

## **Лекция 10**

### **Характеристика основных групп микроорганизмов-продуцентов аминокислот.**

Характеристика основных групп микроорганизмов-продуцентов аминокислот. Основные тенденции в развитии селекции продуцентов аминокислот. Методы селекции продуцентов аминокислот.

#### **10.1 Характеристика основных групп микроорганизмов-продуцентов аминокислот.**

Производство аминокислот - одна из перспективнейших отраслей микробиологического производства. Мировой объем производства аминокислот постоянно растет. Так, в 1995 г. он составлял 1700 млн долл. К настоящему времени в мире производится более 800 000 т аминокислот стоимостью более 5 млрд долл. Аминокислоты широко применяются в пищевой промышленности - в качестве усилителей вкуса и аромата, антиоксидантов и пищевых добавок; в сельском хозяйстве - в качестве кормовых добавок; в медицине - для терапии послеоперационных больных; в химической промышленности - в качестве исходных веществ при синтезе полимеров и производстве косметических средств.

На предыдущих лекциях мы отмечали, что продуцировать аминокислоты способны те мутанты, у которых имеются генетические нарушения в регуляции биосинтеза. Нормальная регуляция препятствует избыточному образованию и выделению аминокислот микробной клеткой.

Методы получения продуцентов аминокислот совершенствуются по мере углубления наших знаний об особенностях и взаимосвязях биосинтеза аминокислот с другими метаболическими процессами в микробной клетке. Обычно природные свойства того или иного микроорганизма определяют его использование в качестве объекта для селекционной работы. Такими объектами обычно служат микроорганизмы с менее сложным контролем биосинтеза, к которым могут быть применимы разнообразные генетические методы. Дальнейший прогресс в использовании методов генной инженерии будет способствовать созданию систем генетического обмена у традиционных продуцентов аминокислот - коринебактерий.

В промышленном масштабе аминокислоты получают в основном либо экстракцией из белковых гидролизатов, либо как продукты метаболизма микроорганизмов.

Из микроорганизмов наиболее широко используемыми в биосинтезе аминокислот являются традиционные глутаматобразующие бактерии, а также некоторые штаммы р. *Bacillus*. Такие представители *Enterobacteriaceae*, как *E. coli* и *Serratia marcescens*, вошли в круг объектов для селекции лишь в последнее десятилетие в связи с развитием исследований их генетической организации.

Глутаматпродуцирующие бактерии - непатогенные аэробы, сапрофиты - включают представителей нескольких родов: *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* и др. Они объединены сходными таксономическими и биохимическими характеристиками, а также высокой степенью гомологии ДНК. Эти бактерии имеют неспорулирующие, грамположительные, палочковидные, неподвижные клетки. Они хорошо утилизируют многие сахара, органические кислоты, спирты. Главной особенностью бактерий этой группы является способность к продукции больших количеств глутаминовой кислоты, что коррелирует с потребностью в биотине. В генетическом отношении они изучены слабо, однако известно, что из систем генетического обмена наиболее успешно применяется рекомбинация на основе метода слияния протопластов.

Обычно для повышения продуктивности этих микроорганизмов используют мутагенез с последующим отбором штаммов-сверхпродуцентов определенных аминокислот. Альтернативным подходом является выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций. Впрочем, такой генно-инженерный подход может оказаться не столь простым. Так, в биосинтезе некоторых аминокислот могут участвовать несколько ферментов, которые активируются или ингибируются различными метаболитами, присутствующими в клетке. В такой ситуации трудно определить, какой фермент нужно модифицировать, чтобы увеличить выход конечного продукта. Кроме того, ученые пока не располагают исчерпывающими данными о биохимических свойствах этих микроорганизмов, а соответственно генно-инженерные подходы находятся на стадии разработки. В частности, только создаются экспрессирующие векторы и методики трансформации для этой группы микроорганизмов. Недавно у этих бактерий открыты плазмиды и разработана система для трансформации плазмидной ДНК (однако с низкой частотой). Показано, что плазмиды коринебактерий могут служить векторами для переноса генетической информации, что позволяет амплифицировать гены, а также дает возможность конструировать на их основе новые векторы, несущие чужеродный генетический материал, экспрессируемый в клетках глутаматпродуцирующих бактерий. Из штамма

*Corynebacterium glutamicum* выделены умеренные фаги, показана возможность трансфекции протопластов нескольких штаммов бактерий, имеющих разные видовые названия.

Что касается бактерий р. *Bacillus* - грамположительных, спорулирующих, аэробных бактерий, то они являются эффективными продуцентами *lys*, *trp* и др. Здесь классическим подходом является генетическая трансформация и фаговая трансдукция. Разработаны методы клонирования генов в клетках бацилл с использованием в качестве векторов плазмид стафилококков и стрептококков. На основе этих плазмид и плазмид *E. coli* созданы гибридные плазмиды, которые могут нести крупные фрагменты ДНК и реплицироваться как в бациллах, так и в колах.

*E. coli* и *Serratia marcescens* - популярный селекционно-генетический объект - относятся к сем. *Enterobacteriaceae*, грамотрицательные, неспорообразующие бактерии, аэробы, нефотосинтезирующие. Как объект селекционно-генетических работ *E. coli* стала рассматриваться лишь с развитием методологии геной инженерии, которая позволяет клонировать и амплифицировать генетический материал, что может приводить к сверхсинтезу целевого продукта. *S. marcescens* - почвенный и водный организм. Хромосомные гибриды между ним и *E. coli* не обнаружены, хотя возможна передача эписом. Генетическая рекомбинация *S. marcescens* осуществляется путем трансдукции фагом PS20. Все сведения о получении продуцентов аминокислот на основе *S. marcescens* поступают от промышленной группы Tanabe Seiyaku (Япония).

## 10.2 МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты группируют по исходному веществу, которое после биохимических превращений составляет основную часть углеродного остова их молекул. Выделяют семейства:

- аспарагиновой кислоты (лизин, аспарагин, треонин, метионин, изолейцин);
- пировиноградной (аланин, валин, лейцин);
- глутаминовой (пролин, аргинин, глутамин);
- серина (глицин, цистеин, серин);
- ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан);
- гистидин.

Пути биосинтеза аминокислот, за исключением гистидина, разветвлены, т. е. одно и то же соединение служит субстратом для двух ферментов, конкурирующих за это вещество и превращающих его в различные аминокислоты.

Уровень синтеза аминокислот в клетке строго согласован с их потребностью и регулируется на разных уровнях:

- на уровне терминации транскрипции (негативный контроль - репрессия, позитивный контроль - индукция);
- на уровне аттенюации (работы Yanofsky, когда препятствием для транскрипции является наличие перед структурными генами аттенюатора);
- на уровне активности ферментов пути биосинтеза (ретроингибирование).

Целью селекционной работы является преобразование метаболизма таким образом, чтобы вызвать сверхпродукцию желаемой аминокислоты. Это может быть достигнуто за счет:

- генетического блока первого фермента боковой цепи биосинтеза;
- отбора мутантов с нарушенной регуляцией синтеза целевого продукта (в основном за счет аналогорезистентных мутантов);
- использования аналога в сочетании с аминокислотами боковой цепи биосинтеза, что связано с поливалентным характером регуляции общего участка пути;
- генетического конструирования, если для данного штамма разработана система генетического обмена.