

Лекция 11

Селекция продуцентов аминокислот.

Селекция продуцентов аминокислот семейства аспарагиновой кислоты. Селекция продуцентов ароматических аминокислот. Селекция продуцентов аминокислот семейства глутаминовой кислоты. Селекция продуцентов пролина и гистидина.

11.1. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ СЕМЕЙСТВА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Наиболее эффективными и уже более 35 лет используемыми в промышленности являются глутаматпродуцирующие бактерии. Это объясняется тем, что они имеют более простую, чем другие бактерии, систему регуляции синтеза данных аминокислот.

11.1.1. Продуценты лизина

Биосинтез от аспартата до лизина у коринебактерий регулируется только на уровне фосфорилирования аспарагиновой кислоты. Реакция катализируется аспартокиназой, которая у дикого типа ингибируется лизином и треонином. Поскольку синтез лизина и треонина сопряжен, то немаловажен здесь способ регуляции треонина: ретроингибирование на уровне активности гомосериндегидрогеназы (ГД), а также репрессии ее синтеза метионином. Общий предшественник - аспартатполуальдегид - расходуется у коринебактерий в основном на синтез треонина, так как активность ГД выше активности ДДПС в 5 раз.

У штаммов *C. glutamicum* и *Br. flavum* известны три типа лизинпродуцирующих мутантов:

- 1) ауксотрофы по гомосерину с отсутствием активности гомосериндегидрогеназы;
- 2) метионин- или треонинчувствительные штаммы с низкой активностью ГД;
- 3) аналогорезистентные мутанты, у которых аспараткиназа (АК) не чувствительна к ретроингибированию.

Наиболее высокий уровень продукции лизина наблюдается у продуцентов первого типа, что объяснимо тем, что блок по ГД направляет синтез в одном направлении. Кроме того, это снимает ретроингибирование треонином АК.

Продуценты второго типа (например, *B. flavum*) продуцируют меньше лизина вследствие сниженной активности ГД (в 20-40 раз). Рост таких мутантов задерживается высокими концентрациями треонина и метионина, однако и такие мутанты продуцируют до 20 г/л лизина на среде с глюкозой.

Мутанты третьего типа (получены преимущественно к аминокислоте ацетилцистеину) продуцируют избыточное количество лизина вследствие генетического изменения АК, которая становится нечувствительной к ретроингибированию лизином и треонином. Такие мутанты продуцируют до 15 г/л лизина. Интересно, хотя и осталось до конца не выясненной роль дополнительной устойчивости к некоторым аналогам лизина - у-метиллизину, карбобензоксизину и др. Резистентность к этим аналогам сама по себе давала незначительное увеличение выхода лизина - 1,5-3 г/л. Сочетание этого с резистентностью к ацетилцистеину и ауксотрофностью по аланину дает увеличение продукции лизина до 96 г/л.

Имеются сведения о положительном влиянии на продукцию лизина мутаций резистентности к аналогам пуринов, а также антибиотикам, нарушающим структуру клеточной стенки или функцию мембраны.

Использование этих сведений в сочетании с методом ступенчатой селекции дает превосходные результаты и наиболее продуктивные штаммы были получены именно таким путем. По данным фирмы Ajinomoto селекция штамма *Br. flavum* AJ11241, продуцирующего лизин, состояла из 5 этапов:

- 1) получение аналогорезистентных мутантов, устойчивых к аминокислоте ацетилцистеину (15 г/л);
- 2) индукция ауксотрофности по аланину (30 г/л);
- 3) получение резистентности к двум аналогам лизина - хлоркапролактаму и метиллизину (40 г/л);
- 4) получение мутанта, чувствительного к фторпирувату, что повышало конверсию пирувата в ЦУК - предшественник аспартата (50 г/л).

Среди продуцентов, полученных путем генетической рекомбинации, следует отметить работы фирмы Kyowa Hakko. Ими были получены два гибридных штамма на основе слияния протопластов с уровнем продукции 39-41 г/л лизина. Этот метод применяют также для повышения производственных показателей штаммов. Например, протопласты штаммы *Br. lactofermentum* сливали с протопластами продуцента глутаминовой кислоты, что позволило повысить скорость потребления глюкозы до 130 г/30 ч, а уровень продукции лизина - до 53 г/л.

Получены продуценты лизина на основе плазмидных штаммов *lactofermentum* и *C. glutamicum*. Векторами служили криптические плазмиды рАМ286 и рАМ330, выделенные из бактерий дикого типа, а реципиентами - лизинзависимые штаммы. У лучших трансформантов продуктивность составляла 2-2,5 г/л на среде с глюкозой.

В Индии получен аминоксилцистеиновый мутант *B. subtilis*, который на среде с глюкозой за 96 ч продуцировал до 21 г/л лизина.

В последнее десятилетие активно ведутся разработки продуцентов на основе *E. coli*. Французскими учеными создана гибридная плазида с 5 генами пути биосинтеза лизина (*asd*, *dapA*, *dapB*, *dapD*, *lysA*), которой трансформировали клетки реципиента, несущего две регуляторные мутации. У трансформантов продукция лизина достигала 6,5 г/л.

В патенте фирмы Ajinimoto описано получение плазмидного штамма *E. coli*, причем на плазмиде клонирован не какой-то определенный ген, а мутантный материал, содержащий детерминенты продуктивности по лизину. Однако продуктивность такого мутанта была невысока.

11.1.2. Продуценты треонина

Традиционными продуцентами треонина были и остаются коринебактерии, а также *S. marcescens* и *E. coli*. Этой группе бактерий также присущи все перечисленные особенности регуляции синтеза аминокислот семейства аспарагиновой кислоты.

Продуценты на основе коринебактерий получены у штаммов *Br. flavum*, *B. glutamicum*, *Br. lactofermentum*. Высокопродуктивные штаммы получены в результате мутаций, вызывающих снятие ретроингибирования ГД, а также репрессии ГД. Получение продуцентов треонина основано на получении аналогорезистентных мутантов к аминоксилцистеину, аминоксилвалериановой кислоте.

С обнаружением плазмид у коринебактерий было предпринято конструирование плазмидного продуцента треонина на основе *C. glutamicum*. На основе этого штамма с плазмидой конструировали гибридную плазмиду, несущую устойчивость к оксивалериановой кислоте. Однако такие трансформанты не давали большого выхода - 3 г/л.

Наиболее продуктивные продуценты созданы на основе бактерий *S. marcescens*. У исходного штамма сначала были получены ауксотрофные мутации, блокировавшие треониндезаминазу (ТА) и треониндегидрогеназу (ТД), которые превращают треонин в изолейцин. Затем вводили аналогорезистентную мутацию. При этом продуктивность штамма возрастала до 40,2 г/л.

Первые продуценты треонина на основе *E. coli* были ауксотрофными мутантами. Повышенный выход треонина у них был обусловлен депрессией комплекса АК-ГД. Определенный выход вносило блокирование лизинового ветки, что снимало репрессию с АК и ГД, а блокирование ТД приводило к отсеканию изолейциновой ветки. Ауксотрофность по треонину и изолейцину сочетали с регуляторными мутациями. Такие продуценты давали до 6 г/л на среде с глюкозой.

На основе штамма *E. coli* ATCC 21246 японской фирмой Kanegafuchi был получен интересный продуцент треонина. Вначале получили метиониновый ауксотроф, у которого затем заблокировали синтез изолейцина. Такой штамм давал до 8 г/л.

Относительно регуляции биосинтеза треонина у *E. coli* было сделано предположение, что фактором, лимитирующим образование треонина, является уровень синтеза ферментов, кодируемых треониновым опероном. Поэтому оперон был клонирован на векторе pBR 322. Реципиентом служил штамм *E. coli* с мутацией в гене *thrC*. Плазмидой трансформировали реципиентный штамм, при этом накопление треонина составило 13 г/л.

11.1.3. Продуценты изолейцина

Для получения продуцентов изолейцина одним из самых важных моментов является отключение регуляции синтеза его предшественника – треонина. Резистентные к аналогам треонина (аминовалериановая кислота) и изолейцина (метилтреонин) штаммы продуцировали до 14,5 г/л изолейцина. Причем после многоступенчатого отбора эти штаммы увеличивали продукцию вдвое.

Часто для получения продуцентов изолейцина используют полученные продуценты треонина. Так, штамм *C. Glutamicum* – продуцент треонина (до 8,5 г/л) после 7 этапов отбора с применением разнообразных аналогов дал до 12 г/л изолейцина.

Отечественные штаммы-продуценты изолейцина на основе *Br. Flavum* и *C. Glutamicum* были получены на основе ауксотрофов по гомосерину.

Сначала среди них отбирали ревертантов, продуцирующих изолейцин (такие мутанты восстанавливали активность ГД, но сохраняли утраченную чувствительность к треонину и изолейцину). Затем получали аналогорезистентные к О-метилтреонину мутанты. После ступенчатого отбора уровень накопления составил 19 г/л.

У коринебактерий плазмидные продуценты изолейцина получены на основе резистентного к аминвалериановой кислоте дикого типа *S. Glutamicum* из клеток которого выделена плазида РАМ286. После получения гибридной ДНК была проведена трансформация реципиента. Трансформанты, резистентные к АОВ, давали до 1,2 г/л изолейцина за 48 ч.

Фирма Tanabe Seiyaku получила резистентный к гидроксамату изолейцина мутант, который продуцировал до 3,5 г/л и нес две регуляторные мутации. Эти мутации путем трансдукции были перенесены в штамм, имевший 4 мутации. Трансдуктанты давали до 24,5 г/л изолейцина.

11.2. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ СЕМЕЙСТВА ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Способность к выделению в среду больших количеств глутаминовой кислоты – отличительная особенность штаммов дикого типа, принадлежащих к особой группе коринебактерий. Дикие типы таких бактерий могут продуцировать до 32-4 г/л глутаминовой кислоты. Поэтому все без исключения промышленные штаммы получены на основе этих микроорганизмов.

Активное исследование причин такой сверхпродукции стало проводиться не так давно. В середине 1980-х гг. японскими исследователями было показано, что синтез глутаминовой кислоты у *Br. Flavum* находится под контролем репрессии и ретроингибирования на уровне следующих ферментов:

- ингибирование активности глутаматдегидрогеназы глутаматом;
- синергидное ингибирование активности ФЕП-карбоксилазы а-кетоглутаратом и аспаратом;
- репрессия синтеза ФЕП-карбоксилазы глутаматом и аспаратом.

Столь жесткий контроль синтеза обеспечивает продукцию глутаминовой кислоты в объемах, достаточных для жизнедеятельности клетки, и сверхсинтез этого продукта природными штаммами микроорганизмов вызван особыми физиологическими условиями, в которых происходит торможение роста клетки. Клеточная мембрана в таких условиях претерпевает структурные и функциональные изменения и становится высокопроницаемой для аминокислот. Подобные условия создаются при лимите биотина в среде (синтез биотина связан с синтезом компонентов клеточной мембраны).

В результате интенсивного выхода образуемой глутаминовой кислоты из клетки ее внутриклеточная концентрация поддерживается на низком уровне, и регуляция синтеза конечным продуктом сильно ослаблена. Если же условия культивирования обеспечивают нормальный рост клеток, то глутаминовая кислота не вырабатывается в значительном количестве. В связи с высокой продуктивностью штаммов дикого типа и преимущественным использованием в производстве глутаминовой кислоты сырья, бедного по биотину (крахмал, уксусная кислота), сообщений о конструировании продуцентов на основе мутантов практически не было. Однако в последнее десятилетие появились разработки, связанные с конструированием *in vivo* и *in vitro*.

Фирма Ajinomoto патентует способ получения глутаминовой кислоты с использованием *C. Glutamicum* и *Br. Flavum* мутантов, которые отличались резистентностью к ингибиторам дыхания (малоновая кислота, $K_2S_2O_8$ арсенит натрия) или ингибитору реакции фосфорилирования АДФ (гидроксиламин, динитрофенол, гуанин).

Разработан процесс получения глутаминовой кислоты с использованием мутантов *C. Glutamicum* и *Br. Flavum*, устойчивых к аналогам пуринов и пиримидинов. Мутанты, отобранные по устойчивости к 6-азаурацилу, продуцировали до 31 г/л аминокислоты, тогда как дикий тип давал 2-3 г/л.

Процесс накопления глутаминовой кислоты можно контролировать с помощью изменения температурного режима культивирования. Температурочувствительность мутантов, по-видимому, связана со структурными изменениями в клеточной мембране, которые проявляются в клеточной мембране и способствуют выделению глутаминовой кислоты из клетки. Мутанты дикого типа продуцируют до 26 г/л аминокислоты, тогда как дикий тип давал до 6-11 г/л.

Одним из распространенных методов получения мутантов, продуцирующих сверхколичества глутаминовой кислоты является отбор мутантов по чувствительности к лизоциму, имеющих, по-видимому, некоторые дефекты клеточной мембраны. Некоторые из таких мутантов продуцируют глутаминовую кислоту с выходом 40 % от источника углерода.

Основным приемом в селекционной работе со штаммами-продуцентами глутаминовой кислоты является ступенчатый отбор после мутагенного действия.

Однако в последние годы наметилась тенденция генно-инженерного подхода к этой проблеме. В этих разработках используются плазмиды коринебактерий. В запатентованном фирмой Ajinomoto способе получения таких штаммов донорами хромосомной ДНК служат мутанты, устойчивые к кетомалоновой кислоте и чувствительные к повышенной температуре. Векторами служат плазмиды pAM286 и pAM330. Штаммы-реципиенты конструируют на основе доноров, получая у них ауксотрофную мутацию по глутаминовой кислоте. На глюкозосодержащих средах такие мутанты продуцировали до 10 г/л.

Показана возможность плазмидных штаммов-продуцентов глутаминовой кислоты у *E. Coli*. Однако сконструированные штаммы не отличаются достаточной продуктивностью.

11.3. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ПРОЛИНА

L-Пролин синтезируется из глутамата в результате его АТФ-зависимого восстановления. Реакция протекает ферментативно через образование ацилфосфата. Продукт самопроизвольно циклизуется и превращается в пролин.

В последние годы был разработан фирмой Tanabe Seiyaku ряд способов получения продуцентов пролина на основе энтеробактерий - *E. coli* и *S. marcescens*. Использование традиционных селекционно-генетических подходов с применением методики ступенчатого отбора позволило получить высокопродуктивные мутанты. Так, японскими учеными у *S. marcescens* был получен мутант, не усваивающий пролин в качестве источника углерода. На его основе получали мутанты, устойчивые к аналогу пролина 3,4-дигидропролина. На следующем этапе селекции использовали другой аналог пролина - тиазолиндикарбоксилат. Среди полученных мутантов наиболее продуктивные штаммы давали 25,6 г/л за 72 ч. На основе этого штамма был получен мутант, резистентный к аналогу пролина - азетидинкарбоновой кислоте, продуцирующий за 96 ч инкубации г/л пролина.

Перечисленные аналоги пролина токсичны и для *E. coli*. С их помощью получают мутанты *E. coli*, продуцирующие до 1 г/л пролина. Генетический анализ таких мутантов, устойчивых к аналогам пролина с десенсибилизированной глутаматкиназой (которая ингибируется пролином), показал, что нарушение регуляции биосинтеза пролина вызывает сверхсинтез данной аминокислоты, но этот пролин не выделяется в среду. Для экскреции пролина необходимы мутации, затрагивающие его транспорт (ген *putP*) или окисление (*putA*). Наиболее эффективно экскретируется пролин при блокировании обоих генов.

Получены продуценты пролина на основе *E. coli* с использованием клонирования генов биосинтеза этой аминокислоты. На векторе pBR322 клонированы гены мутанта, устойчивого к аналогам лизина и пролина. Гибридные плазмиды вводили в клетки *E. coli* и отбирали трансформанты. В результате получены трансформанты, продуцирующие до 0,8 г/л пролина.

Наиболее эффективный плазмидный продуцент *E. coli* был получен американской фирмой Betesda. На одной плазмиде объединили все три гена биосинтеза пролина - *proA*, B и C. На плазмиде клонирован температурочувствительный левый промотор бактериофага X, с которого инициировалась транскрипция пролиновых генов. Реципиентом служил мутант штамма K-12 с блоком по деградации пролина. Продуцент давал за 48 ч до 28 г/л пролина.

Что касается коринебактерий, то о регуляции биосинтеза пролина у них известно немного. Показано, что пролин не оказывает на свой синтез ни репрессирующего, ни ингибирующего действия. Вместе с тем полиауксотрофы, например *Br. flavum* (по гистидину, аргинину, изолейцину, метионину) на средах с глюкозой дают до 25 г/л пролина. Это объясняется тем, что выключены ключевые ферменты соответствующих путей синтеза, что создает в клетке у мутантов избыток углеродных предшественников и АТФ, который повышает активность первого и ключевого фермента пути синтеза пролина. Такие ауксотрофы дают до 15 г/л пролина.

В последние годы разработан метод индукции мутаций устойчивости к сульфаниламидам, что обуславливает накопление пролина в клетке. Если изолейциновый ауксотроф дает до 15 г/л, то его сульфатуанидинрезистентный мутант - до 29 г/л пролина.

Применение аналога пролина (3,4-дигидропролина) также позволяет повысить его продукцию. Такие мутанты продуцируют до 12-15 г/л. Существенные результаты достигнуты при использовании аналогов пуринов и пиримидинов при работе с *C. glutamicum*, *Br. lactofermentum*. Полученные мутанты продуцируют на среде с глюкозой до 38,5 г/л за 96 ч.

Попытки получить продуценты пролина методами генной инженерии предпринимаются на основе энтеробактерий - *E. coli* и *S. marcescens*. Наиболее удачные работы проведены на *E. coli*. В патенте ФРГ донором для клонирования служил мутант *E. coli*, устойчивый к дигидропролину. На его основе получены гибридные плазмиды, несущие структурные гены *proAB* и *proC*. Таким образом, на одной плазмиде были клонированы все гены пролинового синтеза (известно, что у *E. coli* гены *pro A, B, C* кодируют ферменты, катализирующие 2, 1 и 4 стадии синтеза пролина из глутамата; 3 стадия протекает неферментативно). В качестве реципиента был взят ауксотрофный по пролину мутант, который был снабжен еще и ауксотрофностью по лейцину. Трансформанты обладали продуктивностью до 16 г/л пролина.

Наиболее эффективный пролиновый продуцент (до 27 г/л) на основе генно-инженерных разработок был получен американской фирмой Betesda. На одной плазмиде были объединены три гена биосинтеза пролина, а также температурочувствительный левый промотор бактериофага X, с которого инициировалась транскрипция пролиновых генов. Реципиентом служил мутант штамма K-12 с заблокированным катаболизмом пролина. Плазмидный продуцент после повышения температуры продуцировал до 27 г/л пролина.

11.4. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ГИСТИДИНА

В селекции продуцентов гистидина традиционными объектами являются коринебактерии. В работе с этими бактериями японская фирма Kyowa Nakko использовала ступенчатый отбор:

1) получали ауксотрофные мутации по одной из трех ароматических аминокислот мутантов *C. glutamicum*. У таких мутантов было отмечено существенное повышение продукции гистидина (почти двухкратное);

2) получение регуляторных мутаций к аналогам гистидина (1,2,4-триазолаланин, 2-тиазолаланин). Лучшие варианты, устойчивые к обоим аналогам, продуцировали 6-8 г/л гистидина в среду с мелассой за 96 ч;

3) полученные продуценты использовали для получения устойчивых к аналогам пуринов (6-меркаптоэтанол, 8-азагуанин). Аналоги пуринов использовали с целью отбора мутаций, усиливающих синтез предшественников гистидина;

4) на следующем этапе селекции были использованы аналоги пиримидинов (4-тиаурацил, 6-азаурацил), ингибирующие реакцию образования ФРПФ. Получены штаммы, выделяющие до 14-15 г/л гистидина за 96 ч;

5) завершающим этапом в селекции продуцентов на основе коринебактерий является использование аналогов аминокислот (2-амино-3-оксивалериановая кислота, 3-амино-1,2,4-триазол, имидазол), сульфаниламидов, антибиотиков-ингибиторов РНК-полимеразы.

Японская фирма Tanabe Seiyaku на своем традиционном объекте *S. marcescens* добилась высокого уровня продукции гистидина. Получив серию аналогорезистентных мутантов, у которых был блокирован путь деградации гистидина, уровень его продукции составил 7 г/л.

Чтобы объединить в одном геноме регуляторные мутации, обнаруженные у разных мутантов, применили методику трансдукции. В трех проведенных скрещиваниях донорами служили разные аналогорезистентные мутанты, реципиентом - 2-метилгистидинрезистентный мутант. Наибольший уровень продукции гистидина. - 17 г/л.

Генно-инженерные разработки проводились также и на бактериях *E. coli* и *B. subtilis*. Донором для *E. coli* был штамм, резистентный к 2-тиазолаланину, вектором - плазида рBR322. Гибридной ДНК трансформировали клетки реципиента, отбирая трансформанты, устойчивые к антибиотику. Затем плазмидной ДНК из этих трансформантов трансформировали клетки и получали продуцент, дающий до 2,5 г/л.

Донором ДНК у *B. subtilis* служил штамм, резистентный к аналогу гистидина, ауксотрофный по аргинину и лейцину, вектором - плазида рUB110. Трансформанты продуцировали до 2,3 г/л гистидина.

Таким образом, в селекционной работе по получению продуцентов аминокислот наметились следующие основные тенденции.

1 Традиционный объект – коринебактерии. В работе с ними используются традиционные методы (индукция мутаций, ступенчатый отбор, метод слияния протопластов), а также методы генной инженерии (с использованием плазмид коринебактерий в качестве основы для создания гибридных векторов). Нужно отметить, что полученные генно-инженерными методами штаммы не могут конкурировать по уровню продукции с созданными традиционными методами. Решение этой проблемы особенно касается продуцентов триптофана, фенилаланина, тирозина, изолейцина, лейцина. Уровни синтеза этих аминокислот, несмотря на многолетнюю селекционную работу, не превышают 12 г/л (для триптофана) и 15-25 г/л (для других). Даже в случаях таких высокопродуктивных штаммов, как продуценты лизина, глутамина, пролина (до 60-96 г/л) заманчиво применить методы генной инженерии не только для увеличения продуктивности, но и для улучшения свойств штаммов.

2 Повышение интереса к *E. coli* как к объекту селекционной работы. Однако существенный эффект был достигнут только при создании продуцентов треонина и гомосерина в работах института «ВНИИ Генетика», а также продуцентов пролина в фирме Betesda. У плазмидного продуцента треонина реализовано важнейшее промышленное свойство *E. coli* - высокая скорость роста, что сокращает ферментацию до 30-40 ч. Но в остальных случаях, несмотря на значительное насыщение генома необходимыми мутациями и дополнительную амплификацию фрагмента или целого оперона, не было выделено продуцентов, способных конкурировать с коринебактериями или *B. subtilis*. Вероятно, что для сверхсинтеза некоторых аминокислот необходимо амплифицировать не только гены соответствующего оперона, но и гены, ответственные за синтез предшественников.

У *S. marcescens* достигнуты высокие уровни продукции треонина (40 г/л), пролина (62 г/л), гистидина (20 г/л), аргинина (65 г/л). Относительным недостатком этого вида является длительная ферментация - 96 ч. Наивысшие уровни продукции были вызваны традиционными методами.

Работы с представителями р. *Bacillus* развивались в последнее время медленно. Уровни продуктивности по триптофану (7-12 г/л), лизину (20 г/л) достигаются исключительно за счет регуляторных мутаций. Генно-инженерные разработки практически не проводятся.

Таким образом, состояние селекционных работ с этими микроорганизмами не дает возможности выделить какой-то предпочтительный объект. Методы генной инженерии вносят новые возможности в селекцию продуцентов аминокислот, но основными остаются получение регуляторных мутантов с множественными мутациями.

11.5. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ

Биосинтез ароматических аминокислот у микроорганизмов осуществляется по сложному разветвленному пути, берущему начало от реакции конденсации эритрозо-4-фосфата и ФЕП. 7 реакций общего биосинтетического пути (шикиматного) приводят к образованию хоризмовой кислоты. Далее путь разветвляется и ведет к антраниловой кислоте - предшественнику синтеза триптофана и префеновой кислоте - общему предшественнику синтеза фенилаланина и тирозина.

Частный путь синтеза триптофана представлен 5 реакциями, а структурные гены объединены в оперон. Биосинтез же фенилаланина и тирозина разветвляется от префената и представлен для каждой аминокислоты двумя реакциями. Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у различных бактерий осуществляется по-разному, что находит свое отражение в подходах к конструированию штаммов-продуцентов. Общим является то, что здесь задействованы как генетический контроль, так и аллостерическая регуляция.

11.5.1 Селекция продуцентов триптофана

Наиболее распространенными продуцентами триптофана являются *E. coli*, *B. subtilis* и коринебактерии. У *E. coli* и *B. subtilis* триптофановые гены объединены в оперон и находятся под контролем регуляторного *trpR*-гена. Этот ген контролирует также экспрессию гена *aroH*, кодирующего один из изоферментов ключевого фермента ароматического пути - ДАГФ-синтазу. Вследствие этого синтез триптофана у данных бактерий находится под контролем репрессии синтеза ДАГФ-синтазы и АС некоторыми ароматическими аминокислотами. Помимо этого, ДАГФ-синтаза, АС и ХМ находятся под контролем ретроингибирования. Таким образом, ключевыми регуляторными точками синтеза триптофана являются ДАГФ-синтаза, ХМ, АС.

Эти сведения были использованы для направленного получения продуцентов. Так, мутации в генах *tyrR*, *aroF*, *tyrA*, *pheA* у штамма *E. coli* К-12 привели к увеличению продукции триптофана в 5 раз. А подключение к этому штамму регуляторных мутаций собственного пути синтеза триптофана (*trpR*, *trpE*) способствовали усилению образования общих предшественников и повышали выход триптофана. В геном одного из штаммов (JP 2243) был введен мутантный аллель гена *trpS*, кодирующий аминоксил-тРНКсинтазу. Эта мутация повышала уровень ферментов синтеза триптофана за счет частичного нарушения аттенюации *trp*-оперона. После введения такой мутации уровень выхода триптофана повысился в 1,5 раза. После этого в клетки штамма была введена плаزمида рUM101, несущая мутантные гены *trpE*, не чувствительные к ретроингибированию. Уровень синтеза триптофана такими клетками повысился еще на 80 %. Наивысшая продуктивность таких штаммов - 1,2 г/л за 24 ч.

Вообще, для создания на основе *E. coli* продуцентов триптофана генно-инженерными методами, конструируют многокопийные гибридные плазмиды, несущие мутантный *trp*-оперон. В качестве реципиентов используют штамм с делецией, охватывающей все структурные гены оперона либо несущего мутацию в регуляторном гене *trpR*. Наиболее продуктивный из полученных таким образом продуцентов накапливал до 6,2 г/л триптофана.

Описаны работы с колийными штаммами, в которых, используя плазмиду pSC101, образующую 5 копий на хромосому. Получали гибридную плазмиду, несущую все гены *trp*-оперона дикого типа. Клетки трансформировали такой плазмидой и у трансформантов получали резистентные к 5-метилтриптофану мутанты. Наибольший уровень накопления у таких мутантов - 3,5 г/л.

Интересно отметить, что при определении зависимости уровня накопления триптофана от числа копий плазмид, несущих мутации в гене *trpR* и структурных генах оперона, было показано, что наиболее высокий уровень имеют штаммы, обладающие 5 копиями плазмиды pSC115. При меньшем или большем количестве копий на клетку (векторы RP4 или RSF100) уровень накопления составлял соответственно 1,8 и 2,6 г/л.

Наиболее продуктивным был плазмидный штамм, растущий на глюкозе с подпиткой анраниловой кислотой - 6,2 г/л триптофана.

Конструируя продуценты триптофана на основе штаммов *B. subtilis*, исследователи должны учитывать определенные отличия в регуляции биосинтеза ароматических аминокислот от таковых у *E. coli*. ДАГФ-синтаза этого штамма репрессируется тирозином и фенилаланином и ингибируется хоризматом и префенатом. ХМ - ингибируется префенатом.

Наиболее продуктивные штаммы на основе были получены в Японии и СССР (России) с применением методики получения аналогорезистентных мутантов. Фирма Ajinomoto получала продуценты с помощью 5-фтор-триптофана и 5-метилтриптофана, которые давали до 7 г/л аминокислоты. Полученные в СССР с помощью аналогов триптофана, тирозина и фенилаланина продуценты давали до 10-12 г/л триптофана за 48 ч культивирования.

Фирма Kyowa Nakko для получения триптофана использовала бактерии *S. glutamicum*. Ими было получено 7 ауксотрофных мутантов, способных накапливать триптофан до 0,15 г/л и зависимых по фенилаланину и тирозину. Наиболее продуктивный штамм был отобран на резистентность к аналогам ароматических аминокислот.

На первых четырех этапах использовали аналоги триптофана, в результате чего был получен штамм, дающий 4,9 г/л. Затем использовали аналоги фенилаланина и тирозина и получили продукцию до 12 г/л.

Получены первые положительные результаты в увеличении выхода триптофана, синтезируемого *C. glutamicum*. Для этого в клетки *C. glutamicum* дикого типа была введена вторая копия гена, кодирующего анранилат-синтазу, лимитирующую синтез триптофана.

Эксперимент проводили по следующей схеме:

1. Библиотеку хромосомной ДНК *Br. flavum* клонировали в челночном векторе *C. glutamicum* - *E. coli* и ввели в мутантный штамм *C. glutamicum*, не синтезирующий активной анранилат-синтазы.

2. Трансформанты отбирали по их способности к росту в отсутствие анраниловой кислоты.

3. Рекомбинантную плазмиду, несущую ген анранилат-синтазы переносили в клетки *C. glutamicum* дикого типа.

В результате уровень синтеза триптофана увеличился на 130 %, что связано с более эффективным использованием доступных предшественников.

Еще более высокий уровень синтеза триптофана достигался при введении в клетки *C. glutamicum* модифицированных генов 3 ключевых ферментов: ДАГФ-синтазы, АС и ФРТ. Гены, кодирующие эти ферменты, благодаря внесенным в них мутациям стали нечувствительны к ингибированию конечным продуктом (ретроингибирование).

В качестве альтернативы для синтеза аминокислот можно использовать *E. coli*. Этот микроорганизм хорошо изучен, а генно-инженерные методы работы с ним более или менее детально разработаны.

У штамма *Br. flavum* после многократной селекции к аналогам триптофана и фенилаланина был получен мутант, дающий до 4 г/л триптофана. Последующее блокирование синтеза фенилаланина увеличило выход до 6,2 г/л. А продуценты, отобранные по устойчивости к 5-фтортриптофану, давали до 8 г/л триптофана.

У штамма *Br. flavum* были получены мутанты, резистентные к азасерину - аналогу хоризмата. Наиболее продуктивные из них давали до 10,3 г/л.

11.5.2 Селекция продуцентов фенилаланина

Для получения продуцентов фенилаланина используют бактерии тех же родов, что и для получения триптофана. Здесь также наиболее применимой методикой является ступенчатый отбор аналогорезистентных мутантов с использованием фторфенилаланина, тиэнилаланина и аминокислоты фенилаланина. Исходными штаммами, как правило, являются ауксотрофы по тирозину. Блокирование синтеза этой аминокислоты не только снижает расход общих предшественников на смежный синтез, но и нарушает регуляцию ДАГФ.

Так, штамм *S. glutamicum*, выделенный на основе тирозинового ауксотрофа с применением ступенчатой селекции по аналогам фенилаланина, продуцировал до 9,5 г/л фенилаланина. Известны штаммы, созданные по такой же схеме, дающие до 17 г/л фенилаланина.

Наиболее высокие показатели для продуцентов фенилаланина (до 23 г/л) достигнуты на основе бактерий *Brevibacterium*. Все они обладают потребностью в тирозине либо триптофане и отбираются по устойчивости к аналогам фенилаланина и триптофана. Так, штамм *Br. lactofermentum* AJ 3699, ауксотрофный по тирозину, триптофану и метионину, а также резистентный к ФФ и 5-МТ продуцирует за 72 ч ферментации 23 г/л фенилаланина. Этот же штамм на дешевых средах с ацетатом или этанолом дает до 20 г/л.

Публикации последних лет свидетельствуют об активном использовании в качестве продуцентов фенилаланина бактерий *E. coli* и *B. subtilis*. С использованием транспозонного мутагенеза, конъюгации и трансдукции был сконструирован штамм *E. coli* NST37, который несет 7 мутаций в генах, кодирующих частный путь синтеза фенилаланина и шикиматный участок пути. Мутации в структурных генах *aroG* и *aroF* вызывают утрату чувствительности двух изоферментов ДАГФ-синтазы (фенилаланинового и тирозинового). Мутация в регуляторном гене *tyrR* снижает репрессию синтеза этих изоферментов. Мутация в операторной области *pheA* устраняет репрессию ХМ-ПДТ фенилаланином. А мутация в структурном гене *pheA* снимает ретроингибирование ПДТ. Мутации в структурных генах *tyrA* и *trpE* блокируют синтез тирозина и триптофана. Такой штамм продуцировал около 1 г/л фенилаланина.

11.5.3. Селекция продуцентов тирозина

Наиболее эффективные продуценты тирозина получены в настоящее время на штаммах *C. glutamicum*. В серии публикаций японской фирмы Куоуа Накко описывается схема подобных работ. Исходным для селекции штаммом являлся штамм *C. glutamicum* дикого типа АТСС 13032. У него были получены ауксотрофные мутации по фенилаланину. Затем на 7 этапах отбора получали мутанты, резистентные к четырем аналогам фенилаланина и тирозина. Такой штамм продуцировал до 18 г/л тирозина.

Таким образом, селекционная работа по получению продуцентов ароматических аминокислот основана в настоящее время на получении регуляторных мутантов, множественных ауксотрофных и аналогорезистентных мутаций. Основные продуценты аминокислот этого класса - бактерии семейства коринебактерий, энтеробактерий и бациллы.