

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.214.622:579.66

Синтез аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализаторов штаммов *Escherichia coli* с удаленными генами фумараз

© 2016 Д.Д. ДЕРБИКОВ*, А.Д. НОВИКОВ, Т.А. ГУБАНОВА, М.Г. ТАРУТИНА, И.Т. ГВИЛАВА, Д.М. БУБНОВ, А.С. ЯНЕНКО**

ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” (ГосНИИгенетика), Москва

e-mail: den_derb@mail.ru*, yanenko@genetika.ru**

Резюме — С использованием фаг лямбда-зависимой системы рекомбинации сконструированы производные штамма *Escherichia coli* MG1655 с удаленными генами фумараз — *fumAC*, *fumB* и *fumABC*. Показано, что удаление гена *fumB* практически не оказывало влияния на рост штамма при аэробных условиях, в то время как удаление генов *fumA* и *fumC* приводит к снижению скорости роста на 30% в аналогичных условиях. При использовании штаммов *E. coli* с удаленными генами фумараз в качестве катализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония (1,5 М растворов) обнаружено, что только в случае одновременной утраты генов *fumA* и *fumC* наблюдается увеличение выхода аспарагиновой кислоты не менее чем на 20% и параллельное снижение содержания в реакционной смеси побочного продукта — яблочной кислоты — с 40 до 1,5–2 г/л. Полученные результаты могут быть использованы для создания новых, более эффективных биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты.

Ключевые слова: аспартаза, фумараза, экспрессия, *Escherichia coli*.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-5-38-48

Synthesis of Aspartic Acid using *Escherichia coli* Strains with Deleted Genes for Fumarases as Biocatalysts

© 2016 D.D. DERBIKOV*, A.D. NOVIKOV, T.A. GUBANOVA, M.G. TARUTINA, I.T. GVILAVA, D.M. BUBNOV, A.S. YANENKO**

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

e-mail: den_derb@mail.ru*, yanenko@genetika.ru**

Abstract — Derivatives of the *Escherichia coli* MG1655 strain with the deleted genes for fumarases, *fumAC*, *fumB* and *fumABC*, have been constructed using the phage lambda-dependant recombination system. It was shown that the lacking of the *fumB* gene had practically no effect on the strain growth under aerobic conditions, whereas the deleted *fumA*- and *fumC* genes provided the decrease in the growth rate by 30% under the analogous conditions. Using the fumarase-deprived *E. coli* biomasses as catalysts in the synthesis of L-aspartic acid from fumarate (1.5 M solutions), it was found out that the combined deletion of both *fumA* and *fumC* genes only provided the increase in the aspartic acid yield by no less than 20% and parallel reducing of the L-malic acid (a side-product) content in the reaction mixture from 40 g/L to 1.5–2.0 g/L. The obtained results can be helpful in the construction of new more efficient biocatalysts for the L-aspartic acid synthesis.

Key words: aspartase, *Escherichia coli*, expression, fumarase.

L-аспарагиновая кислота является важнейшим клеточным метаболитом, участвующим в синтезе аминокислот и белков. В живых организмах L-аспарагиновая кислота образуется в резуль-

тате реакций аминирования органических кислот. Одна из таких реакций — аминирование фумаровой кислоты с участием фермента аспартазы (рис. 1) — положена в основу промышленного

Список сокращений: ВКПМ — Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика); ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Луриа—Бергани; тпн — тысяч пар нуклеотидов; OD — оптическая плотность.



Рис. 1. Ферментативные реакции превращения фумаровой кислоты в клетках *E. coli*

Fig. 1. Enzymatic reactions of fumaric acid transformation in *E. coli* cells

способа получения L-аспарагиновой кислоты [1]. В этом процессе в качестве катализатора используются нерастущие клетки бактерий, обладающие высокой аспартазной активностью. Однако в таких клетках фумаровая кислота также может подвергаться и другим превращениям, например гидратации под действием фермента фумаразы с образованием яблочной кислоты (см. рис.1).

L-аспарагиновая кислота находит широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности, а также в сельском хозяйстве [2]. При биокаталитическом получении аспарагиновой кислоты образующаяся под действием фумаразы яблочная кислота является побочным продуктом, который ухудшает качество основного. Одним из способов снижения в клетках бактерий фумаразной активности является инактивация генов, кодирующих фумаразу. Известно, что клетки *E. coli*, широко используемые для получения L-ас-

парагиновой кислоты, содержат три гена фумаразы — *fumA*, *fumB* и *fumC* и три соответствующих фермента, которые катализируют превращение фумарата в малат в цикле трикарбоновых кислот и функционируют при аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях, соответственно [3].

В данной работе представлены результаты конструирования производных штамма *Escherichia coli* MG1655 с удаленными генами *fumAC*, *fumB* и *fumABC* и их использования в качестве катализаторов для получения L-аспарагиновой кислоты.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы, плазмиды и условия выращивания

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

Таблица 1
Table 1

Бактериальные плазмиды и штаммы, использованные в работе

Bacteria plasmids and strains used in this work

Плаزمида и штамм Plasmid, strain	Краткая характеристика Brief description	Источник Source
1	2	3
pMW118	4,2 тпн, kb (Amp ^R)	Nippon Gene, Токио, Япония Tokyo Japan
pMW-attL-Cm-attR-TrnB	5,5 тпн kb (Amp ^R Cat ^R)	[4]
pUC4K	3,9 тпн, kb (Amp ^R Kan ^R)	GE Healthcare, Англия Amersham, England
pUC19	2,7 тпн, kb (Amp ^R)	Thermo Scientific, Литва Vilnius, Lithuania
pKD46	6,3 тпн, kb (Amp ^R Ts)	[5]
pICA	5,8 тпн (Amp ^R Cat ^R sacB ^S), донор кассеты 5.8 kb (Amp ^R Cat ^R sacB ^S), a cassette donor	Настоящая работа This work

1	2	3
<i>E. coli</i> XL1	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]	ВКПМ VKPM
<i>E. coli</i> TG1	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rk-mk-) [F' traD36 proAB lacI ^q Z ΔM15]	То же »
<i>B. subtilis</i> 168	ВКПМ B1727	»
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ λ ⁻ ilvG- rfb-50 rph-1	»
<i>E. coli</i> D30	<i>E. coli</i> MG1655 ΔiclR::cat-sacB	Настоящая работа This work
<i>E. coli</i> D34 ΔiclR	<i>E. coli</i> MG1655 ΔiclR	»
<i>E. coli</i> D39	<i>E. coli</i> MG1655 ΔiclR ΔfumB::cat-sacB	»
<i>E. coli</i> D51 ΔfumB	<i>E. coli</i> MG1655 ΔiclR ΔfumB	»
<i>E. coli</i> D45 ΔfumAC	<i>E. coli</i> MG1655 ΔiclR ΔfumA-fumC::cat-sacB	»
<i>E. coli</i> D76 ΔfumABC	<i>E. coli</i> MG1655 ΔiclR ΔfumB ΔfumA-fumC::cat-sacB	»

Компоненты питательных сред получены от фирмы BD (США). Для выращивания штаммов использовали среду LB следующего состава, г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5 и NaCl — 5; pH 7,2. Отбор клонов, устойчивых к сахарозе, осуществляли на среде Sula, содержащей, г/л: триптон — 12, дрожжевой экстракт — 6, агар — 12 и сахарозу — 60; pH 7,2.

Культивирование штаммов проводили при 37° с постоянным перемешиванием (300 об/мин). В случае необходимости при культивировании генетически маркированных штаммов *E. coli* в среду LB добавляли антибиотики в следующих концентрациях (мкг/мл): ампициллин — 100, хлорамфеникол — 10 (Sigma, США).

Праймеры, использованные в работе и синтезированные ЗАО «Евроген», приведены в табл. 2.

Методы работы с ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Вильнюс, Литва) согласно рекомендациям производителя. Выделение фраг-

ментов ДНК из геля проводили с помощью GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя. Ферменты рестрикции (Thermo Scientific), ДНК-лигазу фага T4 (Thermo Scientific) использовали согласно рекомендациям производителя или как описано в руководстве [6].

Конструирование вспомогательной плазмиды pICA для получения делеционных штаммов. Плазида pICA является производной вектора pUC19, содержащего ген *cat*, ответственный за устойчивость к хлорамфениколу, источником которого служила плазида pMW118-λattL-Cm^R-λattR, и ген *sacB*, кодирующий фермент левансахаразу, источником которого служила хромосомная ДНК *Bacillus subtilis* 168 (ВКПМ B1727). Схема конструирования плазмиды pICA показана на рис. 2.

Плазида pICA (рис. 3) размером 5.8 тпн была использована в работе по получению делеционных штаммов.

Конструирование делеционных мутантов штамма *E. coli* MG1655. Получение делеционных мутантов штамма *E. coli* MG1655 проводили методом λ-red-зависимой рекомбинации [5] с модификациями [7] (рис.4).

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Oligonucleotide primers used in this work

Праймер Primer	Последовательность праймера 5'→3' Primer 5'→3' sequence	Назначение Intended use
1	2	3
sacBSforw	cgtctagattttaacccatcacatatacc	Конструирование pICA Construction of pICA
sacBSrev	gggtcgacaaaaggtaggaatacggtag	То же Construction of pICA
iclR-1	Caataaaaatgaaaatgatttccacgatacagaaaaaag agactgtcatgcagg gtttcccagtcacga	Удаление локуса iclR Elimination of iclR locus
iclR-2	Agaatattgcctctgcccgccagaaaaagtcagcgc attccaccgtacgatgtgtggaattgtgagc	То же Elimination of iclR locus
iclR-3	Aaaagagactgtcatggtcgacccattcccgcgaaacgc	Удаление маркера из локуса iclR Elimination of marker from iclR locus
iclR-4	Cctctgcccgccagaaaaagtcagcgcattccaccgtacg gggtttcgcgggaatggg	То же Elimination of marker from iclR locus
fumB-1	Ggcacgccattttcgaataacaatacagagttacaggctg gaagctatgcagggtttcccagtcacga	Удаление fumB Elimination of fumB
fumB-2	Gcatgctgccaggcgtgggccgaagaggttacttagtgc agttcgcgcaatgtgtggaattgtgagc	То же Elimination of fumB
fumB-3	Cgcggcacgccatttgcgaataacaatacagagttacagg ctggaagctcctctcg	Удаление маркера из локуса fumB Elimination of marker from fumB locus
fumB-4	Ggccaggggatcacctggcagcatgctgccaggcgcgtg ggccgaagaggagcttcacg	То же Elimination of marker from fumB locus
fumAC-1	Aacaccgcccagagcataaccaaccaggcagtaagtg agagaacaatgcagggtttcccagtcacga	Удаление fumA—fumC Elimination of fumA— fumC
fumAC-2	Attccacggctgcac ctgtatgttcagattaacgcccggc ttcactatgtgtggaattgtgagc	То же Elimination of fumA— fumC
autoiclR-5	cgataactctggatcatgttg	Проверка наличия гена <i>iclR</i> Check for occurrence of <i>iclR</i> gene
iclR-6	aaagaactacgaggaatacagag	То же Check for occurrence of <i>iclR</i> gene
fumB-5	ctacggttattacatcctgc	Проверка наличия гена <i>fumB</i> Check for occurrence of <i>fumB</i> gene
fumB-6	tggtgagttcgaaatcaggg	То же Check for occurrence of <i>fumB</i> gene
fumAC-5	gacaatgtgcagaccg	Проверка наличия генов <i>fumA—fumC</i> Check for occurrence of <i>fumA—fumC</i> genes

1	2	3
fumAC-6	ctggacggattttccatacc	То же Check for occurrence of <i>fumA</i> — <i>fumC</i> genes
sacB-1	gctgaacaaaactggccttg	Проверка наличия гена <i>sacB</i> Check for occurrence of <i>sacB</i> gene
cat-1	ggtacattgagcaactgac	Проверка наличия гена <i>cat</i> Check for occurrence of <i>cat</i> gene
RT-fumA-1	ggatgtagtgagcgaagtat	Определение транскрипции гена <i>fumA</i> Detection of <i>fumA</i> gene transcription
RT-fumA-2	gcgatgtggaactggaaaa	То же Detection of <i>fumA</i> gene transcription
RT-fumB-1	ggtgagcgacaaaacgagtgga	Определение транскрипции гена <i>fumB</i> Detection of <i>fumB</i> gene transcription
RT-fumB-2	aggcgaagcgggtaagtga	То же Detection of <i>fumB</i> gene transcription
RT-fumC-1	ctgagagcaggctgtattcg	Определение транскрипции гена <i>fumC</i> Detection of <i>fumC</i> gene transcription
RT-fumC-2	taacgctggggcaggagattt	То же Detection of <i>fumC</i> gene transcription
RT-aspA-1	agtccactaacgacgcctac	Определение транскрипции гена <i>aspA</i> Detection of <i>aspA</i> gene transcription
RT-aspA-2	cgcagttggttaatcgcatcta	То же Detection of <i>aspA</i> gene transcription
RNApoly-1	tccgctctgctaactgcctta	Определение транскрипции гена РНК-полимеразы Detection of RNA polymerase gene transcription
RNApoly-2	gctcaacctcggtacgctgta	То же Detection of RNA polymerase gene transcription

Метод основан на гомологичной рекомбинации, которая происходит между хромосомой и введенным в клетку линейным фрагментом ДНК при участии *red*-системы бактериофага λ . Введенная в клетку линейная ДНК, имеющая короткие области гомологии (50 пн) с хромосомой, в присутствии плазмиды pKD46 (обеспечивает клетку белками рекомбинации Red $\alpha\beta\delta$) интегрирует в хромосому за счет двух актов рекомбинации с замещением присутствовавшего в ней ранее гена.

Конструирование делеционных вариантов производили в два этапа:

1) ген, который предполагается удалить, замещали на фрагмент, содержащий гены *cat-sacB*

(см. рис. 4, а). Фрагмент, несущий гены *cat* и *sacB*, получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду pISA и праймеры, гомологичные флангам (см. табл. 2). Фрагмент *cat-sacB* вводили в клетки *E. coli* MG1655 (pKD46) с помощью электропорации. Клоны, в которых происходила интеграция фрагмента в хромосому, отбирали на чашках с агаризованной средой LB по устойчивости к хлорамфениколу. Наличие вставки подтверждали путем ПЦР с праймерами, приведенными в табл. 2.

2) второй этап проводили, если фрагмент *cat-sacB* требовалось удалить из конструируемой хромосомы (см. рис. 4, б). В этом случае фрагмент, содержащий *cat-sacB* в хромосоме, замещали на

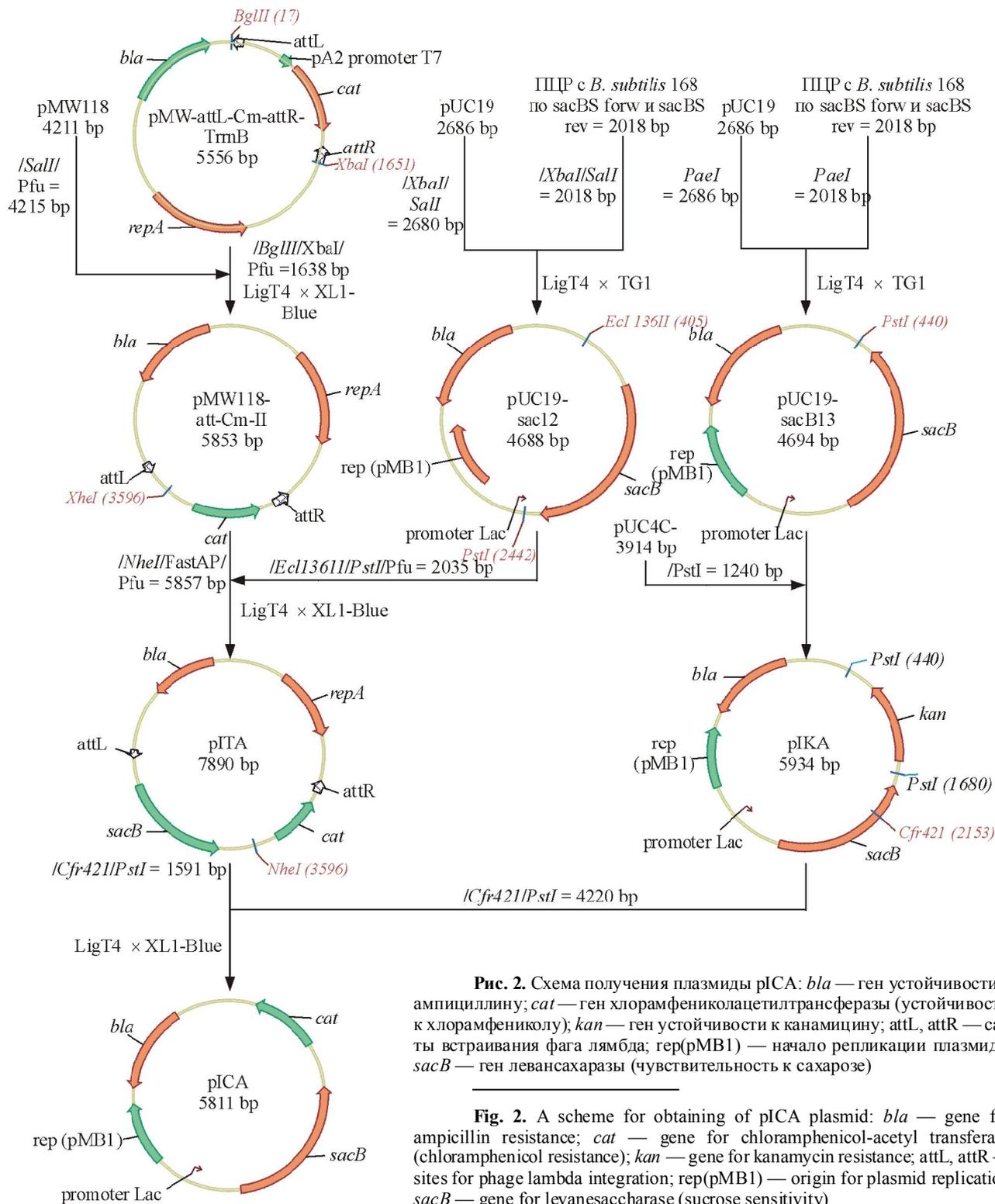


Рис. 2. Схема получения плазмиды pICA: *bla* — ген устойчивости к ампициллину; *cat* — ген хлорамфениколацетилтрансферазы (устойчивости к хлорамфениколу); *kan* — ген устойчивости к канамицину; *attL*, *attR* — сайты встраивания фага лямбда; *rep*(pMB1) — начало репликации плазмиды; *sacB* — ген левансахаразы (чувствительность к сахарозе)

Fig. 2. A scheme for obtaining of pICA plasmid: *bla* — gene for ampicillin resistance; *cat* — gene for chloramphenicol-acetyl transferase (chloramphenicol resistance); *kan* — gene for kanamycin resistance; *attL*, *attR* — sites for phage lambda integration; *rep*(pMB1) — origin for plasmid replication; *sacB* — gene for levanesaccharase (sucrose sensitivity)

линейный фрагмент ДНК, содержащий последовательности, гомологичные областям генома, которые фланкируют делетируемый ген. Фрагмент получали с помощью ПЦР, используя праймеры, имеющие частичную гомологию друг с другом

(см. табл. 2). Очищенный фрагмент ДНК вводили в клетки *E. coli* MG1655, несущие плазмиду pKD46, с помощью электропорации. Клоны, содержащие вставку в хромосоме, отбирали на агаризованной среде Sula с сахарозой. Наличие вставки под-

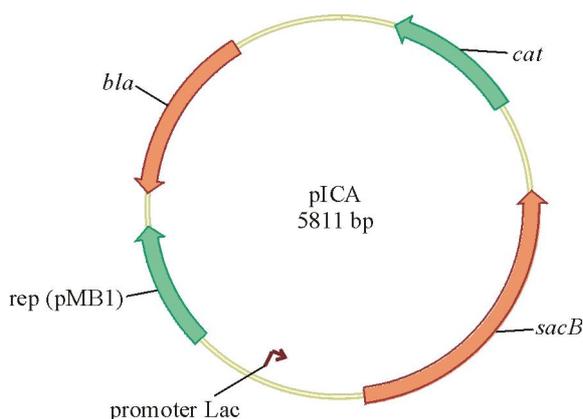


Рис. 3. Карта плазмиды pICA: *bla* — ген устойчивости к ампициллину; *cat* — ген устойчивости к хлорамфениколу; *rep*(pMB1) — начало репликации плазмиды; *sacB* — ген левансахаразы (чувствительность к сахарозе)

Fig. 3. A map for pICA plasmid: *bla* — gene for ampicillin resistance; *cat* — gene for chloramphenicol resistance; *rep*(pMB1) — origin for plasmid replication; *sacB* — gene for levansaccharase (sucrose sensitivity)

тверждали секвенированием с помощью автоматического секвенатора SEQ8000 (Beckman Coulter) в ЦКП ФГУП ГосНИИгенетика.

Определение аспартазной активности

Клетки, имеющие аспартазную активность, осаждали центрифугированием. К осадку добавляли 1,0 М раствор фумарата аммония. Смесь выдерживали при 37° в течение 45 мин. К 1 мл клеточной суспензии добавляли 9 мл 1,5 М раствора фумарата аммония и смесь инкубировали при 37°

в течение 60 мин. Параллельно готовили контрольные пробы, в которых к 1 мл клеточной суспензии добавляли 9 мл дистиллированной воды. Содержание аспарагиновой кислоты в образцах определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 510 нм. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль аспарагиновой кислоты за 1 мин при 37°.

После проведения трансформации образцы проб центрифугировали, надосадочную жидкость разводили в 40 раз и анализировали методом ВЭЖХ.

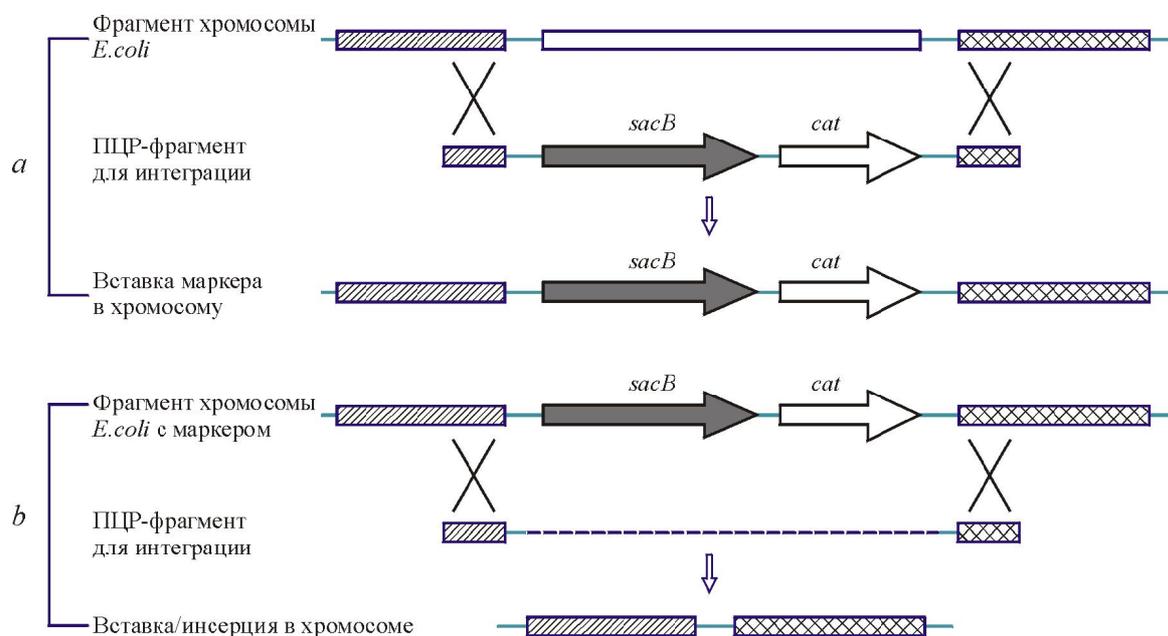


Рис. 4. Схема конструирования делеционных мутантов: *a* — первый этап, *b* — второй этап; *sacB* — ген левансахаразы (чувствительность к сахарозе); *cat* — ген устойчивости к хлорамфениколу

Fig. 4. A two stage (*a* and *b*, respectively) scheme for construction of deletion mutants: *sacB*, gene for levansaccharase; *cat*, gene for chloramphenicol resistance. Inscriptions, from top to bottom: *E. coli* chromosome fragment; PCR fragment for integration; Insertion of marker into chromosome; *E. coli* chromosome with marker; PCR fragment for integration; Insertion into chromosome

Определение содержания органических кислот методом ВЭЖХ

Данный анализ проводили на установке ВЭЖХ производства Alliance (США) (Separations Module Waters 2695, Photodiode Array detector Water 2996) с использованием колонок типа YMC-Triart C18 (5 мкм, 12 нм, 250 × 4.6 мм). Смесь разводили водой в 20 раз и центрифугировали в течение 5 мин при 30000 g. Аликвоту полученного раствора объемом 0,9 мл переносили в пробирки и подвергали ВЭЖХ при следующих условиях: элюент — 0,1%-ная H₃PO₄, скорость протока — 1,0 мл/мин, температура колонки — 30°, λ — 210 нм, время анализа — 20 мин. Прием и обработку данных производили с использованием компьютерной системы Empower Pro.

Количественный анализ экспрессии гена

Для измерения уровня транскрипции генов *fumA*, *fumB*, *fumC* и *aspA*, использовали количественную ПЦР в реальном времени. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen), согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с применением набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия), согласно рекомендациям производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе Applied Biosystems 7500 Fast с использованием смеси ПЦРqPCRmix-HS SYBR+ +LowROX («Евроген»). Праймеры, используемые для оценки транскрипции генов, указаны в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов *E. coli* с удаленными генами фумараз

В клетках *E. coli* содержатся три гена, контролирующих образование фумараз, при этом два из них — *fumA* и *fumC* — находятся в одном локусе хромосомы и образуют единую группу сцепления, а третий ген — *fumB* — в другом локусе [8]. Для получения штаммов *E. coli* с удаленными генами фумараз был использован подход, основанный на λ-*red*-зависимой рекомбинации (см. раздел «Условия эксперимента»). В качестве исходного штамма для получения делеционных мутантов был использован вариант *E. coli* D34Δ*iclR*, у которого активирован глиоксалатный шунт за

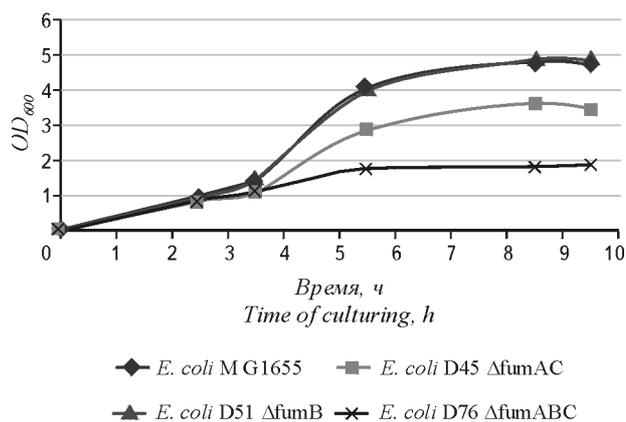


Рис. 5. Рост штаммов с удаленными генами фумараз

Fig. 5. Growth of strains with deleted genes for fumarases

счет делеции гена репрессора *iclR* (штамм получен в настоящей работе). Известно [9, 10], что активация глиоксалатного шунта является необходимым фактором для получения полных делетантов по генам фумараз. Всего нами было получено три типа мутантов: с удаленным геном *fumB*, с удаленными генами *fumA* и *fumC* (Δ*fumAC*, делеции находятся в одном локусе), и мутант, у которого были удалены все три гена фумараз — *fumB*, *fumA* и *fumC* (Δ*fumABC*). При этом штаммы *E. coli* D45Δ*fumAC* и *E. coli* D39 были получены путем замещения генов *fumAC* и *fumB* на кассету *cat-sacB* в соответствии с описанной схемой (см. рис. 4). Для получения штамма, у которого удалены все три гена фумараз (*E. coli* D76Δ*fumABC*), был использован штамм *E. coli* D51Δ*fumB*, утративший *fumB*, у которого затем гены *fumAC* были замещены кассетой *cat-sacB*. Структура каждого мутанта была подтверждена с помощью ПЦР-анализа и секвенирования локуса.

На рис. 5 показаны кривые роста полученных штаммов *E. coli* с удаленными генами фумараз при аэробном культивировании в колбах. Культивирование проводили на среде LB при 37° с постоянным перемешиванием. Оптическую плотность культуры определяли при длине волны 600 нм. Можно видеть, что штамм с удаленным геном *fumB* (*E. coli* D51Δ*fumB*) практически не отличается по скорости роста от родительского штамма, что согласуется с ранее полученными результатами о том, что фумараза, кодируемая геном *fumB*, практически не функционирует при аэробных условиях [11]. Однако одновременное удаление генов *fumA* и *fumC* (*E. coli* D45Δ*fumAC*) приводит

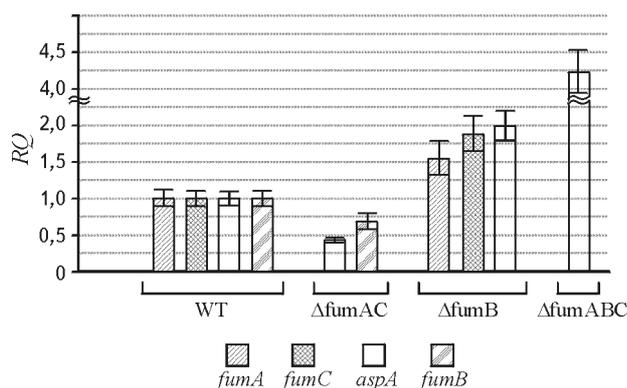


Рис. 6. Уровень транскрипции генов *fumA*, *fumB*, *fumC* и *aspA* у делеционных мутантов *E. coli* по генам фумараз; (RQ — условные единицы)

Fig. 6. Level of transcription of *fumA*, *fumB*, *fumC* and *aspA* genes in various *E. coli* mutants with deletions in genes for fumarases. RQ, relative quantification

ло к снижению роста (не менее чем на 30%) по сравнению с исходным штаммом. Утрата всех трех генов фумараз (*E. coli* D76Δ*fumABC*) приводила к существенному (в 2 раза и более) подавлению роста мутанта по сравнению с исходным штаммом. При этом следует отметить, что различия в скорости роста между мутантами наблюдались только после 3—4 ч культивирования, что, по-видимому, связано с накоплением в клетках метаболитов, ингибирующих их рост.

Транскрипционный анализ штаммов с удаленными генами фумараз

Уровень транскрипции генов фумараз и аспартазы (*aspA*) в полученных штаммах был изучен с помощью ПЦР в реальном времени. Оказалось, что уровень транскрипции генов фумараз у полученных делеционных мутантов варьирует незначительно: у *E. coli* B51Δ*fumB* наблюдали повышение транскрипции генов *fumA* и *fumC* (на 50%—70%), а у штамма с удаленными генами *fumA* и *fumC* (*E. coli* D45Δ*fumAC*) фиксировали незначительное снижение уровня транскрипции гена *fumB* (рис. 6).

В то же время, уровень транскрипции гена аспартазы существенным образом зависел от генетической структуры штамма. Минимальный уровень транскрипции гена *aspA* наблюдался у штамма с удаленными генами *fumAC*, а максимальный (в 4 раза выше исходного) — у штамма, в котором отсутствовали все три гена фумараз.

При этом аспартазная активность у четырех исследованных штаммов была следующей, мкмоль/мин: WT — 3,0; Δ*fumAC* — 5,7; Δ*fumB* — 3,7; Δ*fumABC* — 4,5. Видно, что величина аспартазной активности в клетках штаммов не коррелировала с уровнем транскрипции гена *aspA*, что, по-видимому, связано с особенностями формирования активного фермента за счет посттрансляционных модификаций [12].

Синтез аспарагиновой кислоты с помощью полученных штаммов с удаленными генами фумараз

Полученные мутанты с удаленными генами фумараз были использованы в качестве биокатализатора при синтезе аспарагиновой кислоты из фумарата аммония (1,5 М раствор). С этой целью была получена биомасса клеток каждого штамма путем культивирования в среде LB при 37° с постоянным перемешиванием (300 об/мин) в течение 16 ч. Клетки каждого штамма в суспензии (OD₆₀₀ = 0,3) активировали, обрабатывали этилацетатом, смешивали с 1,5 М раствором фумарата аммония и инкубировали при 37° в течение 22 ч с перемешиванием. В реакционной смеси определяли содержание L-аспарагиновой, фумаровой и яблочной кислот с помощью ВЭЖХ. В качестве контроля использовали исходный штамм *E. coli* MG1655. Усредненные результаты такого анализа представлены в табл. 3.

Из результатов табл. 3 следует, что максимальный уровень накопления L-аспарагиновой кислоты (193,29 мг/мл) наблюдается в случае использования в качестве катализатора клеток с удаленными генами *fumA* и *fumC*. В этом случае также отмечается самое низкое содержание субстрата — фумарата в реакционной смеси (5 мг/мл) и побочного продукта — яблочной кислоты (2 мг/мл). В контрольном эксперименте в реакционной смеси содержалось 150 мг/мл L-аспарагиновой кислоты, 12,97 мг/мл фумаровой и 37,98 мг/мл яблочной. Биокатализатор *E. coli* D76Δ*fumABC*, у которого были удалены все три гена фумараз, обладал схожими с Δ*fumAC* характеристиками. В то же время, катализатор *E. coli* D51Δ*fumB* практически не отличался от исходного штамма по уровню содержания яблочной кислоты в реакционной смеси.

Таким образом, использование в качестве катализатора биомассы клеток *E. coli*, у которых удалены либо гены *fumAC*, либо все три гена фу-

Состав реакционной смеси после трансформации фумарата аммония в аспарагиновую кислоту в присутствии различных биокатализаторов

Composition of reaction mixture after ammonium fumarate transformation to aspartic acid in the occurrence of various biocatalysts

Продукт (кислота) Product (acid)	Содержание кислот в реакционной смеси при использовании биокатализаторов, мг/мл Content of acid at use biocatalysts, mg/mL			
	<i>E. coli</i> MG1655	<i>E. coli</i> D45ΔfumAC	<i>E. coli</i> D51ΔfumB	<i>E. coli</i> D76ΔfumABC
L-аспарагиновая Aspartic	150,5	193,29	133,57	182,4
Яблочная Malic	37,98	2,16	40,74	1,29
Фумаровая Fumaric	12,97	5,07	23,35	12,84

маз (*fumABC*), позволяет не менее, чем в 15 раз снизить содержание в реакционной смеси побочного продукта (яблочной кислоты) и повысить примерно на 20% конверсию фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования штаммов с удаленными генами фумараз в качестве биокатализатора для промышленного производства L-аспарагиновой кислоты.

Благодарности

Работа проводилась в рамках межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» по государственному контракту с Министерством образования и науки Российской Федерации № 14.M04.12.0004 от 27 июня 2014 г. «Разработка технологии получения L-аспарагиновой кислоты биокаталитическим способом».

Acknowledgements

The work was a part of an Interstate Target Program of EurAsEC “Innovative Biotechnologies” according to the State Contract with the Ministry of Education and Science of RF, 14.M04.12.0004, June 27, 2014 “Development of Technique for Obtaining L-Aspartic Acid by Method of Biocatalysis”.

Поступила в редакцию 08.06.2016
Received June 08, 2016

ЛИТЕРАТУРА

1. Tosa T., and Shibatani T. Industrial application of immobilized biocatalysts in Japan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995, 750, 364—375.
2. Шейко И., Радчиков В., Саханчук А., и др. Премиксы. Баланс экономии и продуктивности. *Белорусское сельское хозяйство*. 2014. 143(3) 40—43.
3. Tseng C., Yu C., Lin H., et al. Oxygen and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (*fuma*, *fumb* and *fumc*) activity. *J. Bacteriol.* 2000, 183(2), 461—467.
4. Katashkina Z., Skorokhodova A., Zimenkov D., et al. Tuning of expression level of the genes of interest located in the bacterial chromosome. *Mol. Biol. (Mosc)*. 2005, 39, 823—831.
5. Datsenko K., Wanner B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97, 6640—6645.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва, Мир, 1984.
7. Sun W., Wang S., Curtiss R. Highly efficient method for introducing successive multiple scarless gene deletions and markerless gene insertions into the yersinia pestis chromosome. *App. Env. Microbiol.* 2008, 74(13), 4241—4245.
8. Guest J.R., Miles J.S., Roberts R.E. et al. The fumarase genes of *Escherichia coli* location of the *fumB* gene and discovery of a new gene (*fumC*). *J. General. Microbiol.* 1985, 131, 2971—2984.
9. Yamamoto K., and Ishihama A. Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 183—194.

10. Song C.W., Kim D.I., Choi S. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110(7), 2025—2034.
11. Park S.J., and Gunsalus R.P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: Role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene Products. *J. Bacteriol.* 1995, 177(21), 6255—6262.
12. Viola R.L.-aspartase: new tricks from old enzyme. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 2000, 74, 295—341.

Д.Д. Дербиков,
Младший научный сотрудник,
D.D. Derbikov,
Junior Researcher,
e-mail: den_derb@mail.ru

А.Д. Новиков,
Научный сотрудник,
A.D. Novikov,
Researcher,
e-mail: andrnov@genetika.ru

Т.А. Губанова,
Научный сотрудник,
T.A. Gubanova,
Researcher,
e-mail: tgubanowa@yandex.ru

М.Г. Тарутина,
Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,
M.G. Tarutina,
Ph.D, Senior Researcher,
e-mail: m_tarutina@mail.ru

И.Т. Гвилава,
Инженер,
I.T. Gvilava,
Engineer,
e-mail: itgvilava@genetika.ru

Д.М. Бубнов,
Инженер,
D.M. Bubnov,
Engineer,
e-mail: bubnov.dmitrii@mail.ru

А.С. Яненко,
Доктор биологических наук,
заместитель директора по научной работе ФГУП,
заведующий лабораторией,
A.S. Yanenko,
Doct. Sci.,
Deputy Director of GosNIIgenetika for Science,
Head of Laboratory,
e-mail: yanenko@genetika.ru