

Биол. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 579.66:575.224:579.871.8

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ L-АРГИНИН ШТАММОВ НА ОСНОВЕ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* ATCC 14067

А.О. КОЛЯН

ЗАО «НИИ Биотехнологии», 375056, Ереван

На основе штамма дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 путем многоступенчатой селекции получен штамм-продуцент *Br. flavum* НК-19А (ile⁻, D-ser⁻, ArgHx⁺, TA⁺), продуцирующий в условиях колбочной ферментации до 13 г/л L-аргинина. Полученный штамм-продуцент можно использовать в качестве реципиента для молекулярного клонирования гомологичных и гетерологичных ключевых генов биосинтеза аргинина.

Brevibacterium flavum ATCC 14067 շտամի վայրի տիպից բազմափուլ սելեկցիայի ճանաչարհով ստացվել է *Br. flavum* НК-19А (ile⁻, D-ser⁻, ArgHx⁺, TA⁺) շտամ-արտադրիչ, որը սրվակային ֆերմենտացիայի պայմաններում արտադրում է մինչև 13 գ/լ L-արգինին: Արտադրած շտամ-արտադրիչը կարելի է օգտագործել որպես ռեցիպիենտ արգինինի կենսասինթեզի առանցքային հոմոլոգ և հետերոլոգ գեների մոլեկուլային կլոնավորման համար:

The strain-producer НК-19А (ile⁻, D-ser⁻, ArgHx⁺, TA⁺) of *Brevibacterium flavum* producing up to 13 g/l of L-arginine in flask fermentation has been obtained via multi-step selection of the wild *Br. flavum* ATCC 14067. This strain-producer can be used as a recipient for molecular cloning of the homologous and heterologous key genes of the arginine biosynthesis.

L-аргинин - штамм-продуцент - коринеформные бактерии - мутант

Аминокислота аргинин широко используется в фармакологии, медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Промышленное получение L-аргинина основано преимущественно на микробиологическом способе производства.

Биосинтез его у микроорганизмов начинается с L-глутаминовой кислоты и проходит восемь ферментативных стадий. Пять стадий протекают с последовательным образованием N-ацетилированных соединений. После деацетилирования N-ацетилорнитина синтезируется орнитин, превращение которого в аргинин осуществляется еще через три стадии. У прокариотов в пути биосинтеза аргинина имеется два альтернативных способа удаления ацетильной группы. Представители семейства *Enterobacteriaceae* [5] и термофильная археобактерия *Sulfolobus solfataricus* [15] используют линейный путь – деацетилирование с помощью фермента ацетилорнитиназы. Другие прокариоты и все изученные до сих пор эукариоты используют циклический путь – реакцию трансацетилирования, т.е. перенос ацетильной группы с ацетилорнитина на глутамат для её повторного использования [1,4,12].

Различие в механизме ацетилирования находит отражение в регуляции биосинтеза конечным продуктом, т.е. самим аргинином. Если для первого способа мишенью является только первый фермент — N-ацетилглутаматсинтетаза, то для второго способа мишенью является второй фермент — N-ацетилглутаматфосфотрансфераза, а в некоторых случаях первый и второй ферменты биосинтеза [3, 8].

Высокоактивные штаммы-продуценты L-аргинина у коринеформных бактерий были получены комбинированием в одном штамме мутаций устойчивости к аналогам аргинина (штаммы со снятым ингибированием конечным продуктом) и мутаций, приводящих к устойчивости к кетомалоновой, фтормалоновой, монофторуксусной кислотам или к аналогам аспарагиновой кислоты. Наиболее активный штамм *Br. flavum* продуцирует до 36 г/л L-аргинина [2].

В последнее время для усовершенствования коринеформных штаммов-продуцентов широко используется технология рекомбинантных ДНК [6, 7]. Альтернативный традиционным методам подход заключается в клонировании генов, кодирующих ферменты биосинтеза аминокислот. Экспрессия этих генов под контролем собственных или гетерологичных сильных промоторов, не подверженных регуляции конечным или промежуточными продуктами, приводит к повышению синтетической активности и улучшению технологических характеристик штаммов-продуцентов.

Целью настоящей работы являлось получение штамма-продуцента L-аргинина у *Br. flavum*, который можно использовать в качестве реципиента для молекулярного клонирования гомологичных и гетерологичных ключевых генов биосинтеза аргинина.

Материал и методика. Характеристика использованных в работе штаммов приведена в табл. 1. Для культивирования штаммов использовали жидкий и агаризованный мясо-пептонный бульон (МПБ, МПА) и минимальную среду Гловера следующего состава, %: NH_4Cl — 0,5; NH_4NO_3 — 0,1; Na_2SO_4 — 0,2; K_2HPO_4 — 0,4; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; агар — "Difco" — 1,6; глюкоза — 1,0; а также биотин — 200 мкг/л; тиамин — 100 мкг/л; L-изолейцин — 40 мкг/мл.

Для получения мутантов в качестве мутагена использовали N-метил-N'-нитрозогуанидин (НГ). Клетки культур, выращенные в мясо-пептонном бульоне, отмывали от среды и выдерживали в анистатном буфере (рН 5,6), содержащем 200 мкг/мл НГ в течение 30 мин при температуре 30°. Для получения аналогоустойчивых мутантов отмытые от мутагена клетки высевали на чашки со средой Гловера, содержащей аналоги аминокислот в минимальной концентрации, подавляющей рост исходного штамма. Через 5 — 7 дней выросшие колонии отбирали и сеяли истощением до отдельных колоний для повторной проверки.

Чувствительные к D-серину мутанты отбирали после пенициллинового обогащения мутагенизированной культуры. Для этого его в течение четырех часов инкубировали с аэрацией в среде, содержащей пенициллин (1000 мкг/мл) и D-серин (50 мкг/мл).

Способность к сверхсинтезу аргинина определяли микробиологическим методом. Для этого суспензии испытуемых культур с помощью репликатора наносили на минимальную среду Гловера, засеянную тест-культурой, ауксотрофной по аргинину. Способность продуцировать аргинин оценивали по наличию и размерам зоны роста тест-культуры вокруг капель анализируемых колоний.

Способность мутантов к накоплению аргинина определяли в ферментационной среде следующего состава, %: сахараза — 13,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 4,5; KH_2PO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; CaCO_3 — 5,0; а также тиамин — 300

мкг/л; биотин – 300 мкг/л; L-изолейцин – 200 мкг/мл. Посевной материал выращивали в МПБ с аэрацией.

Ферментацию проводили в течение 72 ч в колбах Эрленмейера (500 мл), содержащих 14 мл ферментационной среды и 7 % посевного материала, на качалке со скоростью вращения 220-240 об/мин, при температуре 30°.

Оптическую плотность бактериальной суспензии измеряли на КФК-2 (при длине волны $\lambda = 540$ нм) после предварительного растворения мела в среде с помощью 2N HCl.

Содержание аргинина в культуральной жидкости (КЖ) определяли бумажной хроматографии в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:1) и колориметрически по модифицированному методу Сакагучи [11].

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов

Штамм	Родительский штамм	Характеристика	Источник получения
<i>Br. flavum</i> ATCC 14067	-	Дикий тип	Музей культур НИИ Генетика
<i>Br. flavum</i> ATCC 14067-1	<i>Br. flavum</i> ATCC 14067	ile ⁻	Получен и настоящей работе
<i>Br. flavum</i> HK-1	<i>Br. flavum</i> ATCC 14067-1	ile ⁻ , D-ser ⁺	-
<i>Br. flavum</i> HK-19	<i>Br. flavum</i> HK-1	ile ⁻ , D-ser ⁺ , ArgHx ⁺	"
<i>Br. flavum</i> HK-19A	<i>Br. flavum</i> HK-19	ile ⁻ , D-ser ⁺ , ArgHx ⁺ , TA ⁺	"

Результаты и обсуждение. Как уже отмечалось, предшественником аргинина в пути биосинтеза является глутаминовая кислота, для синтеза которой необходимо значительное количество АТФ, который используется также на последующих этапах пути биосинтеза аргинина [3]. С целью повышения пула АТФ у дикого типа штамма *Br. flavum* ATCC 14067 путем мутагенеза был получен ауксотрофный по изолейцину мутант *Br. flavum* ATCC 14067-1, который был использован как исходный для получения штамма-продуцента аргинина. Сверхсинтез аргинина, так же как и других аминокислот с неразветвленным путем биосинтеза, не может быть обусловлен единичной ауксотрофной мутацией. Поэтому получение аналогустойчивых мутантов с нарушенной регуляцией синтеза является необходимым этапом для конструирования штамма-продуцента [9]. Известно, однако, что глутаматсинтезирующие бактерии природно устойчивы к высоким концентрациям аналогов аргинина. Одним из способов повышения чувствительности культур к аналогам может служить внесение в геном мутации, обуславливающей чувствительность клетки к D-серину (D-ser⁺), в результате чего увеличивается проницаемость мембраны для аргинина и его аналогов [9]. Для получения D-ser⁺ мутантов была подобрана минимальная ингибирующая доза (50 мкг/мл) и путем тотальной проверки мутагенизированных клеток на среде с D-серином и без него были отобраны 113 чувствительных мутанта. Из них один мутант – *Br. flavum* HK-1, стабильно сохраняющий чувствительность к D-серину и обладающий повышенной чувствительностью к аналогам аргинина, был использован как исходный штамм для получения продуцента.

Для определения минимальной подавляющей дозы аналогов аргинина было изучено влияние различных концентраций гидроксамата аргинина, канаванина, D-аргинина и гомоаргинина на рост штамма *Br. flavum* ATCC 14067-1 и его D-серин чувствительного мутанта *Br. flavum* НК-1 (табл.2).

Таблица 2. Чувствительность штаммов *Br. flavum* ATCC 14067-1 и *Br. flavum* НК-1 к аналогам аргинина

Штамм	Гидроксамат аргинина, мг/мл			Канаванин, мг/мл			D-аргинин, мг/мл			Гомоаргинин, мг/мл		
	1	8	10	1	2	3	5	10	15	5	10	15
<i>Br. flavum</i> ATCC 14067-1 (ile ⁻)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Br. flavum</i> НК-1 (ile ⁻ , D-ser ⁻)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-

Примечание: "+" - рост клеток на среде с аналогом, "-" - отсутствие роста клеток на среде с аналогом.

Устойчивые к минимальным ингибирующим дозам аналогов мутанты были получены под действием нитрозогуанидина в описанных выше условиях. Было получено всего 1500 устойчивых к использованным аналогам мутантов. Предварительный отбор их с повышенной активностью синтеза L-аргинина проводили микробиологическим методом с использованием ауксотрофной по аргинину тест-культуры. Из проверенных колоний только 31 обладала способностью к сверхсинтезу аргинина. Все они были отобраны из устойчивых к 10 мг/мл гидроксамату аргинина (ArgHx) вариантов. Проверка этих мутантов в условиях колбочной ферментации показала, что они способны продуцировать от 2,0 до 8,5 г/л аргинина. Это свидетельствует о дерепрессии ферментов биосинтеза аргинина. Для дальнейшей работы был выбран мутант *Br. flavum* НК-19, продуцирующий до 8,5 г/л аргинина.

Последующие исследования показали, что отобранный мутант, кроме устойчивости к гидроксамату аргинина, проявляет устойчивость также к канаванину, D-аргинину и гомоаргинину.

Из литературы известно, что у мутантов, устойчивых к сульфогуанидину, повышается внутриклеточный пул АТФ, который может существенно повлиять на уровень синтеза аргинина [13]. Исходя из этого, у штамма *Br. flavum* НК-19 нами были получены мутанты, устойчивые к сульфогуанидину. Однако среди проверенных мутантов не было выявлено ни одного с более высоким выходом аргинина. Возможно, мутация ауксотрофности по изолейцину у штамма *Br. flavum* НК-19 обеспечивает достаточно высокий уровень пула АТФ для реализации потенциальных биосинтетических возможностей полученного штамма-продуцента и дальнейшее его увеличение на данном этапе селекции не приводит к повышению выхода аргинина.

У штамма *Br. flavum* НК-19 была получена коллекция ауксотрофных

мутантов, нуждающихся в серине, лейцине, лизине, гистидине и уридине. Результаты колбочной ферментации показали, что у полученных мутантов не только не наблюдается повышение аргинин-продуцирующей способности, но в некоторых случаях резко (до 3,0-4,0 г/л) понижается количество синтезируемого аргинина.

Известные из литературы высокоактивные штаммы-продуценты были получены и среди устойчивых к тиазолидину (ТА) мутантов [10,14]. Поэтому у штамма *Br. flavum* НК-19 методом ИГ-мутационеза были получены устойчивые к ТА (4 мг/мл) мутанты. Из проверенных микробиологическим методом 200 мутантов отобрано три штамма, которые в условиях колбочной ферментации продуцируют до 12-13 г/л аргинина.

Один из них, обозначенный *Br. flavum* НК-19А (ile⁻, D-ser⁻, ArgHx⁺, ТА⁻), оказался наиболее стабильным в отношении сверхсинтеза аргинина и был выбран для дальнейшей работы в качестве реципиента для молекулярного клонирования гомологичных и гетерологичных ключевых генов биосинтеза аргинина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сакарян В.А., Овсепян А.С., Метт И.Л., Кочилян А.В., Петросян П.К. Генетика, 26, 11, 1915-1925, 1990.
2. Akashi K., Nakamura Y., Tsuchida T., Yoshii H., Ikeda S. Patent FR 2490674, 1982.
3. Cunin R-In: Biotechnology series 3. Amino Acids; Biosynthesis and regulation, 53-59, 1983.
4. Davis R.H. Microbiol. Rev., 50, 280-313, 1986.
5. Glansdorff N. Cell and Molecular Biology, Washington, DC, 1, 321-344, 1987.
6. Kuwahara Y., Hashiguchi K., Nakamatsu T., Kurahashi O., Mori Y., Ito H. US Patent 6 255 086, 2001.
7. Kuwahara Y., Kurahashi O., Nakamatsu T. US Patent 20030153058 A1, 2003.
8. Leisinger T., Haas D. J. Biol. Chem., 250, 1690-1693, 1975.
9. Nakayama K., Yoshida H. Agric. Biol. Chem., 36, 1675-1684, 1972.
10. Ogawa T., Hirao N., Furukawa S., Azuma T., Kuratsu Y. Japan Patent 6 000 092 A, 1994.
11. Rosenberg H., Ennor A.H., Morrison J.F. Biochem. J., 63, 153-159, 1956.
12. Sakaryan V., Kochikyan A., Mett I., Legrain C., Charlier D., Pierard A., Glansdorff N. J. Gen. Microbiol., 1638, 125-130, 1992.
13. Tsuchida T., Kubota K., Yoshinaga F. Agr. Biol. Chem., 52, 2201-2207, 1986.
14. Tsuchida T., Ohtsuka N., Takeuchi H., Uchihori H. Japan Patent 2 186 995 A, 1990.
15. Van de Casteele M., Demarez M., Legrain C., Glansdorff N., Pierard A. J. Gen. Microbiol., 136, 1177-1183, 1990.

Поступила 09.11.2006