

Биолог. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 579.66:578.81:579.871.8

ԳԼՅՈՒՏԱՄԱՏ ԴԵԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ ԳԵՆԻ ԲԱԶՍԱՊԱՏԿԱՄԱՆ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* C-25 ՇՏԱՄԻ՝
ՍԵՐԻՆԻ ԳԵՐԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Յ.Յ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ

ՓԲԸ «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ», 375056, Երևան

Կառուցվել է pVOG10 պլազմիդը, որը պարունակում է *Corynebacterium glutamicum*-ի գլյուտամատ դեհիդրոգենազը կոդավորող *gdh* գենը: pVOG10 պլազմիդի օգտագործմամբ ստացվել են սերին արտադրող *C. glutamicum* C-25 շտամի տրանսֆորմանտներ: C-25/pVOG10 տրանսֆորմանտների սերինի արտադրությունը բարձր է, քան ելային C-25 շտամինը: Վիտամինների՝ պիրիդօքսինի, ֆոլաթթվի և պանտոտենաթթվի, ինչպես նաև պիրուվատի ավելացումը բարձրացնում է սերինի արտադրությունը անկախ pVOG10 պլազմիդի առկայությունից: Ֆերմենտացիոն միջավայրում ազոտի կոնցենտրացրայի բարձրացումը դանդաղեցնում է բջիջների աճը և իջեցնում սերինի արտադրությունը C-25 շտամի դեպքում, սակայն չի ազդում C-25/pVOG10 շտամի սերինի արտադրության վրա:

Сконструирована плазмида pVOG10, содержащая ген *gdh*, кодирующий глутамат дегидрогеназу *Corynebacterium glutamicum*. С использованием плазмиды pVOG10 получены трансформанты штамма продуцента серина *C. glutamicum* C-25. Продукция серина у трансформантов C-25/pVOG10 выше, чем у исходного штамма C-25. Добавление витаминов — пиридоксина, фолиевой и пантотеновой кислот, а также пирувата увеличивает продукцию серина независимо от присутствия плазмиды pVOG10. Повышение концентрации азота в ферментационной среде замедляет рост культуры и снижает продукцию серина у штамма C-25, но не действует на рост и продукцию серина штамма C-25/pVOG10.

The plasmid containing *gdh* gene encoding of *Corynebacterium glutamicum* glutamate dehydrogenase has been constructed. Transformants of *C. glutamicum* C-25 strain producer of serine have been obtained with plasmid pVOG10. The level of serine production with transformants *C. glutamicum* C-25/pVOG10 is higher than with the parental strain C-25. The serine production increases by addition of vitamins such as pyridoxine, folic acid, pantothenic acid as well as with addition of pyruvic acid independent of the plasmid presence. With the increasing of the nitrogen concentration in fermentation medium the growth of C-25 strain become slower and level of serine production decreases but it doesn't influence the growth and serine production of C-25/pVOG10.

C. glutamicum - գլյուտամատ դեհիդրոգենազ - սերին

Լ-ամինաթթուները ունեն շատ լայն կիրառություն, օրինակ, որպես սննդային և կերային հավելումներ [9], ֆեմիլալանինը և ասպարազինաթթուն օգտագործվում են արհեստական քաղցրացնող նյութերի ստացման համար, շատ այլ ամինաթթուներ ծառայում են որպես թերապևտիկ ազդեցություն սննդային և մետաբոլիկ խանգարումների դեպքում, կամ որպես հումք կոսմետիկայի, ատամի մածուկի և լվացող միջոցների արտադրության համար [11]:

Ամինաթթուների արդյունաբերական ստացման համար օգտագործվող առավել տարածված բակտերիաները պատկանում են կորինեֆորմ բակտերիաների *Corynebacterium-Brevibacterium* խմբերին [11]: *Corynebacterium* տեսակները գրամ-դրական, անկանոն ձևի, սպոր չառաջացնող, օբլիգատ աերոբ բակտերիաներ են, որոնց հիման վրա ստեղծվել են ամինաթթուների գերարտադրիչ շտամեր, օրինակ, գլյուտամինաթթվի, լիզինի, տրեոնինի, տրիպտոֆանի, ֆենիլալանինի [11]: Ընդունված է ֆերմենտացիայի միջոցով L-սերինի արտադրության մի մեթոդ, որում օգտագործվում է բակտերիալ շտամ, որն ընդունակ է գլիցինը և շաքարը վերափոխելու L-սերինի [7]: Մեկ այլ մեթոդ, որի միջոցով կարելի է ստանալ L-սերին ուղղակիորեն շաքարից սելեկցիոն մեթոդն է, որի միջոցով հաջողվել է ստանալ սերինի 15.4 գ/լ արտադրողականությամբ շտամ, իսկ գենային ինժեներական մեթոդով, որով կլոնավորվել են սերինի սինթեզի հանգուցային էնզիմների գեները՝ 35.2 գ/լ սերին արտադրող շտամ [7]: Ամինաթթուների սինթեզում, մասնավորապես նաև սերինի սինթեզում, ամին խմբի դոնոր է հանդիսանում գլյուտամինաթթուն [10]: *C. glutamicum*-ը ունի երկու անաբոլիկ ուղի գլյուտամինաթթվի սինթեզի համար՝ գլյուտամատ դեհիդրոգենազը (GDH) և գլյուտամին սինթետազ/գլյուտամատ սինթազը (GS/GOGAT), որոնք ներկայացնում են ամոնիումի ասիմիլյացիայի երկու գլխավոր ուղիները [4]: GDH-ի կենսաքիմիական հատկությունները և L-գլյուտամինաթթվի արտադրության վրա նրա ազդեցությունը ուսումնասիրված է *B. flavum*-ի համար [4]: *C. glutamicum*-ի GDH-ը ՆԱԴՖ կախյալ է [2]: Անկախ բջիջներին ազոտի մատակարարումից գրանցվել է GDH-ի բարձր ակտիվություն՝ 1.8-ից 2.5 միավոր/մգ պրոտեին *C. glutamicum*-ի վայրի տիպի շտամի համար [4]: GS-ի կարևորությունն ընդգծվում է մետաբոլիկ հոսքերի չափմամբ, որը ցույց է տալիս, որ ամոնիումի 28%-ը ասիմիլացվում է GS-ով, մույնիսկ ազոտի ավելցուկային պայմաններում [4]: In vitro էնզիմային փորձերով և in vivo հոսքային չափումներով GOGAT ակտիվություն չի դիտվել, երբ բջիջները աճեցվել են ազոտի ավելցուկային պայմաններում [4]: GOGAT-ը չունի կարևոր դեր *C. glutamicum*-ում այնքան, որքան *E. coli*-ում կամ *B. subtilis*-ում [4]:

Չնայած գլյուտամատ դեհիդրոգենազի կարևոր դերին գլյուտամինաթթվի սինթեզի գործում, իսկ գլյուտամինաթթուն հանդիսանում է ամին խմբի դոնոր այլ ամինաթթուների սինթեզի համար *C. glutamicum*-ում այդ թվում և սերինի, նրա դերը ամինաթթուների գերարտադրության գործընթացում չի ուսումնասիրված, բացի գլյուտամինաթթվի գերարտադրության գործընթացից: Տվյալ աշխատանքի նպատակ է հանդիսացել ուսումնասիրել գլյուտամատ դեհիդրոգենազի գենի *gdh*-ի դերը սերինի գերարտադրման գործում *C. glutamicum*-ում: Այդ նպատակով կատարվել է *gdh* գենի բազմապատկում *C. glutamicum*-ի սերին արտադրող շտամում:

Լյուր և մեթոդ: Փորձերում օգտագործված շտամերը և պլազմիդները ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Միջավայրեր: *E. coli*-ի համար օգտագործվել են LB և LA միջավայրեր: *E. coli* բակտերիաները աճեցվել են 37° պայմաններում: LB միջավայր - 1% տրիպտոն, 1% NaCl, 0.5% խմորասնկային էքստրակտ, pH 7.5: LA պինդ միջավայր պատրաստելու համար LB միջավայրին ավելացվել է 1.2%-ի չափով ազար: *C. glutamicum*-ի համար օգտագործվել են ՄՊԲ և ՄՊԱ միջավայրեր: *C. glutamicum* բակտերիաները աճեցվել են 30° պայմաններում: ՄՊԱ-ի պատրաստման համար ՄՊԲ-ին ավելացվել է 1.5%-ի չափով ազար:

Աղյուսակ 1. Շտամեր և պլազմիդներ, նրանց հատկությունները

Շտամեր	Պլազմիդներ	Գենոտիպ	Աղբյուր
<i>C. glutamicum</i> C-25		Պրոտոտրոֆ Sm ^r	Կենսատեխնոլոգիայի ինստիտուտի հավաքածու
<i>E. coli</i> DH5α		supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1	[6]
	pKK223-3	TacP, Ap ^r	[3]
	pEK0	Սաքրոբային վեկտոր, Km ^r	[6]
	pVOG10	pEK0, <i>gdh</i>	Կառուցվել է այս աշխատանքում

Ֆերմենտացիոն միջավայր: Ֆերմենտացիան կատարվել է 72 ժամվա ընթացքում, քափահարելով 30° ջերմաստիճանի պայմաններում: 0.5 լ տարողությամբ կլեբներում լցվել է 15 մլ սննդամիջավայր: Օգտագործվել է սերինի արտադրիչ շտամերի ֆերմենտացիայի համար նախատեսված Ֆ1 միջավայրը սախարոզ - 10%, (NH₄)₂SO₄ - 3%, K₂HPO₄ - 0.02%, NaH₂PO₄ - 0.03%, կավիճ - 5%, MgSO₄ - 0.05%, ZnSO₄ - 0.001%, բիոտին - 0.5 մգ/լ, քիամին - 0.5 մգ/լ, ստրեպտոմիցին - 200 մգ/լ: Անհրաժեշտության դեպքում ավելացվում է պիրուվատ - 0.5%, 1%, 1.5%, պիրիդոքսին - 1 մգ/լ, ֆոլաթթու - 1.5 մգ/լ, պանտոտենաթթու - 5 մգ/լ, ք-ամինաբենզոյաթթու - 1 մգ/լ:

Սերինի, սախարոզի և ամոնիումի սուլֆատի մնացորդային քանակների որոշումը կուլտուրալ հեղուկում: Սերինի քանակի որոշումը կատարվել է բարակաշերտ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով: Օգտագործվել են Silusol ընկերության՝ բարակաշերտ քրոմատոգրաֆիայի թիթեղներ: Որոշումը կատարվել է ըստ ընկերության ներկայացրած արձանագրության:

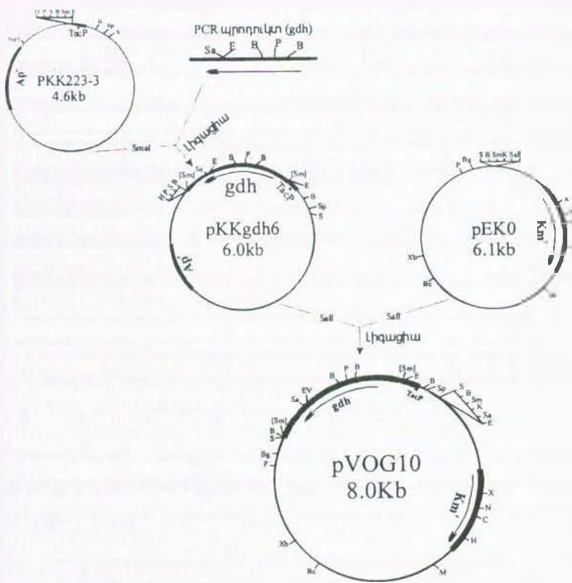
Ֆերմենտացիայից հետո ամոնիումի սուլֆատի և սախարոզի մնացորդային քանակությունները որոշվել են ըստ հայտնի մեթոդների [1]:

Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատում և տրանսֆորմացիա: Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատումը *E. coli*-ից և *C. glutamicum*-ից, ինչպես նաև *E. coli*-ի բջիջների տրանսֆորմացիան կատարվել են հայտնի մեթոդներով [12], իսկ *C. glutamicum*-ի տրանսֆորմացիան կատարվել է էլեկտրապորացիայի մեթոդով [5]:

Քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատում *C. glutamicum*-ից: Քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի անջատումը կորիներակտերիաներից կատարվել է նախկինում նկարագրված մեթոդով [12]:

PCR: PCR-ը կատարվել է հայտնի մեթոդով [12]: Օգտագործվել է Takara ընկերության Taq Premix, որը պարունակում է Taq ԴՆԹ պոլիմերազ և դեզօքսիռիբոնուկլեոտիդեֆոսֆատների խառնուրդ: PCR-ը կատարվել է 50 μl ծավալում, համաձայն ընկերության ներկայացրած արձանագրության:

pVOG10 պլազմիդի կառուցումը: Կլոնավորման համար օգտագործվող բոլոր էնզիմները, բացի Taq ԴՆԹ պոլիմերազից, Sigma ընկերության արտադրանքն են և բոլոր այդ էնզիմային ռեակցիաները իրականացվել են Sigma ընկերության ներկայացրած արձանագրության համաձայն: pVOG10 պլազմիդը կառուցվել է նկար 1-ում ներկայացված սխեմայով: Կատարվել է PCR, որի միջոցով բազմապատկվել է *gdh* գենի 1385 bp երկարությամբ հատված: Այդ հատվածի բազմապատկման համար ուղիղ պրայմեր է հանդիսացել 5'-TCGTGCGCGCATGCGACCCGAGAT-3-ը, որը կոմպլեմենտար է *gdh* գենի սկզբնական կոդոնից հաշված -38-ից -16 հատվածին, իսկ հակադարձ պրայմեր է հանդիսացել 5'-GGTCTTAGATGACGCCCTGTGCCAGC-3-ը, որը կոմպլեմենտար է *gdh* գենի ստոպ կոդոնից հաշված -14-ից մինչև ստոպ կոդոն +9 հատվածին [2]: PCR հատվածի ծայրերը բթացվել են T4 ֆագի ԴՆԹ պոլիմերազով, ապա հատվածը մշակվել է T4 ֆագի ԴՆԹ կինազով: pKK223-3 վեկտորը ռեստրիկցիայի է ենթարկվել SmaI էնդոնուկլեազով, ապա մշակվել հորթի աղիքային ֆոսֆատազով դեֆոսֆորիլացման համար: Լիզացիան կատարվել է T4 ֆագի ԴՆԹ լիզազով 10 ml ծավալում: Կատարվել է ընտրություն ամպիցիլինով LA միջավայրի վրա, ապա՝ սկրինինգ և առանձնացվել 6000 bp մեծությամբ պլազմիդով զաղուք: Պլազմիդն անվանվել է pKKgdh6: Ստացված pKKgdh6 պլազմիդը ռեստրիկցվել է SalI էնդոնուկլեազով: Նույն էնդոնուկլեազով ռեստրիկցվել է նաև pEK0 վեկտորը: Սրանց խառնուրդը ենթարկվել է լիզացիայի: Լիզացիոն խառնուրդով կատարվել է *E. coli* DH5α-ի տրանսֆորմացիա: Տրանսֆորմանտներն ընտրվել են կամամիցինով LA միջավայրի վրա, որոնցից սկրինինգի միջոցով առանձնացվել է ~ 8000 bp չափս ունեցող պլազմիդով զաղուք: Այս պլազմիդը կոչվել է pVOG10:



Նկ. 1. pVOG10 պլազմիդի կառուցման սխեմա: *gdh*-գլյուտամատ դեհիդրոգենազի գեն, TacP-պրոմոտոր, Km^r-կանամիցինի ճկատմամբ կայունության գեն, Apr-ամպիցիլինի ճկատմամբ կայունության գեն:

թյունը տվյալ շտամի սերինի գերսինթեզի ունակության վրա: Տրանսֆորմանտներն ընտրվել են կանամիցինով ՄՊԱ միջավայրի վրա: *C. glutamicum*-ի տրանսֆորմանտներից ստացված ԴՆԹ-ի չափսը համապատասխանում է pVOG10-ին: *C. glutamicum*-ից անջատված պլազմիդային ԴՆԹ-ն ռեստրիկցիոն քարտեզով և հատկություններով նման է ելային պլազմիդին: Տրանսֆորմանտներն են C-25/pEK0-ը և C-25/pVOG10-ը:

C-25, C-25/pEK0 և C-25/pVOG10 շտամերի հատկությունները ածխածնի և ազոտի աղբյուրների տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում: Կատարվել է *C. glutamicum* C-25, C-25/pEK0 և C-25/pVOG10 շտամերի ֆերմենտացիա $\Phi 1$, $\Phi 1 + 3\%$ սախարոզ պարունակող, $\Phi 1 + 3\%$ սախարոզ + 1.5% ամոնիումի սուլֆատ պարունակող և 1% պիրուվատ պարունակող միջավայրերով: Համեմատվել է նրանց՝ սերին արտադրելու ակտիվությունը, կուլտուրալ հեղուկի օպտիկական խտությունը, սախարոզի և ամոնիումի սուլֆատի մնացորդային քանակությունները: Տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 2-ում: Բոլոր աղյուսակների տվյալները միջինացված են երեք փորձերից:

Բոլոր չորս միջավայրերում C-25/pVOG10 շտամի սերին արտադրող ակտիվությունը ավելի բարձր է C-25 և C-25/pEK0 շտամերի սերին արտադրող ակտիվությունից: Սախարոզի քանակի մեծացումը չի ավելացնում սերինի արտադրողականությունը, այսինքն սախարոզի համար օպտիմալ կոնցենտրացիա է 10% -ը, իսկ սախարոզի և ամոնիումի սուլֆատի քանակների միաժամանակյա մեծացման դեպքում իջնում է C-25 և C-25/pEK0 շտամերի աճի տեմպը և սերին արտադրելու ունակությունը, սակայն C-25/pVOG10 շտամի սերին արտադրելու ունակությունը մնում է այնպիսին, ինչպիսին $\Phi 1$ միջավայրում է: Այսինքն կարելի է ենթադրել, որ C-25/pVOG10 շտամը ավելի դիմացկուն է ազոտի բարձր պարունակության հանդեպ: Հետաքրքիր է, որ ֆերմենտացիոն միջավայրին

Արդյունքներ և քննարկում: *C. glutamicum* C-25/pVOG10 տրանսֆորմանտների ստացումը: pVOG10 պլազմիդը պարունակում է *gdh* գենի կոդավորող հատվածը առանց սեփական պրոմոտորի: *gdh* գենի այս կոդավորող հատվածը գտնվում է TacP պրոմոտորի ներքո, որն արհեստական պրոմոտոր է, և հայտնի է, որ այն տրանսկրիպցիայի է ենթարկվում *C. glutamicum*-ի բջիջներում [6]: Կատարվել է *C. glutamicum* C-25 շտամի տրանսֆորմացիա pVOG10 պլազմիդով, և ուսումնասիրվել է այդ գենի դոզայի մեծացման ազդեցու-

1% կոնցենտրացիայով պիրուվատ ավելացնելու դեպքում բարձրանում է բոլոր երեք շտամերի սերին արտադրելու ակտիվությունը և OD_{600} -ը: Դա կարելի է բացատրել նրանով, որ պիրուվատը կարող է հանդիսանալ սերինի սինթեզի նախանյութ [10]:

Աղյուսակ 2. $\$1$, $\$1 + 3\%$ սախարոզ պարունակող, $\$1 + 3\%$ սախարոզ + $1.5\% (NH_4)_2SO_4$ և $\$1 + 1\%$ պիրուվատ պարունակող միջավայրերով կատարված ֆերմենտացիայի արդյունքները

Շտամ	Միջավայրեր	Սերին, գ/լ	Սախարոզ, %	$(NH_4)_2SO_4$, %	OD_{600}
C-25	$\$1$	10	0	1.24	0.23
	$\$1$, 13% սախարոզ	10	3.6	1.3	0.17
	$\$1$, 13% սախարոզ, 4.5% $(NH_4)_2SO_4$	9	3.78	3	0.12
	$\$1$, 1% պիրուվատ	12	0.86	1.2	0.3
C-25/pEK0	$\$1$	10	0	1.25	0.24
	$\$1$, 13% սախարոզ	10	3.6	1.3	0.16
	$\$1$, 13% սախարոզ, 4.5% $(NH_4)_2SO_4$	9	3.77	3	0.13
	$\$1$, 1% պիրուվատ	12	0.86	1.23	0.3
C-25/pVOG 10	$\$1$	12	0	1.17	0.25
	$\$1$, 13% սախարոզ	12	3.25	1.1	0.17
	$\$1$, 13% սախարոզ, 4.5% $(NH_4)_2SO_4$	12	3.3	2.6	0.24
	$\$1$, 1% պիրուվատ	14	0.86	1	0.3

Վիտամինների ազդեցությունը *C. glutamicum*-ի բջիջների սերին արտադրելու ունակության վրա: Կատարվել է ֆերմենտացիա հետևյալ վիտամիններով պիրիդոքսին, ֆոլաթթու, պանտոտենաթթու, π -ամինաբենզոյական թթու: Աղյուսակ 3-ից երևում է, որ առանձին-առանձին պիրիդոքսինով, ֆոլաթթվով և պանտոտենաթթվով միջավայրերի դեպքում C-25, C-25/pEK0 և C-25/pVOG10 շտամերի սերին սինթեզող ակտիվությունը բարձրանում է մեկական գ/լ-ով, նրանցից երկուսի միաժամանակյա օգտագործման դեպքում բարձրանում է երկուական գ/լ-ով, իսկ երեքի միաժամանակյա օգտագործման դեպքում բարձրանում է չորս գ/լ-ով: Աղյուսակից երևում է, որ բոլոր շտամերի օպտիկական խտությունները, այսինքն աճի մակարդակները վիտամիններով միջավայրերի դեպքում ավելի բարձր են, և սերինի արտադրության բարձրացումը կարող է դրա հետևանքը լինել:

Պիրուվատի C-25 շտամով ֆերմենտացիայի համար օպտիմալ կոնցենտրացիայի որոշումը: Պիրուվատը հանդիսանում է սերինի սինթեզի նախանյութ *C. glutamicum* բջիջներում: Կատարվել է *C. glutamicum* C-25 շտամի ֆերմենտացիա 0.5%, 1% և 1.5% պիրուվատ պարունակող միջավայրերով: Տվյալները ներկայացված են աղյուսակ 4-ում:

Աղյուսակ 4-ի տվյալները վկայում են, որ պիրուվատի օպտիմալ կոնցենտրացիան C-25, C-25/pEK0 և C-25/pVOG10 շտամերի ֆերմենտացիայի համար 1%-ն է, դրանից ավել պիրուվատի կոնցենտրացիան բարձրացնելու դեպքում տվյալ շտամերի սերին սինթեզող ակտիվությունը չի բարձրանում:

Աղյուսակ 3. Վիտամինների ազդեցությունը սերինի արտադրման վրա:

Միջավայր		C-25	C-25/pEK0	C-25/pVOG10
Ֆ1	Սերին գ/լ	10	10	12
	OD ₆₀₀	0.22	0.22	0.27
Ֆ1, պիրիդոքսին	Սերին գ/լ	11	11	13
	OD ₆₀₀	0.22	0.22	0.25
Ֆ1, ֆոլաթու	Սերին գ/լ	11	11	13
	OD ₆₀₀	0.22	0.22	0.24
Ֆ1, պանտոտենաթու	Սերին գ/լ	11	11	13
	OD ₆₀₀	0.24	0.24	0.26
Ֆ1, π-ամինաբենզոյաթու	Սերին գ/լ	10	10	12
	OD ₆₀₀	0.25	0.24	0.27
Ֆ1, պիրիդոքսին, ֆոլաթու	Սերին գ/լ	11	11	13
	OD ₆₀₀	0.23	0.22	0.24
Ֆ1, պիրիդոքսին, պանտոտենաթու	Սերին գ/լ	13	13	15
	OD ₆₀₀	0.27	0.26	0.28
Ֆ1, ֆոլաթու, պանտոտենաթու	Սերին գ/լ	12	12	14
	OD ₆₀₀	0.25	0.24	0.27
Ֆ1, պիրիդոքսին, ֆոլաթու, պանտոտենաթու	Սերին գ/լ	14	14	16
	OD ₆₀₀	0.26	0.25	0.28

Ծանոթություն. Պիրիդոքսինը ավելացվել է 1 մգ/լ կոնցենտրացիայով, ֆոլաթուն 1,5 մգ/լ, պանտոտենաթուն 5 մգ/լ, π-ամինաբենզոյաթուն 1 մգ/լ:

Աղյուսակ 4. Պիրուվատի տարբեր կոնցենտրացիաներով կատարված ֆերմենտացիայի արդյունքները

Միջավայր	Սերին, գ/լ		
	C-25	C-25/pEK0	C-25/pVOG10
Ֆ1	10	10	12
Ֆ1 + 0.5% պիրուվատ	11	11	13
Ֆ1 + 1% պիրուվատ	12	12	14
Ֆ1 + 1.5% պիրուվատ	12	12	14

Այստեղ կատարված բոլոր ուսումնասիրություններից երևում է, որ pVOG10 պլազմիդը, որը պարունակում է TacP պրոմոտերի ներքո *C. glutamicum*-ի GDH-ի գենի կոդավորող հատվածը, ցուցաբերում է *C. glutamicum* C-25 շտամի սերին սինթեզող ակտիվության մեծացման հատկություն: Կարելի է ենթադրել, որ սերին սինթեզող ակտիվության մեծացումը կապված է բջջում գլյուտամինաթվի քանակի մեծացման հետ, քանի որ գլյուտամինաթուն հանդիսանում է ամին խմբի դոնոր սերինի սինթեզի համար: Գրականության մեջ կան տվյալներ, որ բազմապատկված *gdh* գեն պարունակող *C. glutamicum*-ի շտամում GDH-ի ակտիվությունը մեծանում է 8 անգամ, սակայն դա չի բերում գլյուտամինաթվի գերարտադրության բարձրացմանը [4], ըստ երևույթին գլյուտամինաթվի տրանսպորտի սահմանափակման պատճառով: Սեր դեպքում *C. glutamicum* C-25 շտամը սերինի արտադրիչ շտամ է, և նրանում գլյուտամինաթվի քանակությունը ըստ երևույթին բավարար չէ: Կարելի է ենթադրել, որ pVOG10 պլազմիդի ներակայությունը բարձրացնում է *C. glutamicum* C-25 շտամի՝ սերին

սինթեզող ակտիվությունը հավանաբար բջջում գլյուտամինաթթվի քանակի բարձրացման շնորհիվ: Հարկ է նշել նաև, որ *gdh* գենի տրանսկրիպտը ավելի երկար է, քան սպիտակուց կոդավորող հաջորդականությունը: Գենի 5 ծայրից ընկած 259 նուկլեոտիդից բաղկացած հատվածի դերը *gdh* գենի տրանսկրիպցիայի կարգավորման մեջ դեռևս չի բացահայտված: Մեր կողմից կառուցված պլազմիդում *gdh* գենի այդ հատվածը, ինչպես նաև *gdh* գենի սեփական պրոմոտերը փոխարինված է TacP պրոմոտերով: Եվ եթե կա *gdh* գենի տրանսկրիպցիայի կարգավորման մեխանիզմ, ապա նա չի գործում pVOG10 պլազմիդի կազմում գտնվող *gdh* գենի արտահայտման վրա: Սակայն այդ երևույթի հստակ ապացույցի համար անհրաժեշտ է կատարել *C. glutamicum* C-25/ pVOG10 տրանսֆորմանտների *gdh* գենի տրանսկրիպցիային վերաբերվող հետազոտումներ: Սա կարևոր է սերինի արտադրիչ շտամների ակտիվության բարձրացման, նրանց կատարելագործման համար:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Шануро Д. К.* Практикум по биологической химии, 1976.
2. *Bormann E.R., Eikmanns B.J., Sahm H.* Molecular Microbiology. 6(3), 317-326, 1992.
3. *Brosius J., Holy A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81. 6929-6933, 1984.
4. *Burkovski A.* FEMS Microbiology Reviews. 27, 617-628, 2003.
5. *Duncan L.K., Shivan E.* Bio/Technology. 7, 1067-1071, 1990.
6. *Eikmanns B.J., Kleinertz E., Liebl W., Sahm H.* Gene, 102, 93, 1991c.
7. European Patent No. 0931833 A2.
8. *Flodin N.W.* J. Am. Coll. Nutr., 12, 486, 1993.
9. *Follettie M.T., Archer J., Peoples O.P., Sinskey A.J.* In: Proc. Sixth Intern. Symp. on Genetics of Industrial Microorganisms, Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand G., and Penasse, L., Eds., Paris, 315, 1991.
10. http://www.kegg.com/dbget-bin/get_pathway?org_name=cgl&mapno=00260
11. *Martin J.F., Santamaria R., Sandoval H., del Real G., Mateos L.M., Gil J. A., Aguilar A.* Bio/Technology, 5, 137, 1987.
12. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 2nd .edn.

Поступила 07.IX.2005