

### Лекция 3

#### Способы генетического конструирования штаммов-продуцентов *in vivo*

Мутагенез *in vivo*. Типы мутаций, используемые для получения продуцентов. Индуцированный мутагенез. Типы мутагенов, используемых при индуцированном мутагенезе.

Мобильные генетические элементы про- и эукариот. Характер мутаций, вызываемых мобильными генетическими элементами. Транспозонный мутагенез. Векторы, используемые для введения транспозонов.

Способы отбора мутантов. Методы повышения продуктивности мутантов.

Как было отмечено ранее, природные штаммы микроорганизмов не способны продуцировать в среду такое количество метаболита, которого было бы достаточно для его промышленного производства. Метаболизм клетки подвержен строгой и четкой регуляции, и поэтому для использования штамма микроорганизма в качестве промышленного продуцента эта регуляция должна быть изменена таким образом, чтобы использовать биосинтетический аппарат клетки для получения максимального количества необходимого метаболита. Одним из основных методов достижения поставленной цели является мутагенез.

Мутации, приводящие к сверхсинтезу продукта, могут затрагивать различные гены: структурные, регуляторные, участвующие в транспорте и деградации метаболита и т. д.

#### 3.1 типы мутаций, используемые для получения продуцентов

По характеру локализации различают мутации:

- цитоплазматические;
- ядерные.

Материалом для селекции продуцентов служат ядерные мутации, затрагивающие хромосомные генетические детерминанты.

Ядерные мутации подразделяются:

- на генные (мутации на уровне отдельных генов);
- хромосомные (изменение структуры хромосом);
- геномные (изменение числа хромосом).

Генные мутации связаны с изменением последовательности нуклеотидов в пределах одного гена. В зависимости от механизма таких изменений различают:

- делеции (выпадение одного или нескольких оснований);
- вставки лишней пары нуклеотидов;
-

- транзиции (замена одних нуклеотидов на другие так, что это не меняет ориентации пуринов-пиримидин в пределах пары);
- трансверсии (замены пар нуклеотидов, изменяющие ориентацию пуринов-пиримидин).

Генные мутации связаны с явлением таутомеризации, которое влечет за собой изменение химических свойств.

Транзиции и трансверсии часто приводят к миссенс-мутациям (мутации с изменением смысла), в которых последовательность кодирующего триплета оснований после замены кодирует уже другую аминокислоту. Часть мутаций с заменой оснований приводит к возникновению нонсенс-мутантов (бессмысленные мутации). Такие мутации приводят к образованию кодонов, не кодирующих никакой аминокислоты. Синтез белка в измененном кодоне прерывается, а образующиеся фрагменты белковой молекулы функционально неактивны из-за быстрого их протеолиза. Если мутация лишь частично нарушает функцию гена и новая аминокислота сходна с той, которая кодировалась геном дикого типа, то говорят о leaky-мутациях.

Делеции и вставки могут являться причиной frame-shift-мутаций (или мутаций со сдвигом рамки считывания), в результате чего синтезируется неактивный белок с измененной последовательностью аминокислот. При протяженных делециях, в результате которых удаляется значительная часть гена, синтезируются неактивные фрагменты белковых молекул.

Хромосомные мутации подразделяются:

- на делеции участков хромосомы;
- дефишенсы (концевые нехватки, которые являются, по сути, частным случаем делеций);
- инсерции (вставки в определенные участки хромосомы);
- дупликации или амплификации (удвоения или умножения участков хромосомы);
- инверсии (изменение чередования генов в хромосоме);
- транслокации (обмен участками между негомологичными хромосомами);
- транспозиции (перемещение небольших участков хромосомы в пределах одной хромосомы или между разными хромосомами).

Хромосомные перестройки могут вызвать как утрату функций, так и возникновение новых. Результатом этого может явиться возникновение новых белков, уменьшение либо увеличение продукции определенных метаболитов.

### 3.2 ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ. МУТАГЕНЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ СЕЛЕКЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ

По своему происхождению мутации бывают спонтанными и индуцированными. Спонтанные мутации возникают с низкой частотой (около  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ ). Эта возможность должна учитываться при выборе продуцентов. Для того чтобы отобрать такие мутанты, необходимо проанализировать огромное количество клонов (до миллиарда) на предмет интересующих метаболических отклонений.

В селекции продуцентов наибольший интерес представляют индуцированные мутанты.

По своей природе мутагены подразделяются на: физические, химические и биологические.

Выбор мутагена определяется:

- 1) типом мутации, которую необходимо получить;
- 2) эффективностью мутагена в отношении данного микроорганизма.

Начиная мутагенез, нужно четко осознавать, какой именно тип мутанта соответствует поставленной задаче. Например, если нужно получить мутант с устойчивым генетическим маркером, с помощью которого можно будет идентифицировать мутант на всех этапах эксперимента, то следует отбирать штамм с неревертирующей мутацией, например, делецией. Если стоит задача выявить взаимосвязь между структурой какого-либо белка и его функцией, то наиболее подходящими будут точечные мутации.

Среди физических агентов используются УФ-облучение и радиация. УФ-облучение вызывает димеризацию пиримидинов и является мутагеном широкого спектра действия. При использовании этого мутагена приводит к образованию мутантов с транзициями, трансверсиями и делециями. Эффективность УФ-облучения довольно высока, однако высокая частота мутаций достигается за счет низкой выживаемости клеток. Кроме того, такие мутанты хорошо восстанавливаются репарационными механизмами клеток. Рентгеновское излучение и техника быстрых нейтронов приводят к разрывам хромосом, вызывая делеции и инверсии. Мутагенный эффект этого метода довольно высок, однако его применение требует специального оборудования.

Более широкое применение нашли химические мутагены: аналоги оснований, азотистая кислота, нитрозогуанидин (НГ), этилметансульфонат (ЭМС), акридиновые красители и т. д.

Аналоги оснований вызывают транзиции и трансверсии в результате ошибок репликации, однако эффективность их действия очень низка.

Гидроксиламин и азотистая кислота, вызывающие дезаминирование

нуклеотидов, способствуют возникновению делеций и транзиций.

Акридиновые красители вызывают интеркаляцию между основаниями во время репликации и способствуют возникновению мутаций со сдвигом рамки считывания.

Наиболее эффективными из химических агентов является нитрозогуанидин (НГ), который вызывает алкилирование оснований в репликативной вилке и образует мутанты с транзициями, трансверсиями и делециями. Эффективность этого соединения очень высока.

Этилметансульфонат, по сравнению с НГ, вызывает меньше множественных мутаций и способствует алкилированию гуанина, в результате чего с высокой частотой образуются транзиции и трансверсии.

При обработке химическими факторами следует соблюдать условия, способствующие максимальному проявлению мутагенной активности. Большую роль в этом играют рН раствора, время обработки, температурный режим. Так, НГ при обработке энтеробактерий, дрожжей наиболее эффективен при рН 6,0-6,5, у актиномицетов - при 9,0, у псевдомонад - при 5,5. Иногда химический агент более активен в газовой фазе, а не в жидкой среде. У актиномицетов и коринебактерий, обработанных парами диэтилсульфита, появляется в несколько раз больше морфологических мутаций, чем при обработке в водном растворе.

Доза воздействия физических мутагенов выражается в единицах излучения, соответствующих типу лучей. Доза химических мутагенов характеризуется концентрацией мутагена и временем экспозиции при соответствующей температуре.

При выборе дозы мутагена ориентируются на показатель выживаемости обрабатываемой культуры, который определяется процентным отношением числа колоний, выросших после посева мутагенизированной культуры к числу колоний, выросших после посева той же, но не обработанной мутагеном культуры клеток. Выживаемость зависит от дозы мутагена, от индивидуальной чувствительности штамма к летальному эффекту мутагена. В селекции используются дозы, обеспечивающие выживаемость клеток в диапазоне от 0,1 до 50-80 %.

Значительно шире в современной селекции продуцентов применяются биологические агенты - транспозоны и гены-мутаторы. Гены-мутаторы образуются в результате мутаций, возникающих в генах, ответственных за репликацию ДНК либо участвующих в механизмах репарации.

Транспозоны способны встраиваться в различные участки хромосомы. Перемещение мобильных генетических элементов в пределах одного или нескольких репликонов может вызывать практически все типы хромосомных перестроек.

Внедрение транспозона в нуклеотидную последовательность какого-либо гена приводит к нарушению непрерывности этого гена и его инактивации. В результате такого встраивания получаются *мутанты с двойным фенотипом*:

- инактивация гена приводит к утрате функции, которую он контролирует;
- приобретение устойчивости к определенному антибиотику, которую кодирует ген транспозона.

Кроме того, включение и последующее вырезание транспозонов может являться причиной генных мутаций, происходящих в геноме. Включаясь перед генами, транспозоны могут вызвать «полярный эффект» (т. е. подавление экспрессии генов, расположенных вслед за внедрившимся элементом).

На основе применения транспозонов создаются *методы транспозонного мутагенеза*.

Чтобы осуществить транспозонный мутагенез необходимо иметь вектор для доставки транспозона. В качестве векторов обычно используют фаги или плазмиды, которые можно легко элиминировать из бактерии-реципиента.

*Фаговые векторы* обычно получают на основе умеренных фагов X, *Mi* и др. Для получения таких векторов фаги размножают на клетках штаммов, содержащих транспозоны в каком-либо репликоне. Получают фаголизат, который используют для заражения бактерий, чувствительных к антибиотику. Производят отбор устойчивые к антибиотику трансдуктантов, среди которых отбирают варианты, лизогенные по фагу, содержащему транспозон. Такой фаг при последующей инфекции сообщает устойчивость к антибиотикам всем лизогенным клеткам.

Так, в экспериментах с бактериями *E. coli* используют вектор Xb221, у которого делеция захватывает *att-сай* и гены *int* и *xis*, что препятствует интеграции фага в бактериальную хромосому, но позволяет включать в его геном транспозоны Tn5, Tn9, Tn10. Кроме того, вектор несет температурочувствительную мутацию, которая позволяет отбирать мутанты при повышенной температуре. Осуществляя инфекцию таким фаговым вектором, на селективных средах отбирают транспозанты, возникающие с частотой  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  в зависимости от типа транспозона.

Созданы также фаговые векторы на основе фага P22 - для *S. typhimurium* - и фага P1 - для *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактерий.

В качестве плазмидных векторов для доставки транспозонов используют температурочувствительные мутантные плазмиды. Клетки, несущие в составе такой плазмиды транспозон, высевают на селективную среду и культивируют при повышенной температуре. При этом плаزمид элиминируется и устойчивость к антибиотику появляется в результате внедрения транспозона в хромосому.

Элиминировать плазмидный вектор можно также используя реципиент, в котором есть плазида той же группы несовместимости, что и вектор. Отбор трансконъюгантов ведут по признаку, детерминируемому транспозоном.

Большим достижением транспозонного мутагенеза является введение с использованием плазмид широкого круга хозяев транспозонов, ранее обнаруженных у энтеробактерий и псевдомонад, в клетки других бактерий. На основе плазмид, имеющих широкий круг хозяев, созданы универсальные системы для транспозонного мутагенеза этих микроорганизмов. Так, во ВНИИ генетики сконструирована плазида pAS8-121, реплицирующаяся только в клетках *E. coli*, которая осуществляет транспозицию Tn5 и Tn7 в хромосому *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Плазида pRK2013, реплицирующаяся только в энтеробактериях, легко осуществляет транспозиции в *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium japonicum* и др.

Транспозоны с использованием трансдуцирующих фагов применяются для осуществления локализованного мутагенеза *in vivo*. Фаголизат получают из клеток штамма, несущего транспозон, встроенный рядом с интересующим геном. Затем обрабатывают его мутагеном и используют для трансдукции какого-либо реципиентного штамма. Отбор трансдуктантов проводят на среде с соответствующим антибиотиком по приобретению устойчивости.

Важнейшей характеристикой полученных мутантов является их устойчивость. Некоторые мутанты способны ревертировать, причем с высокой частотой, что нужно учитывать при конструировании штамма-продуцента.

### 3.3 МЕТОДЫ ОТБОРА МУТАНТОВ

Успех работы зависит от правильного подхода к селекции мутантов. Наиболее эффективным является прямой отбор интересующих мутантов, т. е. отбор по росту на селективных средах. Таким образом получают мутанты, устойчивые к фагам, антибиотикам, утилизирующие новые субстраты и т. д. Иногда для этого приходится конструировать специальные штаммы. Например, мутации, затрагивающие катаболизм нуклеозидов у *E. coli*, отбираются у тиминового ауксотрофов как варианты со сниженной потребностью в тимине.

Для обнаружения мутантов применяют разнообразные индикаторы.

Например, внесение в среду трифенилтетразолия позволяет отобрать на колонии бактерии не сбрасывающие лактозу. Внесение этого соединения в среду позволяет идентифицировать на чашке клоны, сбрасывающие лактозу (не окрашены) и клоны, не сбрасывающие лактозу (приобретают красный цвет). Для идентификации используются специальные среды, позволяющие визуализировать гидролиз их компонентов разнообразными ферментами (лецитиназой, уреазой и т. д.).

В качестве индикатора могут быть использованы тест-культуры (ауксотрофы, которые вырастают только в том случае, если мутант продуцирует необходимый метаболит). Для отбора мутантов применяется также метод отсроченного антагонизма, а также явление синтрофизма.

Для облегчения отбора мутантов также используют метод непрямого отбора мутантов с помощью реплик. Различные модификации этого метода широко используются для выделения ауксотрофных мутантов и мутантов, чувствительных к химическим и биологическим агентам.

Отбор мутантов с повышенным уровнем продукции.

Для отбора мутантов с повышенным уровнем продукции есть два альтернативных пути:

- 1) отбор случайных мутаций после оценки уровня продукции желаемого вещества;
- 2) отбор по данному количественному признаку среди мутантов с определенным фенотипом.

### **Отбор случайных (непредсказуемых) мутаций.**

Отбор случайных мутаций применяют тогда, когда не известен путь синтеза метаболита и его регуляция. Этот метод отбора всегда осуществляется в несколько последовательных этапов, поэтому его часто называют ступенчатым отбором. *Суть метода заключается в следующем:*

- Исходная культура обрабатывается мутагеном, взятым в нескольких дозах.
- Отбирают 100 клонов, выросших после воздействия каждой отдельной дозы мутагена и определяют уровень продукции метаболита. Уровень продукции выражают в процентах по отношению к уровню продукции исходной культуры и распределяют в вариационном ряду.
- Полученные вариационные ряды, число которых соответствует числу примененных доз, сравнивают с контрольным рядом.
- Отбирают плюс-варианты и оценивают их продукционную способность в нескольких повторах.

- Выбирают варианты, дающие максимальную продукцию, и еще раз проверяют их уровень продукции после 2-3 пересевов на агаризованной среде.
- Все данные суммируются и обрабатываются статистически.
- Выбирают вариант, уровень продукции которого достоверно превышает уровень продукции исходного штамма.

Последовательные этапы отбора, проводимого непосредственно по количественному признаку, позволяют «собрать» в геноме продуцента группу мутаций, сочетание которых и обеспечивает высокий уровень продукции. Такой подход широко применяется для получения сверхпродуцентов аминокислот и особенно антибиотиков. С большим эффектом он применялся в течение многих десятилетий. Классическим примером является создание Висконсинской серии продуцентов пенициллина, которая была осуществлена в США на штамме *Penicillium chrysogenum* с применением различных физических и химических мутагенов. Селекция штаммов этой серии, продолжавшаяся более 30 лет, позволила повысить уровень продукции пенициллина в несколько тысяч раз по сравнению с уровнем исходного штамма.

### **Отбор среди мутантов с определенным фенотипом.**

Этот метод применяют, когда известен путь биосинтеза метаболита и его регуляция.

#### Ауксотрофные мутации.

Наибольший интерес для селекции продуцентов представляют ауксотрофные мутации. Нарушая путь синтеза какого-либо метаболита, ауксотрофная мутация может повысить выход целевого продукта за счет перераспределения потока общих предшественников в разветвленных путях биосинтеза, уменьшения или невозможности дальнейшего превращения нужного продукта, а также блокирования образования ингибитора или корепрессора синтеза желаемого продукта. Кроме того, ауксотрофность не всегда вызывается блоком в пути синтеза; например, для аминокислот она может быть вызвана мутацией, нарушающей включение их в белки.

Для повышения выхода ауксотрофных мутантов широко используется метод пенициллинового обогащения.



Обработывая популяцию клеток антибиотиками пенициллинового ряда, лизирующими клеточную стенку интенсивно растущих клеток, селекционер оставляет в суспензии только мутанты, не растущие без добавки. Эту манипуляцию проводят многократно, повышая частоту мутантов в миллион раз.

В популяции спорообразующих форм (например, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Clostridium*) долю ауксотрофных мутантов можно повысить прогреванием культуры, поскольку чувствительность к повышенной температуре вегетативных клеток выше, чем спор. При нагревании ауксотрофы сохраняются в виде спор, а затем прорастут.

У мицелиальных грибов для выделения ауксотрофных мутантов используют метод обогащения фильтрацией. При культивировании на минеральных средах прототрофные клетки делятся и образуют конгломераты, которые задерживаются фильтрами, а ауксотрофы промываются в фильтрат.

Отбор среди ревертантов ауксотрофных мутантов, у которых ауксотрофность вызвана дефектом определенного фермента в пути синтеза метаболита, позволяет получить мутанты с восстановленной каталитической, но утраченной регуляторной функцией фермента. Кроме того, могут быть выделены мутанты с неполным восстановлением каталитической функции. Такие реверсии затрагивают один и тот же ген ауксотрофа и имеют характер внутригенных супрессорных мутаций. Если же ауксотрофность вызвана нарушением включения аминокислоты в белки, то у супрессорных мутантов такого типа восстановление способности к прототрофному питанию может быть вызвано мутацией другого гена, например, регуляторного. Такая супрессорная мутация, нарушая регуляцию синтеза продукта, способствует его сверхсинтезу. Это характерно, как правило, для генных мутаций. При хромосомных мутациях восстановление функции происходит только в 10 % случаев. При этом может активироваться альтернативный метаболический путь либо изменяться специфичность других белков, которые восполняют функцию поврежденного. Например, у мутантов *E. coli* по гену *lacZ*, кодирующему синтез фермента *β*-галактозидазы, можно получить ревертанты, утилизирующие лактозу. Однако продукт гена *lacZ* не связан с синтезом галактозидазы и приобретает способность расщеплять лактозу в результате вторичной мутации. А ауксотрофные по гистидину мутанты *Bacillus subtilis*, дефектный ген которых сцеплен с генами триптофанового оперона, могут при реверсии давать мутации в регуляторной области *trp*-оперона, что приводит к сверхсинтезу триптофана.

## Мутанты, резистентные к структурным аналогам аминокислот или азотистых оснований.

Конструирование продуцентов *in vivo* существенно ускоряется, если использовать селективные и полуселективные методы отбора мутантов. Многие из таких методов основаны на использовании структурных аналогов естественных метаболитов. Отбор аналогорезистентных мутантов - один из широко применяемых и эффективных методов получения и улучшения штаммов продуцентов первичных метаболитов. Структурные аналоги действуют на регуляторные системы биосинтеза, подобно природному метаболиту, но не могут выполнить основной функциональной роли этого метаболита в клетке. Так, аналог аминокислоты имитирует ее избыток в среде и вызывает репрессию и ингибирование, но при этом не может заменить аминокислоту функционально, т. е. не способен включиться в белок или, включаясь, приводит к образованию дефектных белков, вызывая в обоих случаях голодание клетки по природной аминокислоте и останавливая рост.

Например, в селекции продуцентов триптофана широко применяют его структурные аналоги: метилтриптофан, ацетилтриптофан, D-триптофан и др. Действуя как ретроингибиторы или корепрессоры, эти аналоги выключают синтез самого L-триптофана. Однако они не могут заменить его функционально, поэтому на минимальной среде, содержащей аналог триптофана, выживают и растут лишь те мутанты, у которых нарушена негативная регуляция биосинтеза триптофана, что приводит к его сверхсинтезу. Такие мутанты называют регуляторными. У отобранных аналогорезистентных мутантов очень важно установить природу того регуляторного нарушения, которое привело к сверхсинтезу или повысило уровень продукции метаболита. Для этого у исходного штамма и мутанта определяют удельную активность регуляторного фермента в пути синтеза данного метаболита и изучают действие этого метаболита и других ингибиторов на активность фермента *in vitro*. Типичными мутационными нарушениями, приводящими к сверхсинтезу у отбираемых по продуктивности аналогорезистентных мутантов, являются:

- утрата чувствительности регуляторного фермента к ретроингибированию (ингибированию конечным продуктом);
- нарушение механизма репрессии его синтеза, что обеспечивает конститутивный синтез продукта (это связано с нарушениями в белке-репрессоре или О и Р);
- увеличение синтеза предшественников.

Имеются данные о том, что регуляторным мутациям у аналогорезистентных продуктивных мутантов сопутствуют и транспортные мутации, нарушающие поступление аналога и природного метаболита в клетку. Транспортные мутации без регуляторных вызывают продукцию метаболита очень редко и в незначительных количествах.

Для наглядности можно рассмотреть свойства нескольких классов мутантов *E. coli*, отбираемых по резистентности к аналогу триптофана.

Мутанты *Escherichia coli*, резистентные к 5-метилтриптофану

<i>Мутантный ген</i>	<i>Эффект мутации</i>
Регулятор trpR	Конститутивный синтез ферментов оперона
Оператор	Частично конститутивный синтез ферментов оперона
Структурный ген trpE	Десенсбилизация антранилатсинтетазы к триптофану
Структурный ген пермеазы	Нарушение транспорта триптофана в клетку
Структурный ген аминоксил-тРНК-синтетазы	Изменение аминоксил-тРНК-синтетазы

Способностью продуцировать триптофан характеризовались мутанты только трех первых классов.

Для получения аналогорезистентных мутантов суспензию клеток исходной культуры после обработки мутагеном высевают газоном на чашки Петри с агаризованной минимальной средой, содержащей аналог в заранее подобранной концентрации, ингибирующей рост исходной культуры. Через несколько суток инкубации на чашках появляются колонии мутантов, преодолевающих действие аналога. Часть таких мутантов имеет мутации, нарушающие регуляцию синтеза желаемого метаболита и вызывающие его сверхсинтез, другая часть - мутации, нарушающие транспорт аналога в клетку, могут быть и другие мутации.

Зачастую проводят несколько этапов селекции, используя различные аналоги, а также повышая их концентрации. Так, например, выход L-аргинина у продуцирующего его штамма *Corynebacterium glutamicum* был повышен от 1,5 г/л (на начальных этапах ступенчатого отбора) до 25 г/л. При этом :

- была получена серия ауксотрофных мутаций, которые отсекали побочные пути синтеза;
- увеличен синтез предшественников аргинина;
- получены регуляторные мутанты этих бактерий, устойчивые к структурным аналогам аргинина.

У отобранного продуктивного штамма часто определяют чувствительность к более высоким концентрациям аналога, чем ранее использованная. Если такая чувствительность имеется, проводят еще один, а иногда и несколько этапов отбора на постепенно повышающихся концентрациях аналога. Нередко используют другие аналоги того же метаболита на следующих этапах отбора.

#### Мутанты, резистентные к антибиотикам.

Чаще всего этот метод отбора применяют в селекции продуцентов антибиотиков. Различные антибиотики имеют разный механизм действия на микробную клетку: некоторые являются ингибиторами белкового синтеза, другие - мембранотропными или ДНК-тропными агентами.

Получают резистентные к антибиотикам мутанты высевам суспензии спор или клеток на чашки с агаризованной средой, содержащей различные концентрации антибиотиков. Показано, что антибиотики могут индуцировать у выживших колоний появление морфологических мутантов, а также большую изменчивость по признаку антибиотикообразования. Эффективность действия антибиотика в указанном отношении очень сильно зависит от особенностей штамма, подвергаемого такому действию. В ряде случаев значительный эффект в селекции на повышение продуктивности получают с помощью собственного (выделяемого исходной культурой) антибиотика, в других - эффективно применение другого антибиотика. Селекцию с применением антибиотиков проводят в несколько этапов, постепенно повышая концентрацию препарата.

#### Мутанты с морфологическими изменениями.

Подобный вид отбора основывается на том факте, что высокопродуктивные штаммы, отобранные только по количественному признаку, часто имеют морфологические изменения по сравнению с исходной культурой.

При таком отборе рассчитывают на корреляцию между количественным и морфологическим признаками, а также на плейотропный эффект мутаций, вызывающих резкое повышение уровня продукции, и как следствие, морфологическое изменение. Продуктивные штаммы часто оказываются малоспорулирующими или, наоборот, имеют повышенную споруляцию, они могут потерять пигмент или приобрести новый, могут изменить величину или форму колоний.

### 3.4 СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ МУТАНТОВ

В селекции продуцентов ферментов используется метод получения конститутивных мутантов. Для этого применяют метаболизируемые аналоги субстратов, не способных вызвать индукцию синтеза. На минимальной агаризованной среде с такими аналогами растут только мутанты, синтезирующие соответствующие ферменты конститутивно.

Что касается синтеза вторичных метаболитов (пигментов, гормонов, витаминов, антибиотиков и т. д.), то известно, что он подавляется легко усвояемыми источниками углерода, азота и энергии. В таком случае получают мутанты, не чувствительные к катаболитной репрессии. При этом используют неметаболизируемые аналоги глюкозы - в-метилглюкозидазы и 2-дезоксиглюкозы. Они вносятся в среду вместе с субстратом, вызывающим катаболитную реPRESSION и позволяет отобрать мутанты с нарушенной системой транспорта глюкозы или измененной регуляцией генов, контролирующей усвоение этих субстратов. Например, мутация *lac* UV5 в промоторной области *lac*-оперона делает синтез ферментов этого оперона нечувствительной к присутствию глюкозы в среде.

Мутанты, нечувствительные к азотной репрессии, получают как формы, устойчивые к неметаболизируемым аналогам аммиака - метиламину, диметиламину, диэтиламину и т. д. Эти соединения также вносят в среду одновременно с соединениями, усвоение которых подвержено репрессии аммиаком. На такой среде можно отобрать 3 типа мутантов:

- мутанты с нарушенной общей регуляцией Atr-генов;
- мутанты с измененной регуляцией синтеза ферментов, контролирующей усвоение данного источника азота;
- мутанты с нарушением транспорта аммиака (и его аналогов) в клетки.

Мутации, сопровождающиеся изменением в системе общей регуляции метаболизма вследствие нарушений процессов транскрипции и трансляции, получают как варианты, устойчивые к антибиотикам, которые ингибируют соответствующие процессы. Например, мутации вызывающие устойчивость к Rif, повреждают РНК-полимеразу. Мутации устойчивости к Sm - белок малой субъединицы рибосомы. Устойчивость к этим антибиотикам повышает выход лизина у продуцентов *Corynebacterium glutamicum*. Мутация устойчивости к тиострептону - повреждение белка большой субъединицы.

Энергетическое состояние клетки также оказывает существенное влияние на процессы биосинтеза. Так, сверхсинтез пролина мутантами *Brevibacterium flavum* (Phe<sup>-</sup> His<sup>-</sup>) связан с увеличением у них внутриклеточного пула АТФ. Однако избыток неорганического фосфата в среде повышает пул АТФ и подавляет синтез антибиотиков у *Streptococcus aureofaciens* и *Streptococcus griscus*. Энергетические процессы могут быть изменены в желательном направлении у мутантов, устойчивых к ингибиторам дыхания, а также аналогам продуктов ЦТК и гликолиза.

Продуктивность промышленных штаммов микроорганизмов может быть повышена за счет снятия контроля с систем транспорта. Например, промышленные продуценты глутамата (*Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*) зависимы по биотину. В условиях лимита по биотину они начинают эффективно продуцировать глутаминовую кислоту. А поскольку биотин участвует в синтезе жирных кислот клеточной мембраны, то результатом такого лимита будет дефект мембраны. Такая клетка становится проницаемой для многих молекул, в том числе и глутамата. Снижение внутриклеточного пула глутамата вызывает его усиленный синтез.

Максимальная продукция другого первичного метаболита - ИМФ (инозинмонофосфата) - аденинзависимыми мутантами *Brevibacterium ammoniagenes* наблюдается при ограниченном содержании в среде ионов Mn<sup>2+</sup>. В этих условиях изменяется белковый и липидный состав мембраны бактерий, и она становится проницаемой для ИМФ и других низкомолекулярных соединений.

Увеличение проницаемости мембраны может стимулировать продукцию большинства вторичных метаболитов. По-видимому, в этих случаях облегчается выход продукта из клетки и устраняется негативный контроль его биосинтеза.

Большой практический интерес представляют собой мутации устойчивости к антибиотикам, подавляющим синтез компонентов клеточной стенки и мембраны. Мутанты, устойчивые к пенициллину, бацитрацину, нистатину, полимиксину, кабицидину и др. могут быть получены на селективных средах с ингибирующими концентрациями этих антибиотиков. Так, устойчивые к пенициллину мутанты *C. glutamicum* продуцируют на 15-20 % больше лизина, чем исходные чувствительные штаммы.

Мутанты *Cephalosporium acremonium*, устойчивые к нистатину, трихомицину и кабицидину, выделяют в среду более 10 г/л цефалоспорины. Резистентные к кабицидину мутанты *Fusarium* эффективно продуцируют эргостерол и щелочную протеиназу. А мутант *Trichoderma reesei*, устойчивый к этому антибиотику, секретирует повышенное количество целлюлазы.

Однако неспецифическое повышение проницаемости мембран часто приводит к накоплению в культуральной жидкости большого числа разных соединений. Это уменьшает эффективность образования целевого продукта и затрудняет его выделение и очистку. Кроме того, нарушение нормальной структуры мембраны снижает жизнеспособность микроорганизмов. Поэтому чаще пытаются получить мутанты, у которых нарушен активный транспорт целевого продукта в клетки. Обнаружено, что мутанты *Brevibacterium flavum*, у которых нарушен транспорт глутамата в клетки, продуцируют его на 10 % больше, чем исходный штамм.

Таким образом, с помощью различных методов, нарушающих регуляцию метаболизма, можно вести отбор желаемых продуцентов.

Проанализировав вышесказанное, можем заключить, что мутагенез *in vivo* имеет свои достоинства и недостатки.

#### Достоинства мутагенеза in vivo:

- 1) позволяет получить продуценты у генетически неисследованных штаммов, у которых не исследован путь синтеза метаболитов;
- 2) дает возможность установить регуляторные механизмы исследуемого биосинтеза и расшифровать их пути.