

## Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66

### Оптимизация экспрессии нитрилазы из *Alcaligenes denitrificans* в *Rhodococcus rhodochrous* для повышения эффективности биокаталитического синтеза акрилата аммония

© 2019 К.В. ЛАВРОВ<sup>1,\*</sup>, Е.Г. ГРЕЧИШНИКОВА<sup>1</sup>, А.О. ШЕМЯКИНА<sup>1</sup>, А.Д. НОВИКОВ<sup>1</sup>, Т.И. КАЛИНИНА<sup>1</sup>, А.С. ЕПРЕМЯН<sup>2</sup>, С.А. ГЛИНСКИЙ<sup>3</sup>, Р.А. МИНАСЯН<sup>3</sup>, С.П. ВОРОНИН<sup>3</sup>, А.С. ЯНЕНКО<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика), Москва 117545

<sup>2</sup>Научно производственный центр «Армбиотехнология» Национальной академии наук Армении, Ереван 0056, Армения

<sup>3</sup>ЗАО «Биоамид», Саратов 410033

\*e-mail: lavrov.ko@gmail.com

\*\*e-mail: yanenko@genetika.ru

Поступила в редакцию 13.12.2018 г.

После доработки 24.01.2019 г.

Принята к публикации 15.02.2019 г.

Сконструирован штамм *Rhodococcus rhodochrous* M33-2nit, содержащий в хромосоме две копии гена нитрилазы из *A. denitrificans* В-9582 под контролем промотора нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8. Проведена оптимизация культивирования этого штамма и показано, что в ферментере при использовании двухсубстратной схемы культивирования на глюкозе и ацетате возможно получение до 17 г с.в. кл./л с удельной активностью до 7 ед/мг с.в. Проведено сравнение способности клеток *A. denitrificans* В-9582 и *R. rhodochrous* M33-2nit к синтезу акрилата аммония из акрилонитрила в условиях, моделирующих промышленный синтез. Показано, что клетки *R. rhodochrous* M33-2nit способны осуществлять синтез акрилата аммония при более высоких скоростях подачи акрилонитрила в реакционную смесь, чем клетки *A. denitrificans* В-9582. С использованием клеток *R. rhodochrous* M33-2nit в качестве биокатализатора была показана возможность получения высококонцентрированного раствора акрилата аммония (450 г/л). Конверсия акрилонитрила в акрилат аммония составляла в этом процессе 99,5%.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus rhodochrous*, нитрилаза, промотор нитрилгидратазы, акрилат аммония, акрилонитрил, биокатализ.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-1-27-37

Нитрилазы – ферменты, катализирующие гидролиз нитрилов ( $R-C\equiv N$ ) до органических кислот ( $R-COOH$ ) и аммония. Эти ферменты широко распространены во всех организмах, включая бактерии, грибы, растения и человека [1, 2]. Способность нитрилаз действовать селективно только на CN-группу, не затрагивая другие функциональные группы в молекуле, определяет использова-

ние их в органическом синтезе. Одно из перспективных применений нитрилаз связано с получением акриловой кислоты из акрилонитрила [3].

Акриловая кислота используется при производстве лакокрасочных материалов, для пропитки тканей и кожи, в качестве сырья для производства полиакрилонитрильных волокон и акриловых каучуков, строительных смесей и клеев.

**Список сокращений:** ЛБ – среда Лурия–Бергани; ОП – оптическая плотность; SD – стандартное отклонение; SDS-ПААГ – полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия.

Кроме того, акриловая кислота незаменима при производстве суперабсорбентов, используемых в сельском хозяйстве, гигиене, и других областях. В промышленности реализован химический процесс получения 99% акриловой кислоты, осуществляемый путем парофазного окисления газообразного пропилена кислородом воздуха [4]. Недостатками этого процесса являются многостадийность, взрывоопасность, образование побочных продуктов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ , уксусный альдегид, ацетальдегид, малеиновый ангидрид), высокие температуры (200–300 °С) и необходимость в мультикомпонентных катализаторах, основанных на тяжелых металлах. Биокаталитический способ получения акриловой кислоты из акрилонитрила, в силу принципиального отличия технологической схемы, обладает определенными преимуществами. Его использование позволяет осуществлять биокаталитический процесс при низкой температуре (30 °С), без побочных продуктов и катализировать его интактными (нерастущими) клетками бактерий, содержащими фермент нитрилазу, а также применять в качестве сырья не газ (пропилен), а жидкость – акрилонитрил. В результате одностадийного биокаталитического процесса получается водный раствор акриловой кислоты (в форме акрилата аммония), что во многих случаях технологически удобнее. Известно, что в чистом виде акриловая кислота способна к спонтанной полимеризации, а также к кристаллизации при 13 °С, что существенно усложняет ее хранение и транспортировку в климатических условиях России.

Недостатком биокаталитического способа получения акриловой кислоты (акрилата аммония) является высокая чувствительность биокатализаторов к акрилонитрилу. Основные химические компоненты процесса гидролиза акрилонитрила до акрилата аммония агрессивны для клеток. Акрилонитрил является органическим растворителем, способным растворять мембраны, вызывая лизис клеток, и нарушать трехмерную структуру ферментов, вызывая падение их активности. Также акрилонитрил и акрилат аммония обладают реакционно-способной двойной связью, благодаря которой они могут необратимо связываться с клеточными компонентами и нарушать их функционирование. В силу этого ферментная активность клеток может снижаться в ходе процесса. Для повышения эффективности процесса клетки биокатализатора должны обладать комплексной устойчивостью к таким воздействиям. При описании функционирования биокатализа-

торов на основе чистых ферментов [5, 6] использовалось понятие «операционная стабильность» для обозначения устойчивости биокатализатора на основе целых клеток бактерий. Используемый в настоящее время для получения акрилата аммония промышленный биокатализатор на основе грамотрицательных бактерий *Alcaligenes denitrificans* В-9582 обладает высокой нитрилазной активностью, однако демонстрирует низкую операционную стабильность [7, 8].

Грамположительные бактерии *R. rhodochrous* известны как наилучшие цельноклеточные биокатализаторы при биокаталитической трансформации нитрилов [9–11]. Сравнение операционной стабильности грамположительных и грамотрицательных бактерий (в том числе *Rhodococcus* и *Alcaligenes*) при трансформации нитрильных соединений до настоящего времени не проводилось.

Ранее авторами настоящей работы был сконструирован штамм *R. rhodochrous* М33 nit [12], содержащий в хромосоме одну копию экспрессионной кассеты с геном *nitC1* из *A. denitrificans* В-9582 (рис. 1). Экспрессия в этой кассете контролировалась промотором генов нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* М8.

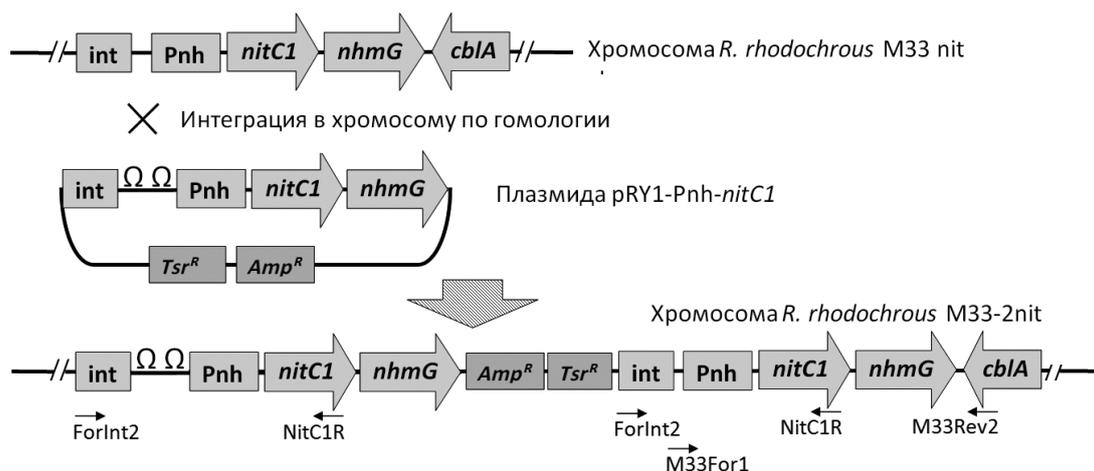
В задачи данного исследования входило усовершенствование рекомбинантного штамма *R. rhodochrous*, синтезирующего нитрилазу NitC1, оптимизация условий экспрессии нитрилазы в этом штамме и сравнение операционной стабильности штаммов *A. denitrificans* В-9582 и *R. rhodochrous* в условиях биотрансформации акрилонитрила в акрилат аммония.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы, плазмиды и условия культивирования

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Культивирование штаммов *R. rhodochrous* для оценки уровней нитрилазной активности проводилось в колбах Эрленмейера объемом 700 мл при 30 °С с постоянным перемешиванием (300 об/мин) на стандартной минеральной синтетической среде МС следующего состава, г/л: глюкоза – 5;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 2,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,004;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01. Для оптимизации условий синтеза нитрилазы в штамме *R. rhodochrous* М33-2nit источники углерода и/или азота в стандартной среде были заменены на ацетат калия и мочевины, соответственно. Выращивание биомассы штамма *R. rhodochrous* М33-2nit для последующего получения акрилата аммония



**Рис. 1.** Схема конструирования штамма *R. rhodochrous* M33-2nit, содержащего две копии экспрессионной кассеты Pnh-*nitC1*, и структура хромосомных локусов штаммов *R. rhodochrous* M33 nit и M33-2nit, содержащих нитрилазу. Pnh – промоторная область нитрилгидратазы; *nitC1* – ген нитриказы из *A. denitrificans* B-9582; *nhmG* – ген белка-помощника нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8; *cblA* – ген кобальт-зависимого регулятора транскрипции генов нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8; *Tsr<sup>R</sup>* – ген устойчивости к тиострепту; *Amp<sup>R</sup>* – ген устойчивости к ампициллину; Ω Ω – двойной терминатор транскрипции из фага *fd*

**Fig. 1.** Construction of *R. rhodochrous* M33-2nit strain containing two copies of expression cassette Pnh-*nitC1* and the structure of chromosomal locuses of nitrilase containing *R. rhodochrous* M33 nit and M33-2nit strains. Pnh – nitrile hydratase promoter region; *nitC1* – gene of nitrilase from *A. denitrificans* B-9582; *nhmG* – gene of nitrile hydratase accessory protein from *R. rhodochrous* M8; *cblA* – gene of cobalt-dependant regulator of transcription of nitrile hydratase genes from *R. rhodochrous* M8; *Tsr<sup>R</sup>* – thiostrepton resistance gene; *Amp<sup>R</sup>* – ampicillin resistance gene; Ω Ω – double transcription terminator from phage *fd*

Таблица 1

**Штаммы и плазмиды, использованные в работе**

**Strains, plasmids and primers used in this study**

Штамм/плазмида	Описание	Источник
<i>Alcaligenes denitrificans</i> B-9582	Конститутивно синтезирует алифатическую нитрилазу NitC1	[7]
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M33 nit	Содержит одну копию экспрессионной кассеты Pnh- <i>nitC1</i> в хромосоме. Конститутивно синтезирует алифатическую нитрилазу NitC1	[12]
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M33-2nit	Содержит две копии экспрессионной кассеты Pnh- <i>nitC1</i> в хромосоме. Конститутивно синтезирует алифатическую нитрилазу NitC1. Производный от штамма <i>R. rhodochrous</i> M33 nit	Настоящая работа
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup></i> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )] Использовался в качестве хозяина для сборки плазмид	Приобретен в Stratagene
<i>Escherichia coli</i> S17-1	TrpR SmR <i>recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-TcMu:KmTn7 λpir</i> Использовался для конъюгативного переноса плазмид в клетки штаммов <i>R. rhodochrous</i>	[13]
pRY1	Использовалась для интеграции экспрессионных кассет в хромосому <i>R. rhodochrous</i> (содержит только репликон pMB1 для поддержания в <i>E. coli</i> ), <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tsr<sup>R</sup></i>	[14]
pRY1-Pnh- <i>nitC1</i>	Производная от pRY1, содержит экспрессионную кассету Pnh- <i>nitC1</i>	Настоящая работа
Праймеры		То же
ForInt2	cacggtaccctgtaccggcgccctca	
NitC1R	gctactttgctgggaccgggtcttcag	
M33For1	cagccgcggtcacgaacgcctgtagcggc	
M33Rev2	ggatccggctgcgggcggaacagtcgccc	

проводилось в 3-литровых лабораторных ферментерах на ферментационной среде следующего состава, г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 2,5; глюкоза – 20; мочеви́на – 18;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1;  $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,06;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,04; ЭДТА – 0,08; дрожжевой экстракт – 0,5;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  – 10;  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 1–10. Культивирование проводили при температуре  $30 \pm 1$  °С. Подачу воздуха осуществляли из расчета 1,5 V/V, скорость вращения мешалки изменялась, обеспечивая уровень аэрации не менее 50% насыщения кислорода. По истечении  $24 \pm 0,3$  ч роста культуры в ферментер начинали подачу 50% уксусной кислоты, служащей источником углерода, поддерживая значение pH  $7,5 \pm 0,5$ . Штаммы *E. coli* выращивались при 37 °С на среде Лурия–Бертани (ЛБ) следующего состава, г/л: триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, хлористый натрий – 5. В качестве селективного агента при отборе плазмидосодержащих клонов в среду ЛБ добавляли 100 мкг/мл ампициллина.

### Конструирование штамма *R. rhodochrous* M33-2nit

Штамм сконструировали путем интеграции в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 nit плазмиды pRY1-Pnh-*nitC1*, содержащей экспрессионную кассету с геном нитрилазы NitC1 под контролем промотора нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8 [12]. Для интеграции была использована свойственная клеткам бактерий способность к рекомбинации между гомологичными фрагментами ДНК. Плазмиду pRY1-Pnh-*nitC1* сконструировали путем введения фрагмента int-2Tfd-Pnh-*nitC1-nhmG* в плазмиду pRY1 по сайтам рестриктаз EcoRI и BamHI. Указанный фрагмент получили путем ПЦР-объединения фрагментов int (последовательность идентична последовательности нуклеотидов 115115–115519 в геноме *R. rhodochrous* M8 (номер в NCBI GeneBank MLYX02000005.1)), 2Tfd (двойной терминатор транскрипции из фага *fd* [15], (рис. S1 (дополнительные материалы))) и фрагмента Pnh-*nitC1-nhmG*, который состоял из промоторной области нитрилгидратазы (Pnh), гена нитрилазы из *A. denitrificans* B-9582 (*nitC1*), и гена белка-помощника нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8 (*nhmG*) (рис. S2 (дополнительные материалы)). Плазмиду вводили в штамм *R. rhodochrous* M33 nit с помощью штамма *E. coli* S17-1 путем конъюгационных скрещиваний по методике, описанной ранее [14]. Клоны-кандидаты *R. rhodochrous* M33-2nit отбира-

ли по устойчивости к тиострептон. Проверка нитрилазной активности пяти независимых клонов-кандидатов показала, что по активности они не различаются между собой. Структуру предполагаемого хромосомного локуса с двумя экспрессионными кассетами в одном из клонов проверяли с помощью ПЦР-амплификации со специфическими праймерами и дальнейшего анализа размера и последовательностей полученных фрагментов. Положения праймеров указаны на рис. 1, последовательности праймеров приведены в табл. 1. В результате был получен набор ПЦР-фрагментов, размеры и последовательности которых соответствовали структуре, приведенной на рис. 1. Анализ присутствия копий экспрессионной кассеты в других локусах хромосомы не проводился, в связи с практически нулевой вероятностью негомологичной рекомбинационной встройки в этом штамме (неопубликованные данные).

### Измерение уровней транскрипции гена нитрилазы *nitC1* в штаммах *R. rhodochrous*

Уровень транскрипции гена *nitC1* оценивали по относительному количеству фрагментов кДНК гена *nhmG* (рис. 1), полученных путем обратной транскрипции с использованием общей клеточной мРНК. Для расчетов в качестве внутреннего стандарта использовали количество транскриптов гена *gyrB* (ДНК-гираза, [16, 17]), на которое нормировали количество транскриптов *nhmG*. Количество транскриптов определяли с помощью количественной ПЦР по следующей методике: 20 мл выросшей культуры с 1,5–3,0 ед. оптической плотности ( $\text{OD}_{600}$ ) лизировали, растирая с кварцевым песком в жидком азоте. Общую РНК экстрагировали из клеток с помощью реагента TRIZOL («Евроген», Россия) и очищали с использованием RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Германия). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I (ThermoFisher Scientific) для удаления остаточной геномной ДНК. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT («Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Количество специфической кДНК определяли путем амплификации на приборе Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) с использованием qPCRmix-HS SYBR + LowRox («Евроген»). Типичная ПЦР-смесь объемом 20 мкл содержала, мкл: SQ – 15, qPCR-mix-HS SYBR + LowRox – 2, разведенной кДНК (<200 нг) – 1 и прямого и обратного праймеров по 1. Условия амплификации

были следующие: 95 °C в течение 5 мин, затем 40 циклов: 95 °C – 30 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 30 с. Для амплификации кДНК *nhmG* использовали праймеры F(5'-ATC GGT GTC AGT AAT GCG) и R(5'-GTG CGG CGG TCC CAG T), а для амплификации кДНК *gyrB* использовали праймеры F(5'-CGAGGC ACCGAAGAAGGC) и R(5'-CGACCGAGTTGTGGAT). Относительное количество мРНК определяли с методом 2-ΔΔCT [18] со стандартными алгоритмами расчета, предоставленными программным обеспечением прибора (7500 Fast Software version 2.3). Все количественные оценки выполнялись в трех повторах и представлялись как усредненное значение ± стандартное отклонение (SD).

### Измерение удельной нитрилазной активности клеток

Клетки дважды промывали 0.1 М фосфатным буфером с pH 7.5 и ресуспендировали в том же буфере. Для измерения активности 500 мкл суспензии клеток с ОП 1 ед. смешивали с 500 мкл 2%-ного раствора акрилонитрила и инкубировали 20 мин при 22 °C, затем реакцию останавливали добавлением 10 мкл концентрированной соляной кислоты. Клетки осаждали центрифугированием, затем определяли концентрацию образовавшегося аммония методом Несслера. Для этого к 3 мл воды добавляли 60 мкл концентрированного реактива Несслера и 60 мкл исследуемого раствора, перемешивали и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Количество  $\text{NH}_4^+$  (мкМ) рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Удельную нитрилазную активность клеток выражали в ед/мг с.в. клеток. За количество единиц было принято количество  $\text{NH}_4^+$  (мкМ), образующегося за 1 мин при 22 °C.

### Синтез акрилата аммония из акрилонитрила

Процессы синтеза проводили в стеклянном реакторе объемом 250 мл при 33 °C с постоянным перемешиванием. Начальная реакционная смесь (объемом 50–70 мл) содержала суспензию клеток биокатализатора в воде. В течение синтеза (5 ч) в смесь с постоянно понижающейся скоростью подавался 100%-ный акрилонитрил. Общий объем подачи акрилонитрила составил примерно 10–14 мл. Остаточную концентрацию акрилонитрила и концентрацию синтезируемого акрилата аммония в реакционной смеси определяли каждые 30 мин хроматографическими методами с помощью ВЭЖХ и ГХ соответственно.

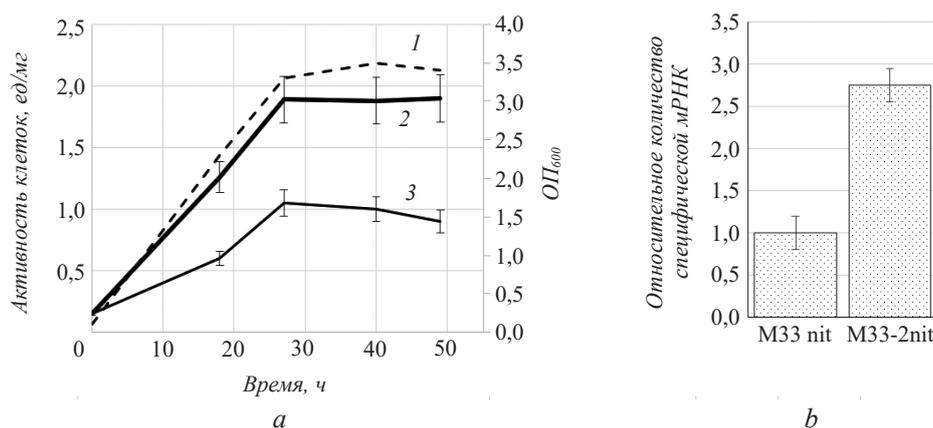
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Конструирование высокоактивного рекомбинантного штамма *R. rhodochrous*, синтезирующего нитрилазу NitC1 из *A. denitrificans* B-9582

Амплификация экспрессионной кассеты с геном *nitC1* под контролем промотора нитрилгидратазы (*Pnh-nitC1*) была использована для получения штамма *R. rhodochrous* M33-2nit с повышенной нитрилазной активностью. Этот штамм, содержащий две копии экспрессионной кассеты, был получен путем интеграции второй копии экспрессионной кассеты в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 nit с помощью гомологичной рекомбинации (см. рис. 1).

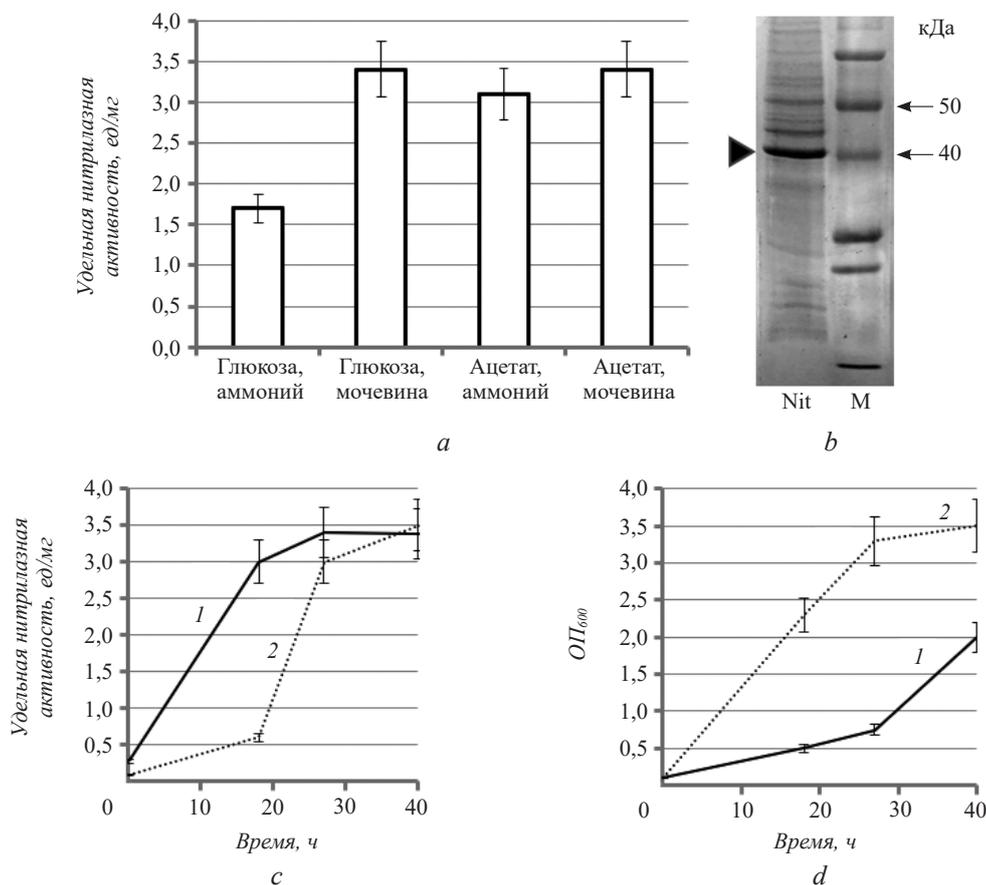
Удельная нитрилазная активность штаммов с одной и двумя копиями экспрессионной кассеты была измерена в динамике при выращивании на стандартной минимальной среде (рис. 2a). Параллельно в обоих штаммах был измерен уровень транскрипции гена *nitC1* (рис. 2b). Оказалось, что максимальная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33-2nit (около 2 ед/мг с.в.) превышала максимальную активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 nit (около 1 ед/мг с.в.) примерно в два раза. Клетки обоих штаммов достигали максимальной удельной активности к началу стационарной фазы роста. Уровень транскрипции гена *nitC1* в штамме *R. rhodochrous* M33-2nit также был повышен примерно вдвое.

Сравнение экспрессии *nitC1* в полученных штаммах представляет интерес также с точки зрения анализа возможностей систем сверх-синтеза ферментов в клетках бактерий. Действительно, промотор генов нитрилгидратазы является одним из сильнейших бактериальных промоторов, и экспрессия генов под его контролем может приводить к накоплению целевого белка до трети от растворимых внутриклеточных белков (рис. 3b и [12, 19]). Амплификация экспрессионных кассет с такими промоторами может приводить к ряду особенностей экспрессии целевого гена: 1) остановка роста культуры; 2) увеличение количества транскриптов, непропорциональное увеличению копийности кассеты; 3) увеличение ферментной активности культуры непропорционально увеличению транскрипции. Отсутствие этих явлений в штамме *R. rhodochrous* M33-2nit указывает на то, что клетки *R. rhodochrous* обеспечивают хорошую поддержку сверх-экспрессии нитрилазы как на уровне синтеза мРНК, так и на уровне синтеза белка.



**Рис. 2.** Сравнение экспрессии гена нитриказы *nitC1* в штаммах *R. rhodochrous* M33 nit (одна копия *nitC1* в хромосоме) и M33-2nit (две копии гена *nitC1* в хромосоме): *a* – рост обоих штаммов (значения практически идентичны) (1) и удельная нитриказная активность культур M33-2nit и M33 nit (2 и 3, соответственно); *b* – относительное количество мРНК *nitC1* в клетках штаммов (через 20 ч роста)

**Fig. 2.** Comparison of expression of *nitC1* in *R. rhodochrous* strains M33 nit (one copy of *nitC1* in chromosome) and M33-2nit (two copies of *nitC1* in chromosome): *a* - specific nitrilase activity of M33 nit (3) and M33-2nit (2), and growth of both strains (values are similar and are shown as curve 1); *b* - the relative amount of *nitC1* mRNA in cells (after 20 h of growth)



**Рис. 3.** Экспрессия гена нитриказы *nitC1* в штамме *R. rhodochrous* M33-2nit при разных условиях культивирования. *a* – максимальная удельная нитриказная активность клеток при разных условиях культивирования; *b* – SDS-ПААГ-электрофорез внутриклеточных белков из клеток, выращенных на среде с глюкозой и мочевиной (дорожка Nit). М – маркер молекулярной массы (указана справа). Стрелка слева – положение нитриказы; *c*, *d* – динамика нитриказной активности и роста культур, соответственно, при культивировании клеток на средах с мочевиной, содержащих ацетат (1) или глюкозу (2) в качестве источников углерода

**Fig. 3.** Expression of nitrilase gene *nitC1* in *R. rhodochrous* M33-2nit strain under different cultivation conditions. (*a*), the maximum specific nitrilase activities of the cells under different cultivation conditions; (*b*), SDS-PAAG electrophoresis of intracellular proteins from cells grown on a medium with glucose and urea (lane Nit). Molecular weights of marker protein bands (lane M) are shown on the right. The arrow indicates the position of nitrilase; (*c*, *d*), dynamics of nitrilase activity and growth of cultures, respectively, when cells are cultured on media with urea containing acetate (1) or glucose (2) as carbon sources

Увеличение копийности экспрессионных касет с целевыми генами является известным способом создания и улучшения микробных продуцентов. Наиболее распространен такой подход при оптимизации метаболических потоков для конструирования продуцентов аминокислот и других веществ [20]. Однако в этих случаях исследователи используют относительно слабые промоторы, амплификация которых не приводит к заметному накоплению продуктов соответствующих генов. Эффекты, связанные с амплификацией касет с сильными промоторами, исследованы недостаточно.

Задачей дальнейшей работы было выявление условий, в которых можно получать клетки штамма *R. rhodochrous* M33-2nit, обладающие уровнем активности не меньшим, чем у штамма *A. denitrificans* B-9582 (6,9 ед/мг [7]).

### Изучение факторов, влияющих на экспрессию нитриказы в штамме *R. rhodochrous* M33-2nit

Экспрессия нитриказы в клетке может зависеть от функционирования механизмов катаболической и азотной репрессии-дерепрессии, влияющих на активность промотора нитрилгидратазы. Ранее такая зависимость была показана для экспрессии генов нитрилгидратазы в природном штамме *R. rhodochrous* M8 [21], однако для рекомбинантного промотора она исследована не была.

С целью оценки влияния катаболической и азотной репрессии на синтез нитриказы в штамме *R. rhodochrous* M33-2nit нитриказная активность штамма была изучена при выращивании культуры на разных источниках углерода и азота. Культуры выращивались в колбах со стартовой добавкой всех компонентов среды и без дополнительных подпиток. В качестве источников углерода сравнивались глюкоза и ацетат калия как предполагаемые сильный и слабый катаболические репрессоры, соответственно. В качестве источников азота сравнивались хлорид аммония и мочевины как предполагаемые сильный и слабый азотные репрессоры, соответственно. Оказалось, что в этих условиях максимальной активности клетки достигали на двух вариантах среды, содержащей мочевины – с глюкозой или ацетатом калия в качестве источников углерода (рис. 3а). Несмотря на сходные уровни финальных активностей (около 3,5 ед/мг) в этих вариантах, при выращивании на ацетате калия происходило более быстрое накопление нитриказы в клетке, чем при выращивании на глюкозе (рис. 3с). Это можно объяснить тем, что глюкоза сильнее репрессирует син-

тез нитриказы, чем ацетат. При этом культура, выращенная на глюкозе, после 30 ч роста достигала того же максимального уровня активности, что и культура, выращенная на ацетате. Можно предполагать, что подъем активности связан с истощением глюкозы в среде до  $<0,2$  г/л (данные не приведены). Глюкоза обеспечивала более быстрый рост культуры, чем ацетат калия (рис. 3d).

Разница в активности культур, выращенных на глюкозе с разными источниками азота (аммоний или мочевины, рис. 3а), указывает на репрессирующий эффект аммония на экспрессию нитриказы. Однако этот эффект не воспроизводился при выращивании на ацетате. Вероятно, что дерепрессирующее действие ацетата калия влияет на регуляцию, связанную с источником азота. Поскольку генетический механизм углеродного и азотного катаболического контроля в данном случае неизвестен, требуются дальнейшие исследования для детального изучения этих явлений.

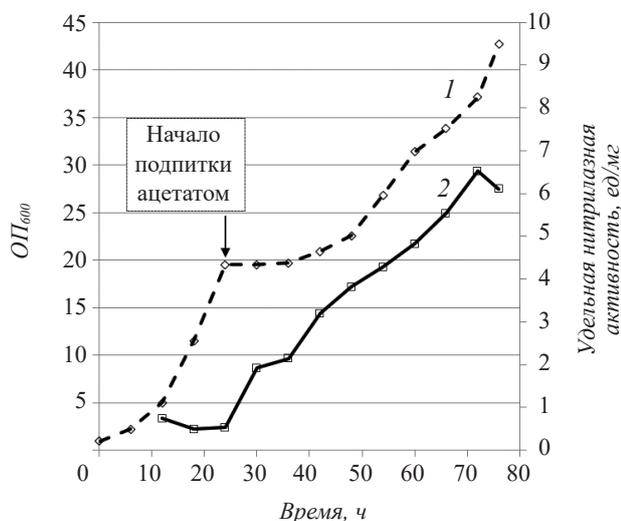
Следует отметить, что в условиях максимальной активности в клетках накапливалось около 30% белка нитриказы от всех растворимых белков (рис. 3b). Такой высокий уровень синтеза обеспечивался активностью промотора нитрилгидратазы, входящего в кассету, которая была разработана ранее [12, 19] для сверхэкспрессии генов в родококках.

### Разработка эффективной схемы культивирования штамма *R. rhodochrous* M33-2nit в ферментере

Критерием эффективности при разработке схемы культивирования было наиболее быстрое достижение максимальной нитриказной активности клеток при максимальном урожае биомассы. Культивирование в 3-литровых ферментерах проводилось с использованием мочевины в качестве источника азота и отличалось от культивирования в колбах тем, что добавление источников углерода происходило постепенно, по мере роста культуры. Сравнивались результаты культивирования при использовании глюкозы или ацетата в качестве источников углерода. В результате апробирования разных режимов подпиток обоими субстратами было показано, что максимально возможная активность культуры на глюкозе примерно вдвое ниже, чем активность культуры на ацетате (около 3,5 и 7 ед/мг, соответственно, подробные данные не приведены). Сниженная активность на глюкозе связана, вероятно, с постоянным присутствием этого субстрата в питательной среде в результате подпиток, и, соответственно, с репрессией экспрессии нитриказы.

С учетом низкой скорости роста культуры на ацетате (рис. 3d) была апробирована смешанная схема выращивания, включающая первоначальный рост на глюкозе с дальнейшим переходом на подпитку ацетатом в форме уксусной кислоты (рис. 4). В результате было показано, что за 70–80 ч возможно получение около 40 ед. ОП<sub>600</sub> клеток (~17 г с.в. кл./л) с высокой удельной нитрилизной активностью ( $\geq 7$  ед/мг). При культивировании на ацетате за такое же время удавалось получить не более 30 ед. ОП клеток с такой же активностью.

Ранее подобная схема двухсубстратного культивирования была использована для получения высокоактивных клеток штамма *R. rhodochrous* M33, в котором под контролем того же промотора экспрессировалась нитрилгидратаза [22]. Можно сделать заключение, что эта схема является оптимальной для наработки биокатализаторов на основе производных штамма *R. rhodochrous* M33, экспрессирующих необходимые гены под контролем промотора нитрилгидратазы.



**Рис. 4.** Рост (1) и нитрилизная активность (2) штамма *R. rhodochrous* M33-2nit при культивировании в 3-литровых ферментерах с мочевиной в качестве источника азота. Начальная концентрация глюкозы составляла 20 г/л. После 24-го часа был добавлен ацетат калия до 10 г/л, и далее осуществлялась подпитка уксусной кислотой (pH 7,4–7,6)

**Fig. 4.** Growth (1) and specific nitrilase activity (2) of the *R. rhodochrous* M33-2nit strain when cultured in 3-liter fermenters with urea as a nitrogen source. The initial glucose concentration was 20 g/L. After the 24th hour, potassium acetate was added up to 10 g/L (indicated by the arrow in the graph), and then it was fed with acetic acid (pH 7.4–7.6)

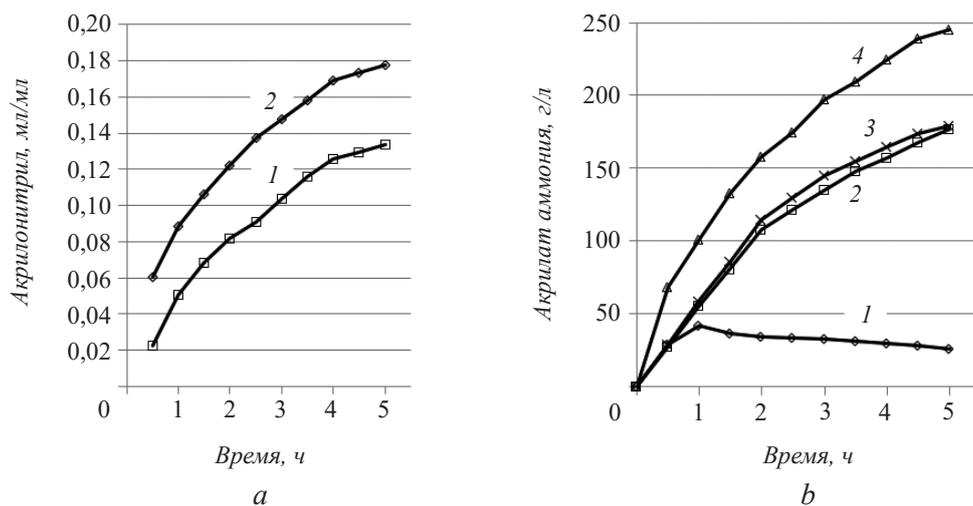
### Сравнение операционной стабильности штаммов *R. rhodochrous* M33-2nit и *A. denitrificans* B-9582 при синтезе акрилата аммония

Синтезы акрилата аммония из акрилонитрила проводились с использованием клеток штаммов *A. denitrificans* B-9582 и *R. rhodochrous* M33-2nit, обладающих одинаковой удельной нитрилизной активностью (7 ед/мг). Динамика синтезов акрилата аммония была изучена при двух разных режимах подачи акрилонитрила. Скорость подачи акрилонитрила в режиме 2 превышала в 1,5 раза скорость подачи в режиме 1 (рис. 5a), концентрация клеток в обоих случаях была одинаковой (0,9 г/л). Оказалось, что при пониженной скорости подачи акрилонитрила (режим 1) динамика синтеза у двух штаммов не отличалась, и в обоих вариантах накапливалось около 180 г/л акрилата аммония за 5 ч (рис. 5b). При повышенной скорости подачи (режим 2) штамм M33-2nit за то же время накапливал около 245 г/л акрилата аммония, а штамм B-9582 прекращал синтез после 1-го часа процесса, накапливая не более 40 г/л акрилата аммония.

При пониженной скорости подачи в ходе обоих процессов в реакционных смесях накапливалось не более 7 г/л нетрансформированного акрилонитрила. В то же время, при повышенной скорости в процессе с использованием штамма M33-2nit накапливалось до 12 г/л акрилонитрила. В случае же штамма B-9582 при повышенной скорости подачи концентрация акрилонитрила превышала 40 г/л уже после 1-го часа и продолжала повышаться далее (подробные данные почасовых концентраций акрилонитрила не приведены). Если предположить, что из двух возможных ингибиторов нитрилизной активности (акрилонитрил и акрилат аммония) именно акрилонитрил играет главную роль в потере клетками активности, то нитрилизная активность в клетках штамма M33-2nit более устойчива к воздействию акрилонитрила, чем в клетках B-9582.

Биокатализатор на основе штамма M33-2nit был апробирован в синтезе более концентрированных растворов акрилата аммония (рис. 6). Увеличение концентрации биокатализатора в реакционной смеси до 7 г/л позволило получить 450 г/л акрилата аммония за 5 ч. При этом конверсия нитрила в акрилат аммония составляла 99,5%.

Таким образом, использование бактерий *R. rhodochrous* для экспрессии гена нитрилазы из *A. denitrificans* B-9582 позволило сконструировать



**Рис. 5.** Объемы подачи акрилонитрила в реакцию смесь в расчете на 1 мл реакционной смеси (а) и накопление акрилата аммония (б) при трансформации акрилонитрила в акрилат аммония клетками *R. rhodochrous* M33-2nit и *A. denitrificans* B-9582 при разных режимах подачи акрилонитрила. а: 1 – режим 1; 2 – режим 2. б: 2, 3 – режим 1 для штаммов B-9582 и M33-2nit, соответственно; 1, 4 – режим 2 для штаммов B-9582 и M33-2nit, соответственно

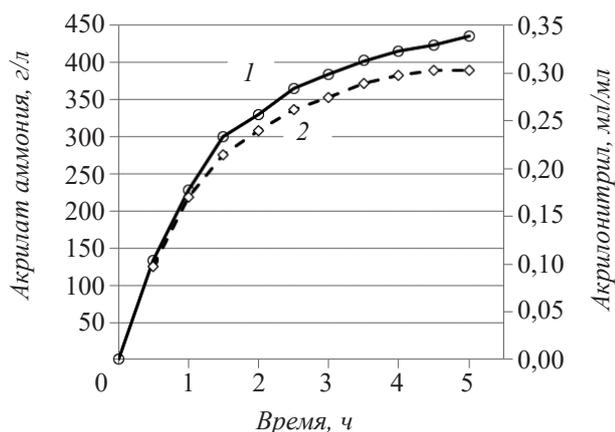
**Fig. 5.** The volumes of acrylonitrile feeding into the reaction mixtures per 1 ml of the reaction mixture (a) and the accumulation of ammonium acrylate (b) during the transformation of acrylonitrile into ammonium acrylate by *R. rhodochrous* M33-2nit and *A. denitrificans* B-9582 cells with different modes of acrylonitrile feeding. (a), 1 – mode 1; 2 – mode 2. (b), 2, 3 – mode 1 for strains B-9582 and M33-2nit, respectively; 1, 4 – mode 2 for strains B-9582 and M33-2nit, respectively

штамм-биокатализатор *R. rhodochrous* M33-2nit, обладающий высокой нитрилазной активностью и операционной стабильностью. Повышенная операционная стабильность биокатализатора M33-2nit может быть связана с повышенной прочностью клеток родококков [23–25]. Особенностью строения клеточных стенок родококков является наличие жесткого каркаса из ковалентно сшитых

молекул миколовых кислот, арабиногалактана и пептидогликанов [26]. Такой каркас жесткости обеспечивает механическую прочность клеток родококков, что важно в условиях интенсивного перемешивания. Альтернативное объяснение повышенной операционной стабильности может быть связано с модификацией фермента внутри клеток родококков, которая обеспечивает устойчивость фермента к действию акрилонитрила. В дальнейшем потребуется решение ряда методических задач для проверки этих гипотез.

Рекомбинантная экспрессионная система, сконструированная на основе промотора нитрилгидратазы из *R. rhodochrous* M8, позволяет получать штаммы, сверхсинтезирующие целевые белки в бактериях *Rhodococcus* (настоящая работа, [12, 19]). Уровень синтеза белка в этой системе сравним с таковым в экспрессионной системе с использованием фагового промотора T7 в *E. coli*. Это указывает на перспективность такой системы конструирования штаммов-продуцентов для биотехнологии на основе бактерий *Rhodococcus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект 16-14-00216 «Изучение системы кобальт-зависимой экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus* и создание на ее основе платформы для получения биокатализаторов синтеза акриловых мономеров»).



**Рис. 6.** Накопление акрилата аммония (1) при трансформации акрилонитрила в акрилат аммония клетками *R. rhodochrous* M33-2nit. Объемы подачи акрилонитрила в реакцию смесь в расчете на 1 мл (2)

**Fig. 6.** The accumulation of ammonium acrylate (1) during the transformation of acrylonitrile into ammonium acrylate by *R. rhodochrous* M33-2nit cells. The volumes of acrylonitrile in the reaction mixture per 1 mL (2)

## Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

## ЛИТЕРАТУРА

- Bork P., Koonin E.V. A new family of carbon–nitrogen hydrolases. *Protein Sci.*, 1994, 3(8), 1344–1346. doi: 10.1002/pro.5560030821
- Pace H.C., Brenner C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology*, 2001, 2(1), doi: 10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001
- Oßwald S., Yanenko A. Hydrolysis of nitriles to carboxylic acids. In: *Enzyme catalysis in organic synthesis*, 3<sup>rd</sup> edn [Edited by K. Drauz, H. Gröger, O. May]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, 2(3), 14, 545–559. doi: 10.1002/9783527639861.ch14
- Алхазов Т.Г., Аджамов К.Ю., Ханмамедова А.К. Каталитическое окисление пропилена. *Успехи химии*. 1982, 51(6), 950–967.
- Bansal V., Delgado Y., Legault M.D., et al. Low Operational Stability of Enzymes in Dry Organic Solvents: Changes in the Active Site Might Affect Catalysis. *Molecules*, 2012, 17(2), 1870–1882. doi: 10.3390/molecules17021870
- Pirozzi D., Halling P.J. Development of small-size tubular-flow continuous reactors for the analysis of operational stability of enzymes in low-water systems. *Biotechnology Bioengineering*, 2001, 72(2), 244–248. doi: 10.1002/1097-0290(2000120)72:2<244::AID-BIT12>3.0.CO;2-J
- Глинский С.А., Козулин С.В., Козулина Т.Н., и др. Сравнительный анализ штаммов, используемых в процессе получения акрилата аммония. *Биотехнология*, 2010, (1), 17–24.
- Новиков А.Д., Рябченко Л.Е., Леонова Т.Е., и др. Бактериальный штамм *Alcaligenes denitrificans* C-32 содержит две нитрилазы с разной субстратной специфичностью. *Биотехнология*, 2016, 32(6), 1–8. doi: 10.21519/0234-2758-2016-32-6-45-52
- Leonova T.E., Astaurova O.B., Ryabchenko L.E., et al. Nitrile hydratase of *Rhodococcus*: Optimization of Synthesis in Cells and Industrial Applications for Acrylamide Production. *Applied Biochem. Biotechnology*, 2000, 88(1–3), 231–241. doi: 10.1385/ABAB:88:1-3:231
- Kobayashi M., Goda M., Shimizu S. Nitrilase Catalyzes Amide Hydrolysis as Well as Nitrile Hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 253(3), 662–666. doi: 10.1006/bbrc.1998.9834
- Yamada H., Kobayashi M. Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide. *Biosci. Biotechnol., Biochemistry*, 1996, 60(9), 1391–1400. doi: 10.1271/bbb.60.1391
- Lavrov K.V., Shemyakina A.O., Grechishnikova E.G., et al. New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous*. *Res. Microbiology*, 2018, 169(4–5), 227–236. doi: 10.1016/j.resmic.2018.03.006
- Simon R., Priefer U., Pühler A.A. Broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1983, 1(9) 784–791. doi: 10.1038/nbt1183-784
- Рябченко Л.Е., Полякова И.Н., Яненко А.С. Мобилизуемые плазмидные векторы, способные к конъюгативному переносу между клетками *E. coli* и *Rhodococcus*, и их использование для конструирования штаммов *Rhodococcus*. *Биотехнология*, 2005, (5), 6–13.
- Gentz R., Langner A., Chang A.C., et al. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. *Proceedings National Academy Sciences*, 1981, 78(8), 4936–4940. doi: 10.1073/pnas.78.8.4936
- Tani K., Kobayashi T., Sakotani A., et al. Expression of the *gyrB* gene as an indicator of growth activity of *Escherichia coli*. *J. Environ. Biotechnol.*, 2012, 12(1), 33–38.
- Byrne G.A., Russell D.A., Chen X., et al. Transcriptional Regulation of the *virR* Operon of the Intracellular Pathogen *Rhodococcus equi*. *J. Bacteriology*, 2007, 189(14), 5082–5089. doi: 10.1128/jb.00431-07
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4), 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Лавров К. В., Новиков А.Д., Рябченко Л.Е., Яненко А.С. Экспрессия гена ациламидазы в штаммах *Rhodococcus erythropolis*. *Генетика*, 2014, 50(9), 1133–1137
- Тарутина М.Г., Раевская Н.М., Шустикова Т.Е. и др. Оценка эффективности промоторов *Corynebacterium glutamicum* и их использование для усиления активности генов у лизин-продуцирующих бактерий. *Биотехнология*, 2015, (6), 16–24.
- Яненко А.С., Астаурова О.Б., Герасимова Т.В. и др. Регуляция утилизации нитрилов у *Rhodococcus*. *Биотехнология*, 1995, (7–8), 139–144.
- Лоренц Й., Воронин С.П., Козулин С.В. и др. Способ культивирования штамма *Rhodococcus rhodochrous* М33, продуцирующего нитрилгидратазу. Патент РФ 2340667. Опубл. 10.12.2008. Бюл. № 34.
- Shiu C., Zhang Z., Thomas C.R. A Comparison of the Mechanical Properties of Different Bacterial Species. In: *Applied Microbiology* [Edited by A. Durieux, J-P. Simon]. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2002, 11, 155–162. doi: 10.1007/0-306-46888-3
- Keshavarz, E., Hoare, M., Dunnill, P. Biochemical engineering aspects of cell disruption. In: *Separations for biotechnology* [Edited by M.S. Verrall, M.J. Hudson]. Chichester, England: Ellis Horwood, 1987, 3, 62–79.
- Edebo, L. Disintegration of cells. In: *Fermentation Advances* [Edited by D. Perlman]. London, England / New York, USA: Academic Press, 1969, 249–271.
- Sutcliffe I. C., Brown A. K., Dover L. G. The *Rhodococcus* cell envelope: Composition, organisation and biosynthesis. In: *Biology of Rhodococcus* [Edited by H.M. Alvarez]. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 29–71. doi: 10.1007/978-3-642-12937-7\_2

# Optimization of Expression of Nitrilase from *Alcaligenes denitrificans* in *Rhodococcus rhodochrous* to Increase the Efficiency of Biocatalytic Synthesis of Ammonium Acrylate

K.V. LAVROV<sup>1,\*</sup>, E.G. GRECHISHNIKOVA<sup>1</sup>, A.O. SHEMYAKINA<sup>1</sup>, A.D. NOVIKOV<sup>1</sup>,  
T.I. KALININA<sup>1</sup>, A.S. EPREMYAN<sup>2</sup>, S.A. GLINSKIY<sup>3</sup>, R.A. MINASYAN<sup>3</sup>, S.P. VORONIN<sup>3</sup>,  
and A.S. YANENKO<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

<sup>2</sup>Scientific Production Center Armbiotechnology, National Academy of Sciences of Armenia, 0056, Yerevan Armenia

<sup>3</sup>Closed Joint Stock Venture BIOAMIDE, 410033, Saratov Russia

\*e-mail: lavrov.ko@gmail.com

\*\*e-mail: yanenko@genetika.ru

Received December 13, 2018

Revised January 24, 2019

Accepted February 15, 2019

**Abstract**—The *Rhodococcus rhodochrous* M33-2nit strain containing in its chromosome two copies of a gene for *A. denitrificans* B-9582 NitC1 nitrilase under the control of a promoter region of genes of *R. rhodochrous* M8 nitrile hydratase has been constructed. The culturing of the strain was optimized and it was shown that using a two-substrate cultivation scheme on glucose and acetate, it was possible to obtain up to 17 g cdw/L of cells with the specific activity of 7 units/mg cdw. A capacity of synthesizing ammonium acrylate from acrylonitrile by the cells of *A. denitrificans* B-9582 and *R. rhodochrous* M33-2nit under the conditions simulating the industrial process was compared. It was shown that the cells of *R. rhodochrous* M33-2nit were able to produce ammonium acrylate at higher rates of acrylonitrile feeding, than the cells of *A. denitrificans* B-9582. Using the *R. rhodochrous* M33-2nit cells, high-concentration solutions of ammonium acrylate (450 g/L) were obtained with the conversion rate of 99.5%.

**Key words:** *Rhodococcus rhodochrous*, nitrilase, nitrile hydratase promoter, ammonium acrylate, acrylonitrile, biocatalysis.

**Acknowledgement** – This work was supported by Russian Science Foundation (project №16-14-00216 «Study on cobalt-dependent gene expression in *Rhodococcus* bacteria and construction on its basis of a platform for biosynthesis of enzyme biocatalysts for obtaining of acrylic monomers»)

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-1-27-37