

УДК 579.66.578.81.579.871.8

Մ.Բ. ՇԻՏՉՅԱՆ, Է.Լ. ԱԳԱԲԵԿՅԱՆ, Ն.Տ. ԱՎԵՏԻՏՅԱՆ, Գ.Գ. ՕԳԱՆԵԶՈՎԱ,
Մ.Ա. ՄԵԼԿՄՅԱՆ, Օ.Յ. ՏԱԿՅԱՆ

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОСИНТЕЗЕ ФЕНИЛАЛАНИНА У *CORYNEBACTERIUM LACTOFERMENTUM*

Исследованы пути усовершенствования штаммов-продуцентов фенилаланина у *Corynebacterium lactofermentum*, основанные на усилении потока предшественника в сторону биосинтеза указанной аминокислоты. Показано, что мутации в ферментах, участвующих в метаболизме пирувата, влияют на продуктивность штаммов по фенилаланину.

Фенилаланин является незаменимой ароматической аминокислотой, входящей в состав синтетического подсластителя аспартама, который можно получить путем химического синтеза, методом биологической трансформации и микробиологическим методом: ферментацией штаммов-продуцентов на соответствующей питательной среде.

В биосинтетическом пути ароматических аминокислот принимают участие около 17 ферментов. В настоящее время все они выделены и изучены. Установлено, что лишь 4 из них – триптофансинтаза (А и В субъединицы), антранилат-фосфорибозил-трансфераза, хоризматмутаза и префенатдегидрогеназа – являются основными для биосинтеза ароматических аминокислот [1].

Путь биосинтеза ароматических аминокислот у микроорганизмов имеет общий участок, включающий 7 реакций, ведущих от эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата (ФЕП) к хоризмовой кислоте, которая является точкой разветвления на отдельные пути синтеза каждой из трех аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина – и нескольких ароматических витаминов.

Использование классических генетико-селекционных методов при получении продуцентов фенилаланина у *Corynebacterium glutamicum* предполагает поэтапное введение в геном исходного штамма мутаций ауксотрофности по тирозину, триптофану, а также устойчивости к аналогам фенилаланина и триптофана [2].

Известно, что биосинтетическая продуктивность штаммов-продуцентов зависит не только от работы генов и ферментов, непосредственно вовлеченных в путь биосинтеза данной аминокислоты, но и, существенным образом, от метаболизма предшественников.

За последние годы появились работы, согласно которым манипулирование потоком углерода обеспечивает заметное увеличение выхода лизина, треонина, изолейцина у *Corynebacterium* [3–6].

В настоящей работе исследуются пути усовершенствования штаммов-продуцентов фенилаланина, основанные на усилении потока предшественника в сторону биосинтеза данной аминокислоты у *C. lactofermentum*.

Материал и методика. В работе использовали природный штамм *C. lactofermentum* 13069.

Среды: мясопептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА) 1,2 %.

Состав синтетической среды: глюкоза – 20г, $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ – 10г, мочевины – 250мг, биотин – 50мкг, тиамин – 200мкг, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10мг, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 10мг, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4г, агар-агар – 20г на 1л дистиллированной воды. Состав ферментационной среды: меласса – 25%, KH_2PO_4 – 0,15%, K_2HPO_4 – 0,05%, гидролизат белково-витаминного концентрата (БВК) – 5%, мочевины – 0,025%, мел – 5%, pH – 7,6.

N-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин (НГ) – индуцированный мутагенез. Суточную культуру исходного штамма, выращенную в МПБ, вновь разводили в МПБ и инкубировали на качалке в течение 4 часов. Далее культуру осаждали центрифугированием, ресуспендировали в ацетатном буфере, содержащем 500мкг/мл НГ, и выдерживали при 37°C в течение 15мин, затем дважды отмывали центрифугированием и с соответствующего разведения высевали на чашки с МПА.

Определение продуктивности штаммов по фенилаланину. Испытуемую культуру выращивали на скошенном МПА. 1мл смывого с косяка культуры переносили в 500мл колбы Эрленмейера, содержащие по 15мл ферментационной среды, и инкубировали на качалках со скоростью вращения 220об/мин в течение 72 часов при 30°C. Содержание фенилаланина в культуральной жидкости определяли методами бумажной и тонкослойной хроматографии с последующим окрашиванием нингидрином и определением оптической плотности на ФЭК и аминокислотном анализаторе.

Результаты и обсуждение. Из [1] известно, что регуляция биосинтеза фенилаланина у микроорганизмов осуществляется при помощи ингибирования фермента префенат-дегидрогеназы и первого фермента общего пути биосинтеза ароматических аминокислот – 3-дезоксидарабиногептулозо-7-фосфат (ДАГФ) синтазы – тирозином и фенилаланином. Кроме того, тирозин репрессирует 5 ферментов, участвующих в биосинтезе фенилаланина.

На первом этапе работ в исходную культуру штамма *C. Lactofermentum* была введена мутация ауксотрофности по тирозину. Для получения

мутантов культуру, обработанную НГ, высевали на чашки с МПА и выросшие колонии методом реплик тотально переносили на селективные синтетические среды (с тирозином и без тирозина) для отбора ауксотрофов. Все отобранные ауксотрофы проверяли на способность продуцировать фенилаланин; наиболее активный вариант продуцировал до 5г/л фенилаланина.

Известно также, что снятие ингибирующего воздействия тирозина и фенилаланина на ключевой фермент общего пути биосинтеза ароматических аминокислот (ДАГФ) достигается внесением в геном штамма мутации устойчивости к аналогу фенилаланина – метафторфенилаланину (МФФ). Для этого в предварительных экспериментах была определена ингибирующая доза аналога – 2мг/мл, а затем обработанную НГ культуру высевали на чашки с синтетической средой, содержащей аналог. Чашки выдерживали при 30°C в течение 6 суток, после чего выросшие колонии отбирали, вторично проверяли на признак устойчивости к аналогу и ферментацией определяли активность по фенилаланину. На этом этапе был отобран мутант, синтезирующий до 8г/л фенилаланина.

Для дальнейшего увеличения продуктивности штамма были получены мутанты, устойчивые к аналогу триптофана – 5-метилтриптофану. Из [5] известно, что эта мутация может привести к значительному повышению продуктивности по фенилаланину, однако сведения относительно точки приложения этого аналога и о характере мутации отсутствуют. Ингибирующая доза аналога составила 0,7мг/мл. В результате экспериментов был отобран вариант, активность которого превышала активность двойного мутанта на 3–4г/л (табл. 1).

Таблица 1

*Характеристика фенилаланинпродуцирующих мутантов, полученных на основе штамма *S. lactofermentum* 13069*

NN	Генотип	Активность по фенилаланину	Сопутствующие аминокислоты
1	ауксотроф по тирозину	3–4г/л	лизин валин аланин
2	ауксотроф по тирозину, устойчивый к метафторфенилаланину	6–7г/л	лизин валин аланин
3	ауксотроф по тирозину, устойчивый к метафторфенилаланину и 5-метилтриптофану	9–10г/л	лизин валин аланин

Как отмечалось выше, активность штаммов-продуцентов аминокислот в значительной степени зависит от метаболизма предшественников. Известно, что ФЕП является ключевым предшественником фенилаланина, а именно: общий путь биосинтеза ароматических аминокислот начинается с ФЕП и эритрозо-4-фосфата. Исходя из этого, было сделано предположение, что среди мутантов по ферментам, участвующим в

метаболизме пирувата, могут быть варианты с ослабленной пируваткиназной активностью, вследствие чего возможно уменьшение пула пирувата, с одной стороны, и активизация синтеза ФЕП и эритрозо-4-фосфата – с другой.

У тир⁻, МФФ^R, 5МТ^R штамма *C. lactofermentum* была получена коллекция мутантов, чувствительных к аналогу пирувата – фторпирувату (ФП). Для получения мутантов обработанную НГ культуру (по методике, описанной выше) с соответствующего разведения высевали на чашки с МПА. Выросшие колонии методом реплик переносили на два типа синтетических сред: 1 – синтетическая среда + 5мкг/мл ФП; 2 – синтетическая среда. Всего проверено 5000 колоний; из них отобрано 130 мутантов, чувствительных к 5мкг/мл ФП. Далее отобранные мутанты классифицировали по чувствительности к различным дозам ФП: 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 и 5мкг/мл (табл. 2).

Таблица 2

Чувствительность к фторпирувату и продуктивность по фенилаланину у мутантов *C. Lactofermentum*

Доза ФП	Количество полученных ФП-чувствительных мутантов	Количество мутантов с измененной продуктивностью по фенилаланину	Активность по фенилаланину (г/л)
0.5	27	5	до 15
1.5	20	2	до 15
2.5	21	7	до 8
3.5	34	3	до 8
5	28	5	до 8

Как видно из табл. 2, количества полученных мутантов, чувствительных к различным дозам аналога, несущественно отличаются друг от друга. Что же касается продуктивности по фенилаланину, то варианты, превосходящие исходный тройной ауксотроф, обнаружены только среди мутантов, чувствительных к минимальным дозам ФП – 0,5 и 1,5мкг/мл. Следует отметить также, что у этих мутантов, наряду с увеличением продуктивности по фенилаланину, отмечается значительное уменьшение выхода сопутствующих аминокислот – лизина, валина, аланина.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что конструирование мутантов с модифицированными ферментами, участвующими в метаболизме пирувата, является перспективным направлением при усовершенствовании штаммов-продуцентов фенилаланина у *Corynebacterium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shio I. – Progress in Ind. Microbiology, 1986, v. 24, p. 188–201.
2. Jetten M. et al. – Critical Rev. in Biotechnology. 1995, v. 15, № 1, p. 73–103.
3. Агабекян Э.Л. и др. – Биол. ж. Армении, 1997, № 1–2, т. 50, с. 79–84.
4. McCormick M. et al. – Appl. Microb. Biotechnology, 1999, v. 51, № 3, p. 325–333.
5. Sahm H. et al. – Ann. N. A. Acad. Sci., 1996, v. 782, p. 25–39.
6. Читчян М.Б. и др. – Авт. свид. СССР, 1992, 1788011.

Մ.Բ. ՉԹՉՅԱՆ, Է.Լ. ԱՂԱԲԵԿՅԱՆ, Ն.Ս. ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ, Գ.Գ. ՕԳԱՆԵԶՈՎԱ,
Մ.Ա. ՄԵԼԿՈՒՄՅԱՆ, Հ.ՅՄ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ

ԿԵՆՏՐՈՆԱԿԱՆ ՄԵՏԱԲՈԼԻԶՄԻ ԴԵՐՈՐԸ *CORINEBACTERIUM LACTOFERMENTUM*-Ի ՖԵՆԻԼԱԼԱՆԻՆԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶՈՒՄ

Ամփոփում

Հետազոտված են *Corynebacterium lactofermentum*-ի ֆենիլալանինի արտադրիչ-շտամների կատարելագործման եղանակները, որոնք հիմնված են նախորդ միացություններից նշված ամինաթթուների սինթեզի հոսքի ուժեղացման վրա: Ցույց է տրված, որ պիրուվատի մետաբոլիզմում մասնակցող ֆերմենտների մուտացիաները ազդում են շտամների ֆենիլալանինի արտադրման արդյունավետության վրա:

M.B. CHITCHYAN, H.L. AGHABEKYAN, N.S. AVETISYAN, G.G. OGANEZOVA,
M.A. MELKUMYAN, H. Yu. SAHAKYAN

ROLE OF CENTRAL METABOLISM IN PHENYLALANINE BIOSYNTHESIS IN *CORINEBACTERIUM LACTOFERMENTUM*

Summary

Approaches to improve phenylalanine-producing strains in *Corynebacterium lactofermentum* based on precursor fluxes increasing towards biosynthesis of the mentioned amino acid have been studied. Mutations in enzymes involved in piruvate metabolism were shown to effect phenylalanine productivity.