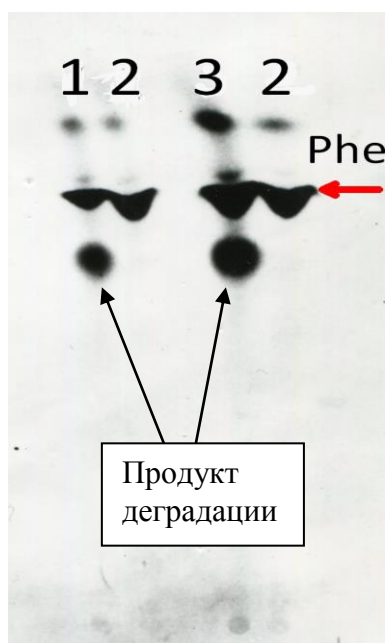
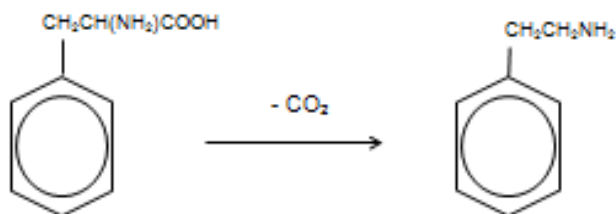


Рис.11. Радиоавтограф тонкослойной хроматограммы культуральной жидкости штаммов *C. glutamicum* ATCC 13032 (1), полученного от него тирозинового ауксотрофа *tyr-6* (2) и фенилаланинового ауксотрофа *pheA* (3). Использована минимальная среда с добавлением  $C^{14}$ -фенилаланина (1 мг/мл).

Штамм дикого типа *C. glutamicum* ATCC 13032, а также полученные от него тирозиновые и фенилаланиновые ауксотрофы выращивали в минимальной ферментационной в присутствии меченного по углероду ( $C^{14}$ ) фенилаланина. При сравнении радиоавтографов пластинок для тонкослойной хроматографии после разделения веществ, находившихся в культуральной жидкости, видно, что штамм дикого типа, а также полученный от него ауксотрофный по фенилаланину мутант (*pheA*) образуют вещество, содержащее радиоактивную метку, которое находится на хроматограмме ниже фенилаланина (рис. 11). В то же время, тирозиновый ауксотроф (*tyr-6*) утратил способность метаболизировать фенилаланин с образованием этого вещества. Следует принять во внимание накопление немеченого фенилаланина штаммов *tyr-6* (*tyrA*) и некоторое разбавление «холодным» фенилаланином радиоактивного фенилаланина

Вещество, образующееся из радиоактивного фенилаланина, нами не идентифицировано. Соответствующее ему пятно на тонкослойной хроматограмме имеет желтоватую окраску, оно не окрашивается ни нингидрином, ни 2,4-динитрофенилгидразином, то есть не является ни аминокислотой, ни кетокислотой (не является фенилпируватом). При обработке

реактивом Паули пятно приобретает характерную оранжевую окраску, что говорит о наличии у него ароматического кольца со смещенной электронной плотностью. Таким веществом мог бы быть фенилэтиламин, который образуется в некоторых известных путях деградации фенилаланина путем декарбоксилирования:



По-видимому, фермент арогенатдегидрогеназа из *S. glutamicum* способен не только декарбоксилировать арогенат, но и катализировать декарбоксилирование фенилаланина в сходной реакции. С точки зрения создания продуцентов фенилаланина ауксотрофность по тирозину за счет блокирования арогенатдегидрогеназы представляется весьма полезным. Эта мутация, во-первых, приводит к накоплению арогената, при подкислении среды превращающегося в фенилаланин, а, во-вторых, блокирует деградацию накапливающегося фенилаланина.

### Изучение путей деградации треонина у *Escherichia coli*

**Транспозонное блокирование гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу, и использование полученной мутации в улучшении плазмидных продуцентов треонина.** В культуральной жидкости плазмидных продуцентов треонина, полученных в институте ВНИИгенетика впервые в мире, в качестве примеси нами обнаружен аминокетон, который мог образоваться неферментативно из 2-амино-3-кетобутирата (АКБ) – первого интермедиата в известном пути деградации треонина у бактерий (рис. 12). Активность треониндегидрогеназы (ТДГ), первого фермента этого пути, также была обнаружена в клетках продуцентов треонина.

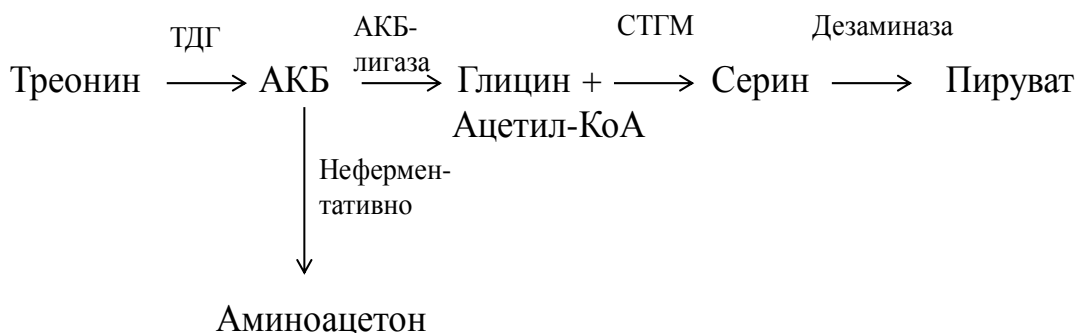


Рис.12. Путь деградации треонина у бактерий с участием треониндегидрогеназы



Для предотвращения деградации треонина был применен транспозонный мутагенез (Tn5) в сочетании с методом пенициллинового обогащения для селекции мутантов, которые утратили способность использовать треонин в качестве источника серина (см. рис.12). Использовали недостаточный по синтезу серина мутант по гену *serA*. Из 12 полученных мутантов этого штамма во всех случаях обнаружена транспозонная инактивация гена *glyA*, кодирующего серинтрансгидроксиметилазу (СТГМ, см. рис.12), тогда как активность ТДГ сохранилась. Этот факт указывал на существования второго пути деградации треонина до глицина, вероятно, с участием СТГМ (ген *glyA*). Действительно, транспозонный мутагенез штамма, неспособного превращать серин в глицин с помощью фермента СТГМ (*glyA*), привел к отбору мутанта, неспособного усваивать треонин в качестве источника глицина. Активность ТДГ у этого мутанта (И50) полностью отсутствовала.

Инсерция транспозона Tn5, инактивировавшая ген, названный нами *tdh*, была картирована. Конъюгационное картирование инсерция транспозона Tn5 показало, что она находится между 80-ой и 82-ой минутами генетической карты *E.coli* K12. Маркер *Km* наследуется с частотой, близкой к частотам наследования генов *hyl*, *mtl* и *rugE*. Общая трансдукция с помощью дефектного бактриофага T4GT7 позволила уточнить: *tdh::Tn5* тесно сцеплен с маркером *mtl* и находится между *mtl* и *rugE*. Далее картирование с помощью бактериофага P1 и дополнительным маркером *gpsA* (81,1 мин) показало, что коэффициент ко-трансдукции генов *gpsA* и *tdh::Tn5* составил 0,6-0,8. Анализ наследования неселективных маркеров показал, что ген *tdh* расположен между генами *gpsA* (81,1 мин) и *rugE* (81,7 мин), ближе к *gpsA*. Расчет по формуле Ву (Wu, 1966) показывает, что ген *tdh* локализуется на 81,2 мин карты *E. coli* K12. Проведенный позднее полный сиквенс хромосомы *E.coli* K12, подтвердил правильность проведенного нами картирования.

Инсерция транспозона Tn5, блокирующая ген *tdh*, была передана в плазмидный продуцент треонина, что привело к полному устранению накопления в среде аминокетона и одновременно повысило уровень продукции треонина (табл.9).

Таблица 9. Продукция треонина при ферментации в лабораторных ферментерах с автоматической подачей р-ра аммиака по датчику рН с использованием плазмидного продуцента 472 Т-23 и его производного ВНИИгенетика ТДГ-6 (ВКПМ В-3420)

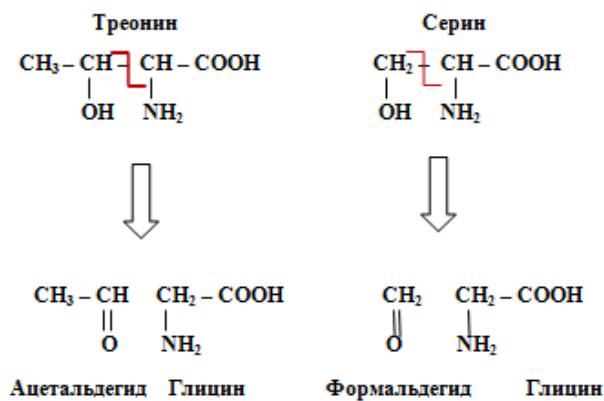
Штамм	Ген <i>tdh</i>	Продукция треонина, г/л (лабораторные ферментеры)
472 Т-23	<i>tdh+</i>	57,0
ТДГ-6	<i>tdh::Tn5</i>	66,9

Штамм ТДГ-6, как и предшествующие продуценты треонина (табл. 10), содержит плазмиду pYN7 (вектор pBR322), несущую треониновый оперон из хромосомы штамма MG442. Позднее для улучшения стабильности была сконструирована плазида VIC40 (вектор pAUC32), который содержит ген *par*, который контролирует передачу плазмид в дочерние клетки, и является более стабильной (Табл. 10).

Таблица 10. Этапы конструирования продуцентов треонина на основе *E. coli* K12

Штамм	Плазмида	Генотип	Комментарий	Литература
<i>E. coli</i> K12	нет	<i>relA</i>	Штамм К-12, ВКПМ В-2	
MG442	нет	<i>thrA<sup>ds</sup> ilvA* relA+</i>	Устойчивость к аналогу треонина ( $\beta$ -оксинорвалин)	Гусятинер и др., 1978.
VL334	pYN7	<i>thrA<sup>ds</sup> ilvA* relA<sup>+</sup> amp<sup>r</sup></i>	Введение плазмиды pYN7, несущей треониновый оперон из штамма MG442	Авт. св. СССР №875663 (1978). Патент США № 4278765 (1981)
M-1	pYN7	<i>thrA<sup>ds</sup> ilvA* relA<sup>+</sup> amp<sup>r</sup></i>	Отбор продуктивного клона	Авт. св. СССР № 943282 (1979), Патент США № 4321325 (1982)
472-T23	pYN7	<i>thrA<sup>ds</sup> ilvA* relA+ amp<sup>r</sup> scr+ thr<sup>r</sup></i>	Устойчивость к ингибированию треонином, усвоение сахарозы	Авт. св. СССР №974817 (1981). Патент США №5631157
ТДГ-6	pYN7	<i>thrA<sup>ds</sup> ilvA* relA+ amp<sup>r</sup> scr+ thr<sup>r</sup> tdh::Km<sup>r</sup></i>	Трансдукция фагом P1 <i>tdh::Tn5</i> . Блокирование деградации треонина	Авт. св. СССР №1362021
640	pVIC40	<i>thrA<sup>ds</sup> ilvA* relA+ str<sup>r</sup> scr+ thr<sup>r</sup> tdh::Km<sup>r</sup></i>	Замена плазмиды pYN7 в штамме ТДГ-6 на плазмиду VIC40. Улучшенная стабильность плазмиды.	Авт. св. СССР № 1694643 Патент США №5175107 (1992)

**Поиск ферментов, участвующих в деградации треонина в клетках *E. coli* K12.** На основании данных, изложенных выше, было высказано предположение, что путь деградации треонина до глицина шунтирован и что фермент СТГМ (*glyA*) способен выполнять роль альдолазы, расщепляя треонин на ацетальдегид и глицин. В литературе имеются данные о способности очищенного препарата СТГМ из кишечной палочки катализировать реакцию распада треонина на глицин и ацетальдегид (альдолазная реакция), что, видимо, связано со сходством треонина и серина в качестве субстратов и образующихся продуктов реакций (ацетальдегид и формальдегид).



По-видимому, реакцию образования глицина (и ацетальдегида) катализирует СТГМ в качестве побочной (наряду с главной) ферментативной активностью. Для проверки этой гипотезы были получен штамм B7-2 glyA<sup>-</sup>, производный от штамма B7 (коллекция ВКПМ), у которых индуцирована мутагеном мутация в гене glyA (нуждающихся в глицине, но не в серине.). Кроме того сконструирован штамм B7 glyA::Tn5 с инсерцией транспозона в ген glyA. Определяли треонинальдолазную активность (ТА) и активность СТГМ.

Таблица 11. Активность серингидрокси метилтрансферазы (СТГМ) и треонинальдолазы (ТА) у штамма E.coli B7 дикого типа и его мутантов по гену glyA (B7-2 и B7 glyA::Tn5)

Тип ферментативной активности	Активность, нмоль/мин/мг белка		
	B7 glyA <sup>+</sup>	B7 glyA::Tn5	B7-2 glyA <sup>-</sup>
СТГМ	37 <sub>±3</sub>	3,0 <sub>±3</sub>	0,0 <sub>±2</sub>
ТА	9,1 <sub>±0,6</sub>	0,0 <sub>±1</sub>	0,9 <sub>±0,5</sub>

У штамма дикого типа обнаруживаются обе ферментативные активности, тогда как у обоих полученных штаммов одновременно утрачиваются обе активности независимо от способа внесения мутации в ген glyA (табл. 11) и от способа выращивания клеток (данные не приведены). В штамме E.coli K12 активность ТА обусловлена ферментом СТГМ (ген glyA), и, следовательно, нет специального гена для ТА, по крайней мере экспрессируемого в аэробных условиях. Эти данные объясняют полученные ранее результаты. Мутанты по ТДГ невозможно отобрать, используя треонин в качестве источника серина, поскольку имеется два пути превращения треонина в серин: через ТДГ и СТГМ/ТА, причем оба пути вначале приводят к глицину (Рис.13). Но имеется лишь один фермент, превращающий глицин в серин – СТГМ (ген glyA). Естественно, мутации по гену glyA (вместо tdh) и были отобраны. С другой стороны, при использовании для селекции штамма с заблокированной СТГМ (glyA<sup>-</sup>) путь

деградации до глицина не был шунтирован, и это обстоятельство предоставляло возможность отбора мутантов по гену *tdh*.

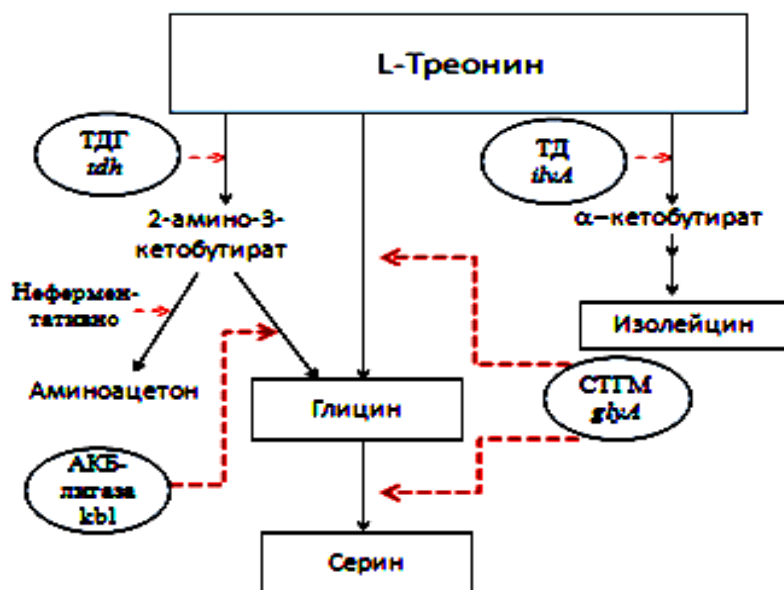


Рис.13. Пути ассимиляции треонина у *E.coli* K12.

**Вклад трех путей метаболизации треонина в деградацию треонина клетками *E.coli* K12.** Таким образом, три фермента атакуют треонин: ТДГ (*tdh*), СТГМ (*glyA*), а также треониндезаминаза (ТД), кодируемая геном *ilvA*. При создании продуцентов треонина и изолейцина важно оценить вклад каждого из них в потребление треонина. На рис. 14 показан рост ( $OP_{540}$ ) клеток штамма *E.coli* K12 дикого типа и потребление треонина, добавленного (1,5 г/л) в среду. Как видно из графиков, после 6 часов интенсивного роста накопление биомассы прекращается (в связи с расходом глюкозы), одновременно прекращается потребление треонина.

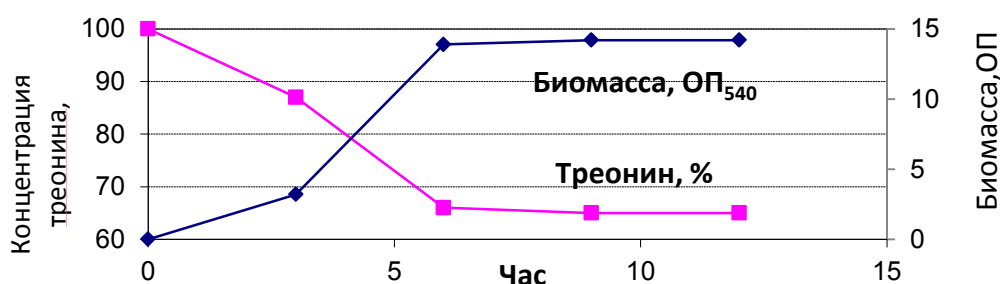


Рис. 14. Потребление треонина из среды роста клетками штамма дикого типа *E.coli* K12 (ВКПМ В7).

Для изучения вклада трех путей метаболизации треонина на основе штамма дикого типа (ВКПМ В7) были получены производные, различающиеся аллельными состояниями генов *tdh* и *glyA* (табл.12). Активность ТД подавляется изолейцином, что позволяет оценить вклад всех трех ферментов, добавляя или не добавляя изолейцин в среду. Штаммы

выращивали в глюкозо-минеральной среде с треонином (1500 мкг/мл) в течение 6 - 8 часов до остановки роста.

Таблица 12. Влияние инактиваций ТДГ (*tdh*), СТГМ (*glyA*) и ТД (*ilvA*) на удельное потребление треонина из среды

Штамм	Аллельное состояние генов		Изолейцин (300 мг/л)	Удельное потребление треонина
	<i>tdh</i>	<i>glyA</i>		
B7 (дикий тип)	+	-	-	38,8
			+	17,5
B7 <i>tdh</i> ::Tn5	-	+	+	10,4
B7 <i>glyA</i> ::Tn5	+	-	+	8,6
B7-1	-	-	+	1,9

Присутствие изолейцина наиболее значительно снижало потребление треонина из среды. Очевидно, что поглощенный из среды треонин лишь частично превращается в конечный продукт – изолейцин. Основная масса треонина дезамирируется с образованием альфа-кетомасляной кислоты, которая каким-то образом метаболизируется клетками.

Блокирование ТДГ (ген *tdh*) или СТГМ (ген *glyA*) приводит к приблизительно равному снижению потребления треонина как на фоне изолейцина, так и в его отсутствие. При блокировании всех трех путей метаболизации треонина потребление треонина минимально. Реверсия мутации в гене *glyA* (нетранспозонной) приводили к возрастанию потребления треонина (данные не приведены), что подтверждает роль СТГМ в метаболизме треонина.

Итак, с помощью транспозонного мутагенеза блокирован ген, кодирующий ТДГ. Перенос мутантного гена, маркированного устойчивостью к канамицину, в хромосому плазмидного продуцента, привел к усилению продукции треонина и к прекращению накопления аминокетона в среде. Лицензия на получение треонина с помощью полученного продуцента представлена японской биотехнологической компании Аджиномото для производства треонина на заводах, принадлежащих этой компании во многих странах.

### **Исследование пути биосинтеза цистеина у *Escherichia coli* с точки зрения создания продуцентов этой аминокислоты**

3-Фосфоглицерат (ФГ) – точка ответвления гликолитического потока углерода в сторону серина и далее цистеина. Через этот поток проходит 15% углерода и только 6% идет на серин для включения его в белки [289]. На основе серина синтезируется цистеин, глицин и частично триптофан. В ходе синтеза глицина из серина отщепляются одноуглеродные фрагменты, расходуемые на синтез метионина, пуринов и пиримидинов, а также на

метилование ДНК. Дерегуляция этого потока важна для получения микробных продуцентов не только серина и цистеина, но и глицина, метионина и триптофана, а также всех метаболитов, в состав которых включаются C1 фрагменты. Путь имеет две точки регуляции конечными продуктами: 3-фосфоглицератдегидрогеназу (ФГД, ингибитор серин) и О-ацетилсеринсинтазу (ОАС, ингибитор цистеин).

**Природа продукции 2-гидроксиглутаровой кислоты (ГГ) с участием 3-фосфоглицератдегидрогеназы (ФГД).** Если ингибирование ФГД серином тщательно изучено, и известны мутации, вызывающие десенсбилизацию к ингибированию, то другая особенность ФГД – способность восстанавливать 2-кетоглутаровую кислоту (2-КГ) с образованием 2-гидроксиглутаровой кислоты (2-ГГ), приводила к неоправданной с точки зрения получения, например, цистеина, побочной продукции 2-ГГ и снижению выхода цистеина.

В имеющейся литературе оказалось достаточно данных, чтобы высказать гипотезу о природе и значении продукции 2-ГГ и наметить пути устранения этого недостатка продуцентов цистеина на основе *Escherichia coli* и *Pantoea ananatis*. Значение предложенной гипотезы выходит за пределы чисто практических задач и имеет общебиологическое значение.

Следующие особенности ФГД приняты во внимание:

1) Равновесие реакции, катализируемой ФГД ( $\text{ФГ} + \text{NAD}^+ = \text{3-фосфогидроксипируват} + \text{NADH}$ ) смещено влево. Скорость обратной реакции превышает скорость прямой в 70 раз.

2) Фермент при попытках его очистки и кристаллизации содержит NADH. Даже диализированные препараты содержали около 2 молекул NADH на молекулу фермента. Константа диссоциации комплекса E-NADH чрезвычайно низка – менее 10 нМ.

3) ФГД обладает побочной ферментативной активностью: восстанавливает 2-КГ до 2-ГГ. Физиологический смысл этой реакции не объяснен; предполагалось, что побочная реакция конкурирует с главной.

Принимая во внимание известные из литературы концентрации субстратов этого фермента и продуктов реакции в клетках *E. coli*, а также известные константы Михаэлиса для ФГД, мы пришли к следующей гипотезе о механизме реакции. После завершения прямой реакции ( $\text{ФГ} + \text{NAD}^+ = \text{3-фосфогидроксипируват} + \text{NADH}$ ), комплекс E-NADH не диссоциирует, а связывает 2-КГ и проводит реакцию  $2\text{-КГ} + \text{NADH} = 2\text{-ГГ} + \text{NAD}^+$ . В результате фермент готов провести новый цикл прямой реакции. Таким образом, происходит чередование этих двух реакций (рис. 15).

Течение преимущественных (направление по часовой стрелки на рис. 15) реакции в клетках следующее (начиная от свободного фермента).

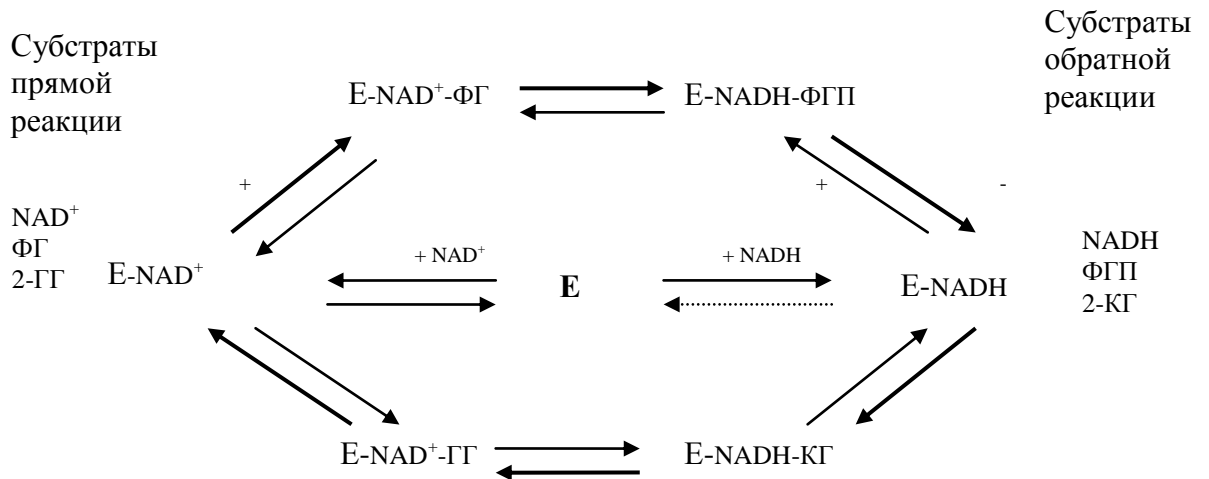
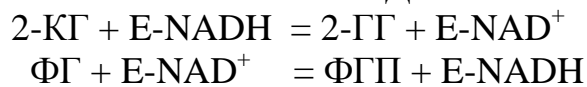


Рис. 15. Схема превращений фермент-субстратных комплексов 3-фосфоглицератдегидрогеназы из кишечной палочки. Жирными стрелками указаны преимущественные направления реакций.

$E + NADH = E-NADH$  или  $E + NAD^+ = E-NAD^+$ . Затем следует челночный механизм, чередующихся реакций окисления и восстановления  $NAD$ , постоянно связанного с белком ФГД:



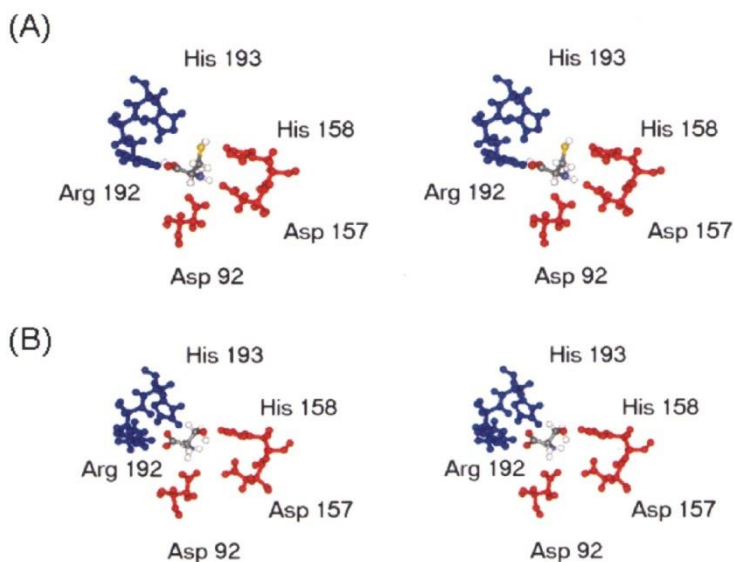
Если фермент вначале связывает  $NAD^+$ , то порядок реакций обратный. В уравнение суммарной реакции не входят ни окисленная, ни восстановленная формы  $NAD$ , то есть  $NAD$  не расходуется. Минимальное количество  $NAD$  в любой из его форм должно присутствовать в пуле, чтобы инициировать реакции. Скорость прямой реакции зависит от присутствия двух интермедиатов центрального метаболизма (ФГ и 2-КГ), концентрации которых высоки, тогда как концентрации продуктов реакции (2-ГГ и ФГП) малы (менее 0,001 мМ каждого). Каждая из двух реакций (окисления ФГ и восстановления 2-КГ) являются мономолекулярными. В биосинтетическом направлении реакция представляет собой окисление ФГ за счет восстановления 2-КГ.  $NAD$  участвует в процессе окисления-восстановления, попеременно являясь то донором гидрид-иона, то – акцептором. По сути эта реакция не является дегидрогеназной реакцией в обычном понимании (перенос водорода на  $NAD^+$ ), а скорее – трансгидрогеназной (перенос водорода от ФГ к КГ).

Образование гидроксиглутаровых кислот неизбежно в ходе синтеза серина, цистеина и их производных в клетках *E.coli* и, вероятно, других энтеробактерий. Предотвратить их синтез можно, используя чужеродные ферменты, а также путем увеличения активности ферментов,

неустановленных ферментов, метаболизирующих гидроксиглутаровые кислоты.

**Десенсбилизация О-серинацетилтрансферазы E.coli к ретроингибированию цистеином для создания продуцента цистеина.** В пути биосинтеза цистеина два фермента подвержены ретроингибированию: 3-фосфоглицерат-дегидрогеназа (ФГД), ингибируемая серином, и О-ацетилсеринсинтаза (ОАС), ингибируемая цистеином. Десенсбилизации ФГД достигается мутациями в регуляторном С-концевого домена АСТ. Механизм ингибирования ОАС цистеином носит конкурентный характер, и освобождение от ретроингибирования цистеином приводило к одновременному снижению каталитической активности, поскольку ингибитор (цистеин) связывался с активным центром. Была поставлена цель получить такие мутации, устраняющие ретроингибирование цистеином, при которых в полной мере сохранялась бы каталитическая активность.

Для введения мутаций, нарушающих конкурентное ингибирование цистеином, на основании рентгеноструктурного исследования ОАС с помощью компьютерного моделирования получена модель сайта фермента, связывающего серин (субстрат) и цистеин (ингибитор). Найден аминокислотный остаток белка (Asp92), образующий водородную связь с цистеином, но не с серином (Рис.16). В петлю, его содержащую, с помощью сайт-специфического мутагенеза введены случайные аминокислотные замены, меняющие расстояние от Asp92 до цистеина.



*Рис. 16. Объемные модели связывания цистеина (А) и серина (В) в активном центре О-ацетилсеринсинтазы E.coli, полученные на основании компьютерного моделирования.*

Отобраны мутанты, сохранившие каталитическую активность, но утратившие чувствительность к ингибированию цистеином (табл.13). Наиболее эффективные замены лишь незначительно искажают структуру альфа-спирали в которой находится Asp92, но, очевидно, смещают его на расстояние, при котором водородная связь с ингибиторной молекулой цистеина не образуется.



Таблица 13. Сравнение активности ОАС и чувствительности к ингибированию цистеином у полученных мутантов

Ген cysE	Рандомизированная последовательность ОАС (позиции 89-96)	Активность ОАС, нмоль/мин/мг	IC <sub>50</sub> , мкМ	K <sub>i</sub> , мкМ
Дикий тип	Arg Thr Arg Asp Pro Ala Val Asp	1680	0,8	0,6
cysE5	Arg Thr Arg Asp Pro Ala <u>Arg Pro</u>	715	1100	950
cysE12	Arg Thr Arg Asp Pro Ala <u>Gly Gly</u>	1440	125	114
cysE15	Arg Thr Arg Asp Pro Ala <u>Leu Pro</u>	1470	550	510
cysE1	<u>Pro</u> Thr Arg Asp Pro Ala Val Asp	1600	460	420
cysE142	<u>Ser Leu</u> Arg Asp Pro Ala Val Asp	1220	20	15
cysE10	Arg Thr Arg Asp Pro <u>Thr</u> Val Asp	2692	4,7	3,4
cysE11-2	<u>His Val</u> Arg Asp Pro Ala Val Asp	1900	410	395
cysE15-2	<u>Thr Arg</u> Arg Asp Pro Ala Val Asp	1100	6,0	4,5

На основе полученных мутантов сконструированы эффективные продуценты цистеина, нашедшие применение в производстве цистеина, защищенные патентом Российской Федерации, а также зарубежными патентами.

**Ассимиляция тиосульфата в биосинтезе цистеина клетками E.coli.** Полученные нами продуценты цистеина на основе E.coli помимо целевого вещества накапливали S-сульфоцистеин (СЦ) – промежуточное вещество в пути превращения O-ацетилсерина в цистеин при использовании тиосульфата в качестве источника серы (рис.17). Нашей задачей было понять механизм превращения СЦ в цистеин и усилить способность клеток осуществлять это превращение. Необходимо было выявить природу восстановителя сульфоцистеина и определить, является ли реакция восстановления СЦ до цистеина ферментативной.

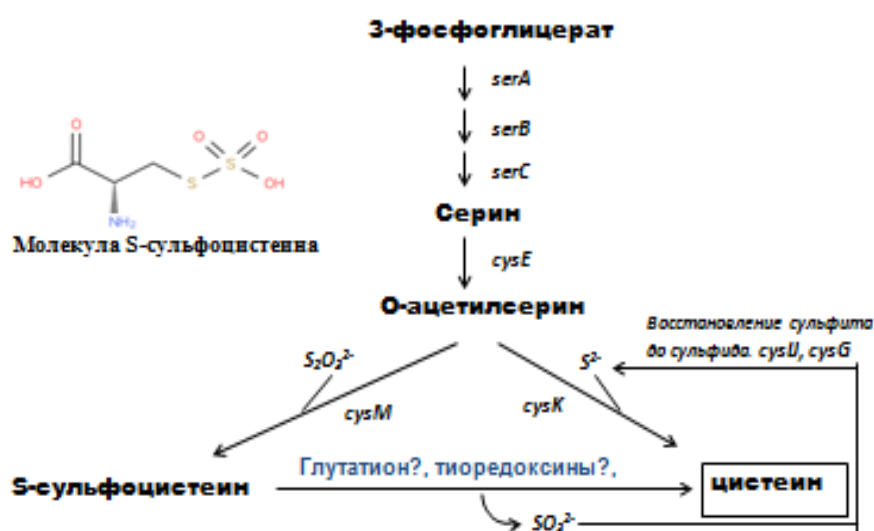


Рис.17.

Ассимиляция серы тиосульфата в синтезе цистеина.

От штамма *cusE*<sup>-</sup> был получено 18 мутантов, дефектных по превращению СЦ в цистеин. Используя плазмидный банк генов штамма дикого типа, которым трансформировали полученные мутанты, показано, что комплементировать данный дефект способны плазмиды, содержащие, как показало секвенирование хромосомных вставок, гены, участвующие в синтезе глутатиона (*gshA*, *gshB*), а также вставка, содержащая неаннотированный ген *udjN*, кодирующая белок с трансмембранными доменами. Эти данные указывают на участие глутатиона в восстановлении СЦ с образованием цистеина.

Таблица 14. Влияние белков *E.coli* на восстановление S-сульфоцистеина с образованием цистеина в присутствии глутатиона

Глутатион, 12 мМ	Глутатион-редуктаза, NADPH	Бесклеточный экстракт <i>E.coli</i> , 0,1 мг белка в мл	Скорость образования цистеина, мол/мин
-	-	-	<0,5
-	+		<0,5
+	-		<0,5
+	+		<0,5
-	-	+	2,4
+	-		3,9
-	+		1,1
+	+		38

В бесклеточной системе в присутствии глутатиона, а также глутатионредуцирующего фермента и NADPH, восстановления СЦ до цистеина не происходило (табл.14) Только при добавлении экстракта клеток штамма *E.coli* наблюдалось образованию цистеина из СЦ, что свидетельствует о ферментативном характере восстановления СЦ с участием глутаредоксинов.

Измерения активности S-сульфоцистеинредуктаз в мутантах с делециями генов для глутаредоксинов показало, что делеция только гена *grxC* существенно (на 50%) снижает активность (табл. 15). При делеции всех трех генов сохраняется около 40% от активности в штамме дикого типа, что указывает на наличие в *E. coli* неустановленных изоферментных глутаредоксинов, которые участвуют в глутатион-зависимом восстановлении СЦ. Плазмидная амплификация генов для глутаредоксинов подтверждает важность глутаредоксина С (*grxC*) в реакции восстановления СЦ. Повышенная экспрессия гена *grxC*, помещенного под контроль сильного промотора, снижает накопление S-сульфоцистеина и повышает уровень продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты. Усиление экспрессии гена *gogA*, кодирующего глутатионредуктазу, приводит к дальнейшему увеличению продукции (патент РФ 2458981).

Таблица 15. Влияние делеций или амплификации генов, кодирующих глутаредоксины на активность S-сульфоцистеинредуктазы.

Делетированные гены глутаредоксинов	Амплифицированный ген глутаредоксинов*	Активность S-сульфоцистеинредуктазы, нмол/мин/мг белка
Нет (дикий тип MG1655)	Нет	26,1
$\Delta$ grxA	Нет	28,3
$\Delta$ grxB	Нет	20,1
$\Delta$ grxC	Нет	13,7
$\Delta$ grxA $\Delta$ grxB $\Delta$ grxC	Нет	11,2
$\Delta$ grxA $\Delta$ grxB $\Delta$ grxC	grxA	12,1
$\Delta$ grxA $\Delta$ grxB $\Delta$ grxC	grxB	39,2
$\Delta$ grxA $\Delta$ grxB $\Delta$ grxC	grxC	201,9

**Исследование роли гена ydjN в усвоении S-сульфоцистеина.** Выше показано, что неспособность к усвоению СЦ вызывается мутациями в генах для биосинтеза глутатиона, а также в неаннотированной рамке считывания ydjN. Делеция гена ydjN не сказывается на внутриклеточном превращении О-ацетилсерина в цистеин в отличие от делеции генов для глутаредоксинов и, по-видимому, приводит к неспособности поглощать СЦ из среды (табл.16).

Таблица 16. Рост производных цистеин-недостаточного штамма E.coli LE392  $\Delta$ cysE в присутствии S-сульфоцистеина и предшественника цистеина – О-ацетилсерина

Генотип	S-сульфоцистеин,	О-ацетилсерин + сульфид	О-ацетилсерин + тиосульфат
$\Delta$ cysE	+	+	+
$\Delta$ cysE $\Delta$ gshA	-	+	-
$\Delta$ cysE $\Delta$ gshB	-	+	-
$\Delta$ cysE $\Delta$ ydjN	-	+	+

Действительно, белок YdjN содержит в своей структуре от 8 до 10 трансмембранных сегментов, предсказываемых различными общедоступными программами. В частности, сервер EMBnet (программа Tmpred) обнаруживает 8 трансмембранных доменов (рис.18). Белок содержит лишь один остаток цистеина, что указывает на то, что этот белок (его экспрессия) важен именно при дефиците соединений серы.

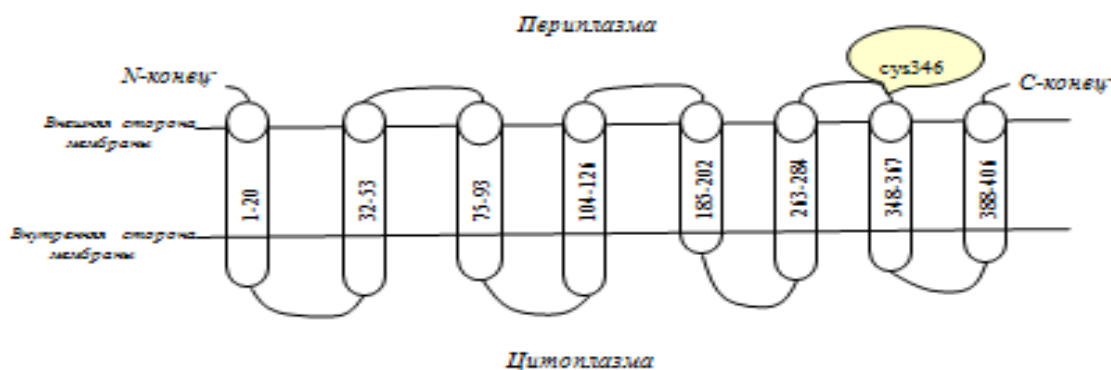
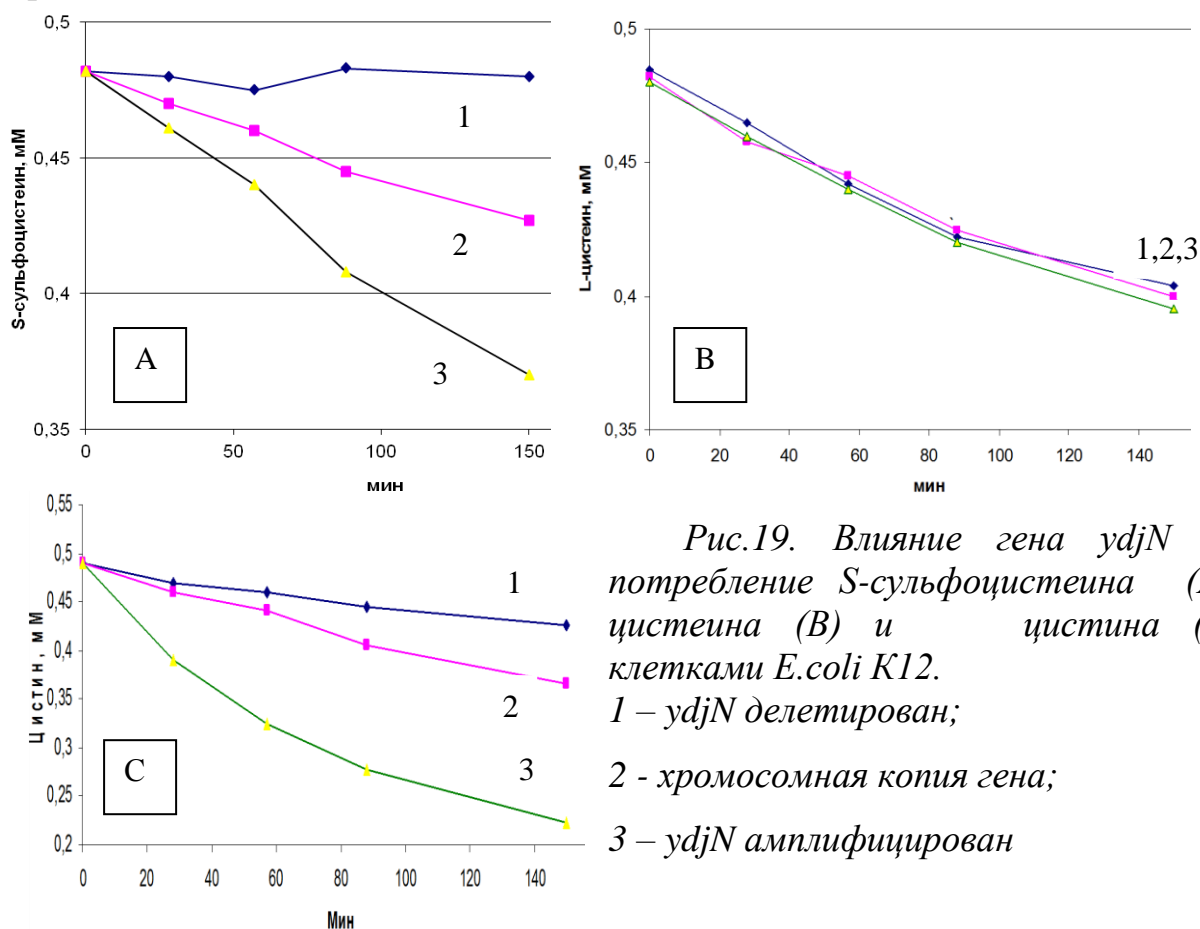


Рис. 18. Структура трансмембранного белка YdjN на основе компьютерной модели программы Tmpred.

Делеция гена *udjN* нарушала поглощение СЦ и цистина (рис. 19А, 19С), но ни делеция гена *udjN*, ни его амплификация не сказывались на скорости поглощения цистеина (рис. 19В). Очевидно, белок YdjN использует в качестве субстрата соединения, содержащие два ковалентно связанных атома серы.



Учитывая данные, полученные нами и другими исследователями, касающиеся белка YdjN, можно представить роль этого транспортера при продукции цистеина с использованием тиосульфата в качестве источника серы. Во-первых, при продукции цистеина наблюдается побочная продукция СЦ. Во-вторых, в культуральной жидкости в присутствии кислорода

происходит окисление цистеина до цистина и выпадение последнего в осадок. Однако часть цистина несмотря на малую растворимость остается в культуральной жидкости (около 1 г/л). Таким образом, в культуральной жидкости присутствуют одновременно два вещества (СЦ и цистин), которые конкурируют за транспортер YdjN для возврата в клетки. Оба эти вещества, попав в клетки, восстанавливаются с участием глутатиона до цистеина, а также до сульфита в случае СЦ (см.рис.17 и 20). Образованный цистеин вновь экскретируется из клеток, окисляется кислородом, выпадает в осадок в виде цистина, а остающийся в растворе цистин частично всасывается транспортером YdjN вновь в клетки.

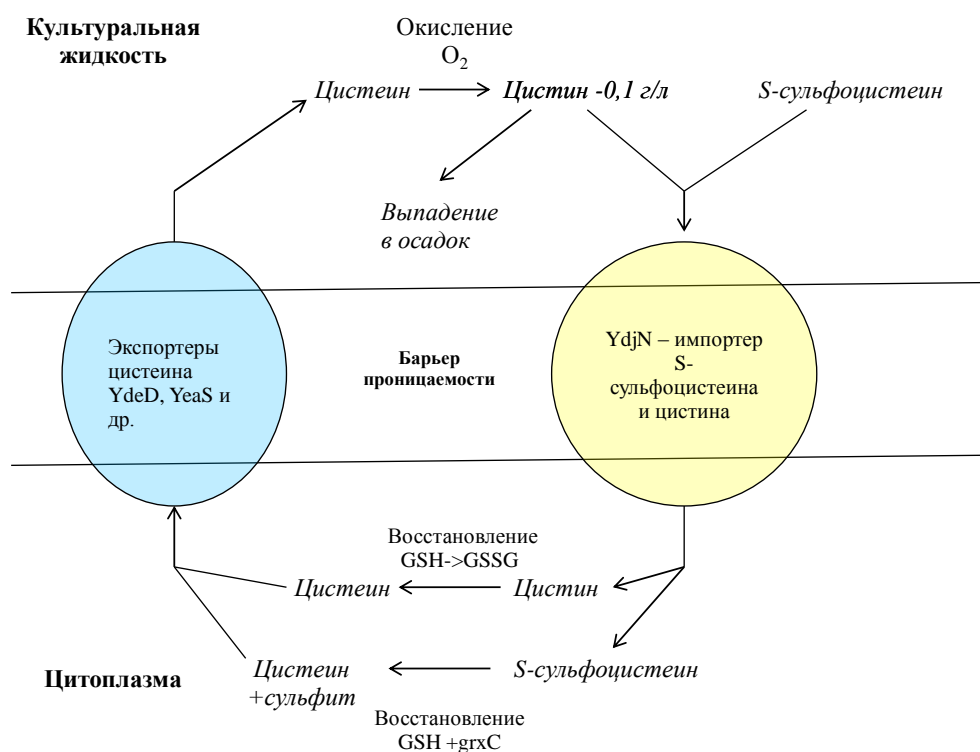
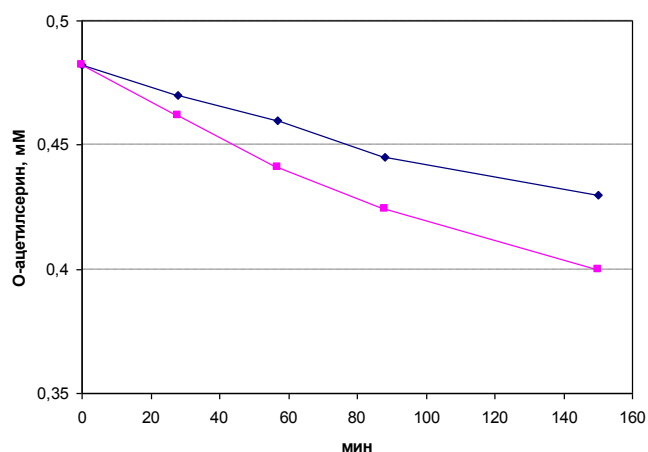


Рис. 20. Участие транспортеров цистеина и его серусодержащих производных в круговороте этих веществ, осуществляемого клетками *E.coli*, продуцирующими цистеин при использовании тиосульфата в качестве источника серы.

Чтобы минимализировать описанный холостой цикл, требующий дополнительной энергии, необходимо снизить концентрацию цистина в культуральной жидкости, чтобы, во-первых, не препятствовать возврату СЦ в клетки из-за конкуренции за общий для них транспортер YdjN, и, во-вторых, избежать возврата цистина в клетки и последующего его восстановления и экскреции. Все эти процессы энергозависимые и поэтому снижают выход конечного продукта на массу израсходованного углевода. Сказанное выше иллюстрирует на рис. 20, на котором появление СЦ в культуральной жидкости не связано с каким-либо конкретным экспортером, поскольку это пока неизвестно.

**Исследование роли гена *ydgR* в усвоении О-ацетилсерина** В культуральных жидкостях продуцентов цистеина на основе *E. coli* и *P. ananatis* наряду с цистеином накапливаются гидроксиглутаровые кислоты (см. выше), а также предшественники цистеина – О-ацетилсерина (АС) и, при использовании тиосульфата в качестве источника серы, – (СЦ) (см. выше). В данном разделе рассматривается проблема побочной продукции АС – предшественника цистеина (рис. 17). АС подвергается в среде необратимой изомеризации с образованием N-ацетилсерина, который не усваивается клетками.

В литературе отсутствуют данные об импортерах АС, однако АС поглощается из среды и превращается в цистеин, что указывает на существование таких белков. Чтобы найти гены, контролирующие поглощение АС культуру штамма *E. coli* MG1655 $\Delta$ cysE, было предположено, что АС транспортируется в клетки одной из систем транспорта аминокислот. Действительно, смесь всех аминокислот подавляла рост на среде с АС в качестве источника цистеина. Ни одна в отдельности аминокислота не ингибировала транспорт АС, но смесь метионина, лейцина и глутамина в качестве ингибитора позволила отобрать клоны штамма, трансформированные банком генов *E. coli*, способные усваивать АС. Вставки в эти плазмиды содержали гены *marC*, *uchE*, *yhgN*, *sdsRQP*. Все они кодируют не импортеры, а экспортеры из группы факторов множественной лекарственной устойчивости. Эти гены были удалены из хромосомы штамма MG1655 $\Delta$ cysE и полученный штамм MG1655 $\Delta$ 5 трансформировали банком генов, полученном из хромосомы этого же штамма. В полученных усваивающих АС трансформантах обнаружены плазмиды со вставками гена *ydgR*, кодирующего трансмембранный белок. Известно, что он является протон-зависимым транспортером ди- и трипептидов (Weitz et al. 2007). Ген *ydgR* был клонирован на векторе pMIW118 под контролем промотора гена *nlpD* кишечной палочки и полученная плаزمида была введена в штамм MG1655 $\Delta$ 5. В результате штамм приобрел способность к усвоению АС в присутствии смеси аминокислот. Кроме того, этот штамм с большей скоростью потреблял АС из жидкой среды, чем его бесплазмидный вариант (Рис. 21).



*Рис. 21. Поглощение О-ацетилсерина из среды штаммом MG1655 $\Delta$ 5 (верхняя кривая) и MG1655 $\Delta$ 5/pMIW118-PnlpD8-ydgR (нижняя кривая).*

## Заключение

1. **Метод обогащения мутантами *C.glutamicum*.** Селекция мутантов *C.glutamicum*, дефектных по биосинтезу и усвоению необходимых метаболитов весьма трудоемкой из-за отсутствия методов обогащения такого рода мутантами. Пенициллин подавляет рост *C.glutamicum*, не вызывая их гибели, что не позволяет использовать пенициллиновое обогащение. Последовательная обработка пенициллином и лизоцимом позволяет обогащать культуру негативными мутантами в сотни раз. Этим методом получены мутанты недостаточные по аминокислотам, неспособные усваивать аминокислоты, мутанты по генам центрального метаболизма.

2. **Методы пермеабилзации клеток *C.glutamicum* и *E.coli*.** Для разрушение клеток *C.glutamicum* ультразвуком требуется длительная обработка, что приводит к частичной денатурации ферментов и часто дает ошибочные результаты, касающиеся аллостерических свойств. Мы нашли, что наиболее эффективным способом пермеабилзации клеток является обработка антибиотиком грамицидином С. Пермеабилзация происходит практически мгновенно, при этом ферменты полностью сохраняют свойства.

Эффективный метод пермеабилзации клеток *E.coli* с целью их использования в качестве катализатора в реакциях биотрансформации предложен и апробирован при трансформации глутамата в гамма-аминомасляную кислоту под действием глутаматдекарбоксилазы. Метод основан на нарушении барьера проницаемости клеток *E.coli* при нагревании до 50 – 60<sup>0</sup>С. Выращенные клетки, в которых экспрессирован ген *gadA* (глутаматдекарбоксилаза), хранились в замороженном виде и перед проведением биотрансформации оттаивались и прогревались при 53<sup>0</sup>С. 1 г сырого веса клеток продуцировал 23 г ГАМК с выходом 99% теоретического.

3. **Механизм продукции фенилаланина ауксотрофными по тирозину мутантами *C.glutamicum*.** Механизм продукции фенилаланина не имел непротиворечивого объяснения, поскольку не учитывался особый, присущий ГПКБ, арогенатный путь биосинтеза. Полученные нами тирозиновые ауксотрофы также накапливали фенилаланин в периодической культуре без поддержания рН, однако при поддержании рН ферментационной среды выше 7 происходило накопление не фенилаланина, а непосредственного предшественника тирозина – арогената и общего предшественника фенилаланина и тирозина - префената. Арогенат при снижении рН превращался в фенилаланин, а префенат – в фенилпируват, предшественник фенилаланина. Продукция арогената вызвана освобождением ДАГФ-синтазы от ретроингибирования в условиях голодания по тирозину, что усиливает поток углерода в направлении префената и арогената. Последний не может превратиться в тирозин (блокирована стадия превращения арогената в тирозин) и выделяется в среду. Таким образом, продукция фенилаланина происходит без участия ферментов пути биосинтеза фенилаланина из префената.

**4. Механизм продукции фенилаланина ауксотрофными мутантами, нуждающимися одновременно в тирозине и фенилаланине.** Несмотря на блокирование фермента, необходимого для превращения префената в фенилаланин, эти двойные мутанты накапливали фенилаланин в периодической культуре, но при поддержании рН среды (7,0 – 7,5) происходит накопление арогената. Голодание по тирозину и фенилаланину освобождает ДАГФ-синтазу от ингибирования, усиливая поток углерода в направлении арогенату, который экскретируется. Последний неферментативно превращается в фенилаланин при подкислении среды.

**5. Механизм продукции фенилаланина прототрофными мутантами, устойчивые к аналогу фенилаланина (мета-фторфенилаланин).** Механизм продукции аналогичен таковому у двойных  $\text{Tyr}^- \text{Phe}^-$  мутантов. Но в отличие от них освобождение ДАГФ-синтазы от ингибирования конечными продуктами обусловлено мутацией в гене, кодирующем этот фермент.

**6. Механизм продукции фенилаланина тирозин-недостаточными мутантами, устойчивые к аналогу фенилаланина (мета-фторфенилаланин).** Среди таких мутантов, наибольшая продукция фенилаланина обнаружена у штамм 6-27, у которого выявлена десенсбилизация двух ферментов: ДАГФ-синтазы и первого фермента в пути превращения префената в фенилаланин – префенатдегидратазы. Продукция фенилаланина этим штаммом происходит ферментативно и внутриклеточно без накопления арогената. Десенсбилизированная префенатдегидратаза перенаправляет пул префената на синтез фенилаланина, препятствуя превращению префената в арогенат. Мутация, вызвавшая десенсбилизацию префенатдегидратазы (ген *pheA*) к ингибированию фенилаланином (*Ser235Pro*), находится в выявленном нами регуляторном домене АСТ, который ранее обнаружен в некоторых белках, чувствительных к ретроингибированию.

**7. Деградация фенилаланина клетками *S. glutamicum* ATCC 13032.** С помощью меченого изотопом  $^{14}\text{C}$  фенилаланина обнаружена способность клеток *S. glutamicum* деградировать фенилаланин с образованием ароматического вещества неустановленной природы. Для деградация фенилаланина необходима арогенатдегидратаза, поскольку блокирование этого фермента приводит к неспособности к деградация. Учитывая, что арогенатдегидратаза обладает декарбоксилазной активностью в отношении арогената, то вероятным продуктом деградация фенилаланина клетками *S. glutamicum* под действием этого фермента является фенилэтиламин.

**8. Возможное использование результатов исследования механизмов продукции фенилаланина ГПКБ.** Полученные данные указывают на новую возможность создания продуцентов фенилаланина на основе *S. glutamicum* с использованием арогенатного пути биосинтеза тирозина. Блокирование арогенатдегидратазы приводит к прекращению деградация фенилаланина и накоплению арогената. При рН-статировании среды в нейтральной области, чтобы избежать превращения арогената в



фенилаланин, можно ожидать высокого уровня накопления арогената, который не вызывает торможения реакций пути биосинтеза ароматических аминокислот, не являясь конечным продуктом, и поэтому можно использовать неизмененные ферменты дикого типа, увеличив экспрессию соответствующих генов. После окончания процесса накопления арогената следует снизить рН среды для неферментативного превращения арогената в фенилаланин.

**9. Устранение деградации треонина с участием треониндегидрогеназы у продуцентов треонина на основе *E. coli*.** После создания с участием автора высокоэффективных продуцентов треонина с использованием методов геной инженерии, в ферментационных средах обнаружен в значительных концентрациях продукт деградации треонина – аминокетон. Это свидетельствовало о функционировании пути деградации треонина, в котором первую реакцию катализирует фермент треониндегидрогеназа. Для блокирования этого фермента был создан штамм, нуждающийся в глицине, способный к росту на треонине вместо глицина, который является одним из конечных продуктов деградации треонина. С использованием транспозонного мутагенеза (транспозон Tn5) получен мутант, не способный усваивать треонин как источник глицина, у которого отсутствовала активность треониндегидрогеназы в результате инсерции Tn5 в ген, ее кодирующий. Генетический перенос этой инсерции в хромосому продуцентов треонина обусловил повышение уровня продукции треонина на 30%. Штаммы-продуценты треонина с инактивацией гена, кодирующего треониндегидрогеназу, защищены патентами в России и за рубежом и используются в промышленном производстве треонина.

**10. Установлено положение гена *tdh* (конъюгация, общая трансдукция), кодирующего треониндегидрогеназу, на генетической карте *E. coli* K12 (81-ая минута карты).**

**11. Участие серинтрансгидрокси метилазы в деградации треонина.** Установлено, что серинтрансгидрокси метилаза (ген *glyA*) катализирует треонинальдолазную реакцию с образованием глицина и уксусного альдегида.

**12. Оценка роли ферментов, участвующих в деградации треонина клетками *E. coli*.** Показано участие трех ферментов – треониндезаминазы (*ilvA*), треониндегидрогеназы (*tdh*) и серинтрансгидрокси метилазы (*glyA*) в поглощении треонина из среды роста. Наибольший вклад в этот процесс вносит треониндезаминаза, метаболизируя треонин в количестве, значительно превышающем необходимое для синтеза изолейцина, что указывает на нецелевое превращение предшественника изолейцина, альфа-кетобутирата. Вклад треониндегидрогеназного и серинтрансгидрокси метила пути в потребление треонина приблизительно равный.

**13. Возможное использование результатов исследования деградации треонина клетками *E. coli*.**

- Если результаты исследования по деградации треонина с участием треониндегидрогеназы немедленно нашли применение при конструировании продуцентов треонина, то данные об участии серинтрансгидроксиметилазы в этом процессе пока не используются на практике. Это связано с тем, что блокирование активности этого фермента приводит к необходимости введения в среду роста глицина, а также снижает уровень образования C1-соединений, замедляющее скорость роста клеток и процесс биосинтеза треонина. Тем не менее, представляется перспективным снижение активности данного фермента до уровня, при котором сохраняется достаточный синтез C1-соединений при снижении уровня деградации треонина.

- У современных продуцентов треонина отсутствует мутация в гене *ilvA*, блокирующая треониндезаминазу. Учитывая наши данные об относительно высоком вкладе треониндезаминазы в деградацию треонина, что однако не приводит к сверхсинтезу изолейцина, считаем целесообразным исследование возможности снижения избыточной активности треониндезаминазы до уровня, при котором сохраняется достаточная активность для синтеза изолейцина.

**13. Механизм продукции альфа-гидроксиглутаровой (2-ГГ) кислоты в качестве примеси при продукции цистеина продуцентами на основе E.coli.** В культуральной жидкости продуцентов цистеина нами обнаружено накопление значительного количества альфа-гидроксиглутаровой кислоты (2-ГГ), которая по литературным данным образуется из альфа-кетоглутаровой (2-КГ) в побочной реакции, катализируемой первым ферментом пути биосинтеза серина 3-фосфоглицератдегидрогеназы. Сопоставление констант Михаэлиса для субстратов и продуктов реакции с их внутриклеточными концентрациями привело к следующему выводу. Поскольку фермент обладает необычайно высоким сродством к восстановленной форме кофактора, NADH ( $K_m$  менее 10 нМ), то вместо диссоциации комплекса E-NADH происходит восстановление 2-КГ до 2-ГГ за счет окисления NADH до  $NAD^+$ . После этого комплекс E- $NAD^+$  способен окислить свой главный субстрат, 3-фосфоглицерат, с образованием интермедиата серинового пути, 3-фосфогидроксипирувата. В результате вновь образуется недиссоциирующий комплекс E-NADH, и цикл повторяется. Таким образом, окисление главного субстрата происходит за счет восстановления 2-КГ с образованием 2-ГГ, и продукция 2-ГГ происходит эквимолярно по отношению к потоку предшественников серина и цистеина. 3-фосфоглицератдегидрогеназа в E.coli является не дегидрогеназой, а трансгидрогеназой, переносящей гидрид-ион от субстрата прямой реакции на 2-КГ. NAD выполняет роль переносчика гидрид-иона, будучи постоянно связанным с белком-ферментом.

**14. Рекомендации, вытекающие из анализа механизма реакции 3-фосфоглицератдегидрогеназы в E.coli.** При создании продуцентов серина, а также цистеина, триптофана, нуклеиновых оснований на основе кишечной

палочки и, видимо, других энтеробактерий побочная продукция 2-ГГ неизбежна. Для её устранения целесообразно использовать чужеродные бактериальные гены *serA*, кодирующие данный фермент, не продуцирующий 2-ГГ. К таковым относится, ген *serA* из, например, *S.glutamicum*. Альтернативой этому подходу является обнаружение и усиление метаболического пути усвоения 2-ГГ в клетках самой *E.coli*.

**15. Десенсбилизация О-серинацетилтрансферазы (ОАС) к ингибированию цистеином для создания продуцента цистеина на основе E.coli.** Для введения мутаций, нарушающих конкурентное ингибирование цистеином, на основании рентгеноструктурного исследования ОАС с помощью компьютерного моделирования получена модель сайта фермента, связывающего серин (субстрат) и цистеин (ингибитор). Найден аминокислотный остаток белка ( Asp92 ), образующий водородную связь с цистеином, но не с серином. В петлю, его содержащую, с помощью сайт-специфического мутагенеза введены случайные аминокислотные замены, меняющие расстояние от Asp92 до цистеина. Отобраны мутанты, сохранившие каталитическую активность, но утратившие чувствительность к ингибированию цистеином. На основе полученных мутантов сконструированы эффективные продуценты цистеина, нашедшие применение в производстве цистеина, защищенные патентом Российской Федерации, а также зарубежными патентами.

**16. Механизм восстановления S-сульфоцистеин до цистеина в E.coli.** Обнаружено, что продуценты цистеина при использовании тиосульфата в качестве источника серы помимо целевого продукта накапливают S-сульфоцистеин (предшественник цистеина в пути превращения О-ацетилсерина в цистеин). Показано, что восстановление этого вещества до цистеина происходит с помощью глутатиона и ферментативно с участием нескольких глутаредоксинов, причем наибольший вклад (около 60%) вносит глутаредоксин С (ген *grxC*). Повышенная экспрессия гена *grxC*, помещенного под контроль сильного промотора, снижает накопление S-сульфоцистеина и повышает уровень продукции цистеина продуцентами этой аминокислоты (патент РФ 2458981).

**17. Транспорт S-сульфоцистеина в клетки E.coli.** Делеция неаннотированной рамки считывания *udjN* приводит к неспособности *E.coli* *cysE* расти на S-сульфоцистеине в качестве источника цистеина. Соответствующий белок содержит 8 трансмембранных доменов и, по-видимому, является белком-транспортёром серусодержащих соединений. Плазмидная амплификация гена *udjN* приводит к усилению поглощения клетками экзогенного цистина и S-сульфоцистеина (но не цистеина), тогда как делеция этого гена наоборот резко снижает транспорт этих аминокислот в клетки. Обсуждается участие транспортера *YdjN* в процессе продукции цистеина.

**18. Транспорт О-ацетилсерина в клетки E.coli.** Непосредственный предшественник цистеина – О-ацетилсерин накапливается в среде при

продукции цистеина. Исследование по поиску импортеров О-ацетилсерина привело к обнаружению белка YdgR, способствующего поглощению О-ацетилсерина клетками *E.coli*. Белок в своей структуре содержит 12-13 трансмембранных доменов и является родственным широко распространенным в про- и эукариотах протон-зависимым транспортером ди- и трипептидов. Однако способность такого рода транспортеров импортировать О-ацетилсерина ранее не отмечалась.

Основные результаты, представленные в диссертации, изложены автором в следующих печатных работах.

1. Огороков А.Л., Буканов Н.О., Бескровная О.Ю., Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Грищенко В.Г., Янковский Н.К., Дебабов В.Г. Конструирование новых векторов для глутамат-продуцирующих бактерий. // Генетика, 1990, Т. 26 (4), С. 648-656.
2. Передельчук М.Ю., Буканов Н.О., Смирнов Ю.В., Ростова Ю.В., Федорова Н.Д., Огороков А.Л., Гусятинер М.М., Янковский Н.К. Клонирование генов *asd* и *lysC* *Comyebacterium glutamicum*// Мол.генетика, микробиол. вирусол, 1992, N5-6, С.25-27.
3. Ростова Ю.Г., Передельчук М.Ю., Огороков А.Л., Гусятинер М.М., Дебабов В.Г. Конструирование челночного вектора для коринебактерий и *E.coli*. Клонирование и изучение экспрессии гена *lysC*//Биотехнология. 1993. N4. с. 14-17.
4. Гусятинер М.М. Калужский В.Е., Ямпольская Т.А. и др. Способ получения гамма-аминомасляной кислоты// Патент Российской Федерации. №2143002
5. Plokhov A.Y., Gusyatiner M.M., Yampolskaya T.A. et al. Preparation of  $\gamma$ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V.88. pp. 257–265
6. Тюрин М.В., Ворошилова Э.Б., Ростова Ю.Г., Опарина Н.Ю., Гусятинер М.М. Электрический ответ внутренних мембранных структур клеток коринебактерий при электротрансформации. // Микробиология, 1998, Т. 67 (3), С. 338-344.
7. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Жданова Н.И., Нестеренко П.Н., Дегтярь В.Г. Бачина Т.А. Механизм продукции фенилаланина тирозиновыми ауксотрофами *S.glutamicum* //Биотехнология. 1989. т.5. №2. с.137-141.
8. Ростова Ю.Г. Ворошилова Э.Б., Якубович Н.В, Гусятинер М.М., Клонирование гена *pheA*, кодирующего нечувствительную к ингибированию фенилаланином префенатдегидратазу *S.glutamicum* //Биотехнология. 1990. №1. с.9-11

9. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Жданова Н.И. Селекция и свойства продуцентов фенилаланина – мутантов штамма *C.glutamicum* АТСС 13032// Биотехнология. 1991.№1. с.15-19
10. Огороков А.Л., Буканов Н.О., Бескровная О.Ю., Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Грищенко В.Г., Янковский Н.К., Дебабов В.Г. Конструирование новых векторов для глутамат-продуцирующих бактерий. // Генетика, 1990, Т. 26. №4, С. 648-656.
11. Толмачев О.Э., Гусятинер М.М. Потенциальные векторы для молекулярного клонирования в *Brevibacterium flavum*// Мол. ген. микробиол. вирусол. 1991. №11. с. 3- 8.
12. Толмачев О.Э., Ивановская Л.В., Гусятинер М.М. Получение мутаций в генах аспартаткиназы *Corynebacterium glutamicum* с использованием космидного вектора и специфического фагоустойчивого мутанта *Brevibacterium flavum* // М.: Генетика. – 1993. – т. 29, № 8.
13. Шакалис И.О., Гусятинер М.М., Жданова Н.И. Генетическое картирование индуцированной транспозоном Tn5 мутации, блокирующей треониндегидрогеназу у *Escherichia coli* К-12 // Генетика. 1986. Т. XXIII. №12. С.2120-2127.
14. Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Локализация гена *tdh*, кодирующего треониндегидрогеназу, на генетической карте *E.coli* К-12// Биотехнология. 1987. Т.3. №5. с.564
15. Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Треонинальдольная активность в клетках *E.coli* К-12: отсутствие активности у мутантов *GlyA* // Биотехнология. 1989. т.5. №2. С.155-156.
16. Шакалис И.О., Гусятинер М.М. Участие треониндегидрогеназы, треониндезаминазы и серинтрансгидроксиметилазы в деградации треонина в клетках *E.coli* К-12//Биотехнология. 1990. №2. с.16-17.
17. Гусятинер М.М. и др. Штамм бактерии *E.coli* ВКПМ В-3420 – продуцент L-треонина // Авт. св. СССР №1362021. 1986.
18. Дебабов В.Г. и др. Штамм бактерии *E.coli* – продуцент L-треонина // Авт. св. СССР №1694643, 1987.
19. Debabov et al. Bacterial strain of *Escherichia coli* ВКПМ В-3996 as a producer of threonine // United States patents: № 5,175,107. 1992.
20. Debabov , et al. L-threonine-producing microbacteria and a method for the production of L-threonine. United States Patent. 6,132,999. 2000
21. Debabov, et al. Bacterial strain of *Escherichia coli* ВКПМ В-3996 as the producer of L-threonine. United States Patent. 6,165,756. 2000
22. Kai Y, Kashiwagi T, Ishikawa K, Ziyatdinov MK, Gusyatiner M.M., Redkina EI, Kiriukhin MY, Kobayashi S, Takagi H, Suzuki E. Engineering of *Escherichia coli* L-serine O-acetyltransferase on the basis of crystal structure: desensitization to feedback inhibition by L-cysteine. *Protein Eng Des Sel.* 2006. 19(4):163-7
23. M. M. Gusyatiner, M. Kh. Ziyatdinov. 2-Hydroxyglutarate production is necessary for the reaction catalyzed by 3-phosphoglycerate dehydrogenase

- in *Escherichia coli*. Review Journal of Chemistry. 2015, Volume 5, Issue 1, pp 21–29
24. Касиваги Т., Каи Ю. Исикава К, Сузуки Э., Такаги Х., Зиятдинов М.Х., Редькина Е.И., Гусятинер М.М. Мутантная серинацетилтрансфераза. Патент России 2279477 (2003). Европейский патент EP 1650296
25. Kashiwagi , et al. Mutant serine acetyltransferase. United States Patent. 7312058. 2007.
26. Kashiwagi , et al. Mutant serine acetyltransferase and process for producing cysteine. European patent 1650296. 2012
27. Зиятдинов М.Х., Самсонов В.В., Гусятинер М.М. Способ получения цистеина, цистина, S-сульфоцистеина или тиазолидинового производного цистеина, или их смеси с использованием бактерий семейства Enterobacteriaceae. Патент России 2458982. 2012
28. Зиятдинов М.Х., Самсонов В.В., Гусятинер М.М. Способ получения цистеина с использованием бактерий семейства Enterobacteriaceae. Патент России 2458981. 2010.
29. Ziyatdinov M.K. Samsonov V.V., Gusyatiner M.M. A method for producing an L-cysteine, L-cystine, a derivative or precursor thereof or a mixture thereof using a bacterium of Enterobacteriaceae family. European patent 2486123. 2016