

Биология

УДК 579.66.578.81.579.871.8

Н. А. ОГАНЕСЯН, М. Б. ЧИТЧЯН, ШЕ Ю ЧИН, Г. Г. ОГАНЕЗОВА, М. А. МЕЛКУМЯН,
О. Ю. СААКЯН

ВЛИЯНИЕ УВЕЛИЧЕНИЯ ДОЗЫ ГЕНОВ *ppc* И *dapA* НА
ПРОДУКЦИЮ ЛИЗИНА У *BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM*

Производство L-лизина основано на использовании штаммов-продуцентов *Corynebacterium glutamicum*. Клонирование генов биосинтеза лизина позволяет изучать влияние отдельных генов и их сочетаний на выход конечного продукта. Ген *ppc*, кодирующий фосфоенолпируваткарбоксилазу, и ген *dapA*, кодирующий дигидродипиколинатсинтетазу, являются ключевыми для синтеза лизина. В настоящей работе сконструирована плазмида pPPC:DAP, содержащая гены *ppc* и *dapA*, и показано, что введение этой плазмиды в штамм-продуцент *Brevibacterium lactofermentum* приводит к повышению его лизин-синтезирующей активности.

L-лизин является экономически наиболее важной аминокислотой, производство которой основано на применении мутантов *Corynebacterium glutamicum*, полученных генетико-селекционными методами. С появлением технологии рекомбинантных ДНК стало развиваться новое направление получения продуцентов аминокислот – метаболическая инженерия, которая дает возможность конструировать штаммы с направленным изменением потока промежуточных соединений клеточного метаболизма [1]. Высокий уровень продукции лизина известных продуцентов затрудняет задачу дальнейшего повышения лизин-синтезирующей активности. Одним из способов повышения продуктивности штаммов является клонирование ключевых генов биосинтеза лизина.

Ген *ppc*, кодирующий фосфоенолпируват(ФЕП)карбоксилазу, и ген *dapA*, кодирующий дигидродипиколинат(ДДП)синтетазу, играют важную роль в биосинтезе лизина у коринебактерий. ФЕП и пируват занимают центральное положение в метаболизме глюкозы. ФЕПкарбоксилаза и пируваткарбоксилаза участвуют в анаплеротическом пути синтеза щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) – предшественника аспартата. Усиление этого пути приводит к значительному увеличению продукции лизина и глутамата [2]. ДДПсинтетазу осуществляет реакцию конденсации пирувата

и аспартатполуальдегида в ДДП – предшественника лизина. Повышение активности ДДПсинтетазы в клетках продуцента лизина приводит к увеличению продукции этой аминокислоты [3]. В настоящей работе сконструирована плазмида, содержащая гены *ppc* и *dapA* *Brevibacterium lactofermentum*, которая была внесена в клетки штамма-продуцента L-лизина. Показано, что продукция лизина в рекомбинантном штамме *B. lactofermentum* увеличена.

Материалы и методы.

Штаммы, плазмиды и условия культивирования. Используемые в работе штаммы и плазмиды приведены в табл. 1. Штаммы *Escherichia coli* и *B. lactofermentum* выращивали на полноценной жидкой среде LB и агаризованной среде LA [4] при 37° и 30°С, соответственно. Для *E. coli* использовали минимальную среду M9 [4]. Ампицилин добавляли до концентрации 50мкг/мл, хлорамфеникол – 20мкг/мл.

Таблица 1

Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы	Свойства и генотип		Источник
	<i>E. coli</i> DH 5 α XS1D2	<i>supE44 hsdR17 resA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1</i> <i>F Δ (ppc-argE) 101nalArpoB(λ)* hsdR</i>	
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 13869 PT 131	дикий тип AEC ^r , FP ^r	– " – – " –	
Плазмиды	PKK223-3 PEC5 pPPC:DAP	Ap ^r , TacP Cm ^r , ori pBL1 PEC5, <i>ppc</i> , TacP: <i>dapA</i>	Brosius et al. [11] Eikmanns et al. [12] данная работа

AEC – аминоэтилцистеин, FP – фторпируват, Ap – ампицилин, Cm – хлорамфеникол, ori – участок начала репликации.

Ферментации проводили на среде, содержащей 22% мелассы, 15% гидролизата паприна, 2,5% CaCl₂, pH 7, при 30°С в течение 72 ч., 250 об./мин.

Выделение ДНК и трансформация. Выделение плазмид из *E. coli* проводили известным методом [5], из *B. lactofermentum* – тем же методом с предварительной обработкой лизоцимом (5мг/мл) в течение 1 часа при 37°С. ДНК хромосомы *B. lactofermentum* выделяли по ранее описанному методу [6]. Клетки *E. coli* трансформировали методом CaCl₂ [4], а *B. lactofermentum* – методом электропорации [7].

Образование PCR (polymerization chain reaction) продуктов и клонирование. Для амплификации фрагмента хромосомной ДНК *B. lactofermentum* с геном *ppc*, включающего RBS (ribosome binding site) и коди-

рующую последовательность гена [8], подобрана соответствующая пара праймеров, согласно нуклеотидной последовательности: 231–254 – праймер 1 и 3074–3053 – праймер 2. Для амплификации фрагмента ДНК *B. lactofermentum* с геном *dapA*, включающего *RBS* и кодирующую последовательность гена [9], подобрана пара праймеров, соответствующая нуклеотидам 2356–2379 – праймер 1, и 3544–3522 – праймер 2.

Фрагменты, амплифицированные с помощью хромосомной ДНК *B. lactofermentum* и соответствующих праймеров, выделены из агарозного геля, обработаны ДНКполимеразой Т4 и полинуклеотидкиназой Т4 по стандартным протоколам [4]. Фрагменты ДНК, полученные таким способом, имеют тупые концы.

Конструирование и анализ плазмид также проводили согласно принятым протоколам [4]. Рестриктазы, ДНКлигаза Т4, щелочная фосфатаза телянка, Taqполимераза, ДНКполимераза Т4 и полинуклеотидкиназа Т4 получены от *Invitrogene*.

Результаты и обсуждение.

Конструирование плазмиды pPPC:DAP. Конструирование плазмиды *pPPC:DAP*, содержащей гены *dapA* и *ppc* *B. lactofermentum*, проводилось в несколько этапов.

На первом этапе *PCR* продукт (1,2kb*), содержащий *RBS* и кодирующую последовательность гена *dapA* *B. lactofermentum*, был встроен в *SmaI* сайт плазмиды *pPPC223–3* в ориентации, позволяющей экспрессию гена *dapA* под контролем промотора *TacP*, расположенного на плазмиде [13]. Выбор промотора *TacP* обусловлен его способностью функционировать в клетках коринебактерий [12]. Лигирование проводили по тупым концам и лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5 α , отбирали трансформанты, устойчивые к *Ap*. Рекombинантные плазмиды отбирали посредством скрининга. Плазмиду, содержащую встроенный фрагмент в ориентации, при которой ген *dapA* находится под контролем *TacP* промотора, отбирали путем рестрикционного анализа рекombинантных плазмид. Таким образом получена плаزمида *pKK223–3: TacP dapA*.

Далее, продукт *PCR* (2,7kb), содержащий *RBS* и кодирующую последовательность гена *ppc*, встраивали в *SmaI* сайт челночного вектора *pEC5*, способного реплицироваться как в *E. coli*, так и в *B. lactofermentum*. *SmaI* сайт вектора *pEC5* входит в состав полилинкера, расположенного непосредственно за участком, на котором находится один из промоторов плазмиды *pBL1* [14]. Лигирование проводилось по тупым концам. Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5 α , отбирали трансформанты, устойчивые к хлорамфениколу. Рекombинантные плазмиды также отбирали путем скрининга. Плазмиды *pEC5:ppc* с ориентацией клонированного фрагмента, необходимой для экспрессии гена *ppc* под контролем промотора, расположенного на векторе, отобрана после рестрикционного анализа рекombинантных плазмид.

* kb – тысяча пар нуклеотидов.

Плазмидой *pEC5:ppc* трансформировали штамм *E. coli* XS1D2, мутантный по гену *ppc*. Трансформанты отбирали на минимальной среде М9, не содержащей сукцинат натрия. Результаты трансформации показали, что плазмида *pEC5:ppc* комплементирует мутацию *ppc* гена. Это свидетельствует об экспрессии гена *ppc* *B. lactofermentum* под контролем промотора вектора *pEC5*.

Для переноса гена *dapA* плазмиду *pKK223-3: TacPdapA* обрабатывали рестриктазой *Sall* и полученный фрагмент размером 1,7kb, содержащий *TacPdapA*, лигировали с *pEC5:ppc*, предварительно обработанной *Sall*. Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5 α , отбирали трансформанты, устойчивые к хлорамфениколу. Рекомбинантную плазмиду *pPPC:DAP* отобрали так же, как остальные плазмиды. Плазмида *pPPC:DAP* размером 11,6kb содержит гены *B. lactofermentum:ppc*, экспрессирующийся под контролем промотора вектора *pEC5*, и *dapA*, находящийся под контролем *TacP* промотора (см. рисунок).

Влияние плазмиды pPPC:DAP на продукцию лизина у B. lactofermentum. Влияние плазмиды *pPPC:DAP* на продукцию лизина исследовалось на штамме РТ131 – продуценте лизина. Штамм РТ131 трансформирован плазмидами *pEC5:ppc* и *pPPC:DAP* методом электропорации, трансформанты отбирались на среде с хлорамфениколом. Трансформанты, содержащие плазмиду *pEC5:ppc* и плазмиду *pPPC:DAP*, проверялись на лизин-синтезирующую активность в экспериментах по ферментации на среде с мелассой, гидролизатом паприна и хлорамфениколом (см. **Материалы и методы**). Результаты ферментации приведены в табл. 2.

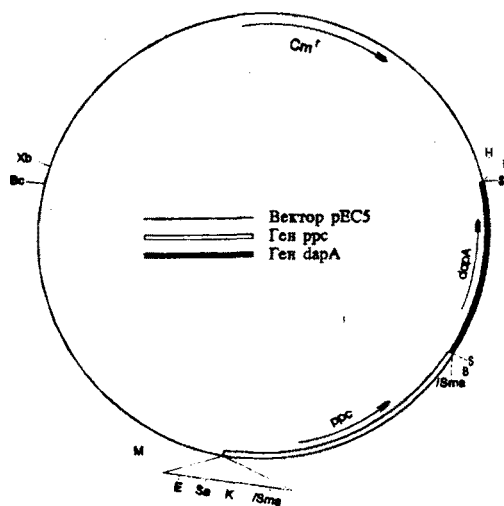


Диаграмма плазмиды *pPPC:DAP*, (11.6kb). Сокращения: В – BamHI; Bc – Bcl I, E – EcoRI; H – Hind III; K – KpnI; M – MluI; P – PstI; S – Sal I; Sa – SacI; Xb – XbaI; /Sma – указывает на сайт SmaI, образованный в результате лигирования фрагментов без последующего восстановления исходных сайтов рестрикции.

Результаты ферментаций показали увеличение продукции лизина: у трансформантов, содержащих плазмиду с геном, кодирующим ФЕПкарбоксилазу – на 6г/л, а содержащих плазмиду с двумя генами, кодирующими ФЕПкарбоксилазу и ДДПсинтетазу – на 14г/л. Увеличение продукции лизина в результате повышения активности ДДПсинтетазы в клетках продуцентов показано в работе Эгелинга и др. [3]. Однако при повышении активности ФЕПкарбоксилазы продукция лизина у штаммов *B. lactofermentum* оставалось почти неизменной [13]. Недавно достигнуто.

значительное увеличение продукции лизина в результате клонирования в *C. glutamicum* гена, кодирующего пируваткарбоксилазу, которая так же, как ФЕПкарбоксилаза, участвует в анаплеротическом синтезе ЦУК [2].

Таблица 2

Лизин-синтезирующая активность трансформантов PT131/pEC5:ppc и PT131/pPPC:DAP

Штаммы <i>B. lactofermentum</i>	Лизин (г/л)
PT131	26–28
PT131/pEC5:ppc	32–34
PT131/pPPC:DAP	40–42

Согласно данным, полученным нами, на продукцию лизина влияет увеличение не только дозы гена *dapA* *B. lactofermentum*, но и дозы гена *ppc*. Предполагается, что повышение продукции лизина происходит в результате усиления потока промежуточных соединений, участвующих в биосинтезе лизина.

НИИ "Биотехнология", ЕГУ, Институт
микробиологии Синцзянской АСН (КНР)

Поступила 10.12.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Jetten M.S, Sinskey A.J. – Critical Reviews in Biotechnology, 1995, v. 15, № 1, p. 73–103.
2. Peters-Wendisch P.G., Schiel B., Wendisch V.F., Katsoulidis E., Mockel B., Sahm H., Eikmanns B.J. – J. Mol. Microbiol. Biotechnol, 2001, v. 3, № 2, p. 295–300.
3. Eggeling L., Oberle S., Sahm H. – Appl. Microbiol. Biotechnol, 1998, v. 49, p. 24–30.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. – Molecular Cloning: Laboratory Manual, 1989, 2nd edn. NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
5. Birnboim H.C., Doly J. – Nucleic Acids Res., 1979, № 7, p. 1513–1523.
6. Eikmanns B.J., Thum-Schmitz N., Eggeling L., Ludtke K-U., Sahm H. – Microbiology, 1994, v. 140, p. 1817–1828.
7. Dunican L.K., Shivnan E. – Bio/Technology, 1990, № 7, p. 1067–1071.
8. Eikmanns B.J., Folletie M.T., Griot M.U., Sinskey A.J. – Mol. Gen. Genet., 1989, v. 218, p. 330–339.
9. Pisabarro A., Malumbres M., Mateos L.M., Oguiza J.A., Martin J.F. – J. Bacteriology, 1993, v. 175, № 9, p. 2743–2749.
10. Hanahan D. J. – Mol. Biol., 1985, v. 166, p. 557–580.
11. Brosius J., Ullrich A., Raker M.A., Gray A., Dull T.J., Gutell R.R., Noller H.F. – Plasmid, 1981, № 6, p. 112–118.
12. Eikmanns B.J., Kleinertz E., Liebl W., Sahm H. – Gene, 1991, v. 102, p. 93–98.
13. Gubler M.E., Park S.M., Jetten M.S., Stephanopoulos J., Sinskey A.J. – Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, v. 40, p. 857–869.
14. Cadenas R., Martin J.F., Gil J.A. – Gene, 1991, v. 98, p. 117–120.

Ն. Ա. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Բ. ՉԻԹՉՅԱՆ, ՇԵ ՅՈՒ ՉԻՆ, Գ. Գ. ՕԳԱՆԵԶՈՎԱ,
Մ. Ա. ՄԵԼԿՈՒՄՅԱՆ, Հ. ՅՈՒ ՍԱՀԱԿՅԱՆ

**BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM-ի *ppc* ԵՎ *dapA* ԳԵՆՆԵՐԻ
ԴՈՉԱՅԻ ԱՎԵԼԱՑՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼԻԶԻՆԻ
ԱՐՏԱԴՐՄԱՆ ՎՐԱ**

Ամփոփում

L-լիզինի արտադրությունը հիմնված է *Corynebacterium glutamicum*-ի շտամ-արտադրիչների օգտագործման վրա: Լիզինի կենսասինթեզի համար պատասխանատու գեների կլոնավորումը թույլ է տալիս ուսումնասիրել առանձին գեների և նրանց խմբերի ազդեցությունը վերջնական ելքի վրա: *ppc* գենը, որը կոդավորում է ֆոտոենոլպիրուվատկարբօքսիլազը և *dapA* գենը, որը կոդավորում է դիհիդրոպիրուլինատսինթետազը, որոշիչ են լիզինի սինթեզի համար: Տվյալ աշխատանքում կառուցված է *pPPC:DAP* պլազմիդը, որը պարունակում է *Brevibacterium lactofermentum*-ի *ppc* և *dapA* գեները, և ցույց է տրված, որ այդ պլազմիդի ներմուծումը լիզինի շտամ-արտադրիչի մեջ հանգեցնում է լիզին-սինթեզող ակտիվության բարձրացմանը:

N. A. HOVHANNISYAN, M. B. CHITCHYAN, XIE YU QING, G. G. OGANEZOVA,
M. A. MELKUMYAN, H. Yu. SAHAKYAN

**EFFECT OF *ppc* AND *dapA* DOSAGE INCREASE ON LYSINE
PRODUCTION IN *BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM***

Summary

L-lysine production is based on the use of *Corynebacterium glutamicum* strains. With the cloning of the genes involved in lysine biosynthesis it is possible to investigate the influence of particular gene or group of genes on the yield of lysine. PEP carboxylase coding *ppc* gene and dihydrodipicolinate synthase coding *dapA* gene are the key genes in lysine biosynthesis. In the present work the plasmid *pPPC:DAP* has been constructed, containing *ppc* and *dapA* genes of *Brevibacterium lactofermentum* and the effect of this plasmid on lysine production increase with strain *B. lactofermentum* has been shown.