

УДК 577.214.622:579.66

## Мутации в гене *fusA*, кодирующем фактор элонгации G у коринеформных бактерий, приводят к повышению продукции лизина

© 2016 г. И.П. ТОКМАКОВА\*, Л.Е. РЯБЧЕНКО, Т.В. ГЕРАСИМОВА, С.В.КАМЕНЕВА, А.С. ЯНЕНКО\*\*

ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: tokmakovai@yandex.ru\*, yanenko@genetika.ru\*\*

Поступила в редакцию 30.11.2016

Устойчивость к фузидиевой кислоте бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* связана с мутациями в гене *fusA*, кодирующем фактор элонгации G (EF-G). Оказалось, что от 2 до 10% клонов, устойчивых к фузидиевой кислоте, продуцируют больше лизина, чем родительские штаммы. Секвенирование гена *fusA* из клонов, обладающих повышенным уровнем продукции лизина, выявило две мутации в гене в положении 1383–С1383G и С1383А. Эти мутации приводят к аминокислотной замене в положении 461 белка EF-G, в результате которой гистидин замещается на глутамин (H461Q). С помощью гомологичной рекомбинации мутация С1383G была введена в хромосомную копию гена *fusA* в штаммах *C. glutamicum* и *B. flavum*. Все полученные клоны, содержащие мутантный ген *fusA*, продуцировали на 9–18% лизина больше, чем родительские штаммы

**Ключевые слова:** ген *fusA*, мутации гена *fusA*, синтез L-лизина, устойчивость к фузидиевой кислоте, фактор элонгации G, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum*.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-53-59

L-лизин относится к группе незаменимых аминокислот и является наиболее востребованной кормовой добавкой для животноводства и птицеводства. Основным способом получения L-лизина является ферментация сахаров с помощью таких бактерий, как *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium* sp. [1], а также кишечной палочки *Escherichia coli* [2]. Для увеличения продукции L-лизина, как правило, используют модифицированные (генетически измененные) штаммы бактерий с повышенной продуктивностью, полученные либо с помощью генетической инженерии, либо традиционными селекционными методами.

Одним из подходов к повышению продуктивности штаммов является получение мутантов, устойчивых к антибиотикам, которые действуют на рибосомный комплекс [3]. Например, устойчивость к канамицину у штамма *C. glutamicum* KFCC10881-CJP5103 сопровождалась увеличе-

нием на 8% его продуктивности по лизину в сравнении с родительским штаммом [4].

Фузидиевая кислота также относится к группе антибиотиков, которые подавляют синтез белка на рибосомах. Известно, что устойчивость к фузидиевой кислоте у *Staphylococcus aureus* обусловлена мутациями в гене *fusA*, кодирующем фактор элонгации G (EF-G) рибосомного комплекса [5]. Однако в литературе отсутствуют сведения о мутантах лизин-продуцирующих бактерий (*Corynebacterium* или *Brevibacterium*), устойчивых к фузидиевой кислоте. Поэтому для целей селекции штаммов представляло значительный интерес исследовать взаимосвязь между устойчивостью к фузидиевой кислоте и уровнем продукции лизина.

Целью данной работы было изучение синтеза лизина штаммами коринеформных бактерий (*C. glutamicum* и *B. flavum*), устойчивыми к фузидиевой кислоте.

Список сокращений: ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; КЖ – культуральная жидкость; среда LB – среда Лурия–Бертани.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

## Бактериальные штаммы, плазмиды и условия культивирования

Штамм *C. glutamicum* GEN1-6 – производный штамма *C. glutamicum* ATCC13032 – был получен путем замещения нативного аллеля гена *lysC* на мутантный *lysC<sup>T3111</sup>* (устойчивость к ретроингибированию) с помощью гомологичной рекомбинации [6].

Для конструирования плазмид и в качестве промежуточного хозяина использовали стандартный штамм *E. coli* XLI Blue. Штаммы *E. coli* растили при 37°C на среде LB, следующего состава, г/л: триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, хлористый натрий – 5; твердая среда дополнительно содержала бактоагар (15 г/л). Все реактивы и субстраты были получены от Sigma-Aldrich Co. (Merck). При необходимости в среду добавляли антибиотики канамицин (ОАО «Синтез», Россия) – до концентрации 50 мкг/мл и ампициллин (ОАО «Синтез») – до 100 мкг/мл.

Штаммы *C. glutamicum* и *B. flavum* выращивали на среде 2 × LB с 1%-ной мальтозой при 30°C. При необходимости в среду добавляли антибиотики канамицин (17 мкг/мл) и фузидиевую кислоту (5 мкг/мл) (ОАО «Биосинтез», Россия).

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в данной работе, приведены в табл. 1.

Для определения уровня продукции лизина, штаммы *C. glutamicum* и *B. flavum* культивировали в ферментационной среде следующего состава, г/л: глюкоза – 100, хлорид аммония – 25, фосфат калия однозамещенный – 1, сульфат магния семиводный – 1, мел – 25, биотин – 0,0001, тиамин – 0,0002 (Sigma-Aldrich Co. (Merck)) с добавлением гидролизата пшеничного глютена – 50,0 мл (ЗАО «Завод Премиксов № 1», Россия) в течение 36-48 ч при 30°C с перемешиванием (250 об/мин).

Получение фузидиностойчивых клонов (Fus<sup>R</sup>)

Культуры *C. glutamicum* или *B. flavum*, предварительно выращенные в течение 24 ч при интенсивном перемешивании (240 об/мин), высе-

Таблица 1

## Характеристика использованных штаммов и плазмид

## Characteristics of strains and plasmids used

Штамм, плазида	Характеристика	Источник получения
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Дикий тип	ВКПМ (ГосНИИгенетика)
<i>C. glutamicum</i> GEN1-6	Производный ATCC13032 ( <i>lysC<sup>T3111</sup></i> )	Данная работа
<i>B. flavum</i> 90	Продуцент лизина ( <i>Leu<sup>-</sup></i> )	ВКПМ (ГосНИИгенетика)
<i>C. glutamicum</i> GEN1-6 Fus <sup>R</sup>	Производный ATCC13032 ( <i>lysC<sup>T3111</sup></i> ), устойчивый к фузидиевой кислоте	Данная работа
<i>B. flavum</i> 90 Fus <sup>R</sup>	Производный <i>B. flavum</i> 90, устойчивый к фузидиевой кислоте	То же
<i>C. glutamicum</i> GEN1-6- <i>fusA<sup>H461Q</sup></i>	Производный ATCC13032 ( <i>lysC<sup>T3111</sup></i> , <i>fusA<sup>H461Q</sup></i> )	« «
<i>B. flavum</i> 90- <i>fusA<sup>H461Q</sup></i>	( <i>Leu<sup>-</sup></i> , <i>fusA<sup>H461Q</sup></i> )	« «
<i>E. coli</i> XLI Blue	<i>supE44hsdR17recA1endA1 gyrA96 thi relA1 lac-F'</i> [ <i>proAB<sup>+</sup>lacI<sup>s</sup>lacZΔM15Tn10</i> ]	ВКПМ (ГосНИИгенетика)
<i>E. coli</i> ВКПМ В-558.	<i>Lys<sup>-</sup></i>	То же
pIKA-sac13	Производная pUC19, содержащая ген устойчивости к канамицину и ген <i>sacB</i> из <i>B. subtilis</i> 168	[7]
pIKA-Cor- <i>fusA</i> -C1383G	Производные pIKA-sac13, содержащие мутантный ген <i>fusA</i> из <i>C. glutamicum</i>	Данная работа
pIKA-Brev- <i>fusA</i> -C1383G	Производные pIKA-sac13, содержащие мутантный ген <i>fusA</i> из <i>B. flavum</i>	То же

вали на агаризованную среду LB, содержащую дополнительно следующие компоненты, г/л: биотин – 0,0001, глюкозу – 5 (DiaM, Германия) и фузидиевую кислоту – 0,005-0,01 (ОАО «Биосинтез»). Клоны, выросшие на 3–5-е сутки при 30°C, повторно рассеивали на той же среде с фузидиевой кислотой.

### Методы работы с ДНК

Выделение плазмидной ДНК и трансформацию *E. coli* проводили по стандартным методикам [8]. Рестриктию и лигирование ДНК осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя ферментов (ThermoFisherScientific, США). Амплификацию фрагментов ДНК проводили с использованием праймеров, представленных в табл. 2, с помощью прибора Mastercycler Gradient (Eppendorf) при следующих условиях: 94°C, 30 с; 56°C, 30 с; 72°C, 1–2 мин; число циклов 25. Использовали смесь полимераз *Pfu* (#EP0502) и *Taq* (#EP0404) (Fermentas, Литва) в соотношении 1:9. Хромосомную ДНК из штаммов *C. glutamicum* и *B. flavum* выделяли согласно методу [9].

Плазмидную ДНК вводили в штаммы *C. glutamicum* и *B. flavum* с помощью электропорации. Для этого культуры *C. glutamicum* и *B. flavum* растили в среде BHIS (brain heart infusion + sorbitol) (Difco), содержащей ВНИ в концентрации 37 г/л и сорбит в концентрации 30 г/л. Приготовление компетентной культуры *C. glutamicum* и *B. flavum* и электропорацию проводили в соответствии с методом [10]. Условия электропорации были следующие: 2500 В, 25 мкФ, 200 Ом. Длительность электроимпульса составляла 4,5–5,5 мс. Трансформанты отбирали на среде с канамицином (17 мкг/мл). Частота трансформации клеток *C. glutamicum* и *B. flavum* составляла  $1 \cdot 10^{-2}$  на 1 мкг ДНК плазмиды.

Таблица 2

### Праймеры, использованные в работе

#### Primers used

Название	Последовательность
fusA-F	gtggcacaagaagtgcctaaggatct
fusA-R	ttaggaagcgggtccggtgcgct
fusA-seqF	aacaagaaggaacgcattggtagct
fusA-seqR	ggtgtagctgagggactcaacagg

### Конструирование штаммов *C. glutamicum* и *B. flavum*, содержащих мутацию C1383G в гене *fusA*

Для внесения мутации C1383G в хромосомную копию гена *fusA* *C. glutamicum* или *B. flavum* были сконструированы плазмиды pKA-Cor-fusA-C1383G и pKA-Brev-fusA-C1383G, содержащие мутантные копии гена *fusA* из *C. glutamicum* и *B. flavum*, соответственно (см. табл. 1). Мутантные копии гена *fusA* были получены путем ПЦР-амплификации с использованием ДНК фузидиностойчивых штаммов *C. glutamicum* Gen1-6 Fus<sup>R</sup> и *B. flavum* 90 Fus<sup>R</sup> и праймеров fusA-F и fusA-R (см. табл. 2). Сконструированные плазмиды – производные pKAsac13 – не способны автономно реплицироваться в клетках *C. glutamicum* и *B. flavum*. В результате введения данных плазмид в клетки *C. glutamicum* и *B. flavum* с помощью электропорации происходила их интеграция в хромосому по гомологичному участку с последующим удалением плазмидной ДНК при переносе бактерий на среду с сахарозой, что приводило к замещению исходного аллеля гена *fusA* на мутантный.

### Предварительный анализ продукции лизина у полученных клонов

Для предварительного выявления клонов с повышенным синтезом лизина использовали модифицированный ауксанографический метод [11]. Для этого штамм *E. coli* ВКПМ В-558, ауксотрофный по лизину, выращивали в жидкой среде LB при 37°C и интенсивном перемешивании (240 об/мин) в течение 18 ч, отделяли биомассу центрифугированием, дважды промывали 0,9%-ным раствором NaCl, суспендировали в том же растворе и высевали 0,1 мл полученной клеточной суспензии на чашку с минимальной средой следующего состава, г/л: фосфат калия однозамещенный – 1, фосфат калия двузамещенный – 6, сульфат магния семиводный – 0,5, хлорид аммония – 5, глюкоза – 20, биотин – 0,0001, тиамин – 0,0002, L-лейцин – 0,25, агар – 15 (Sigma-Aldrich Co. (Merck)); pH 7,2–7,4. Затем на ту же чашку с помощью зубочисток переносили клетки мутантных клонов *C. glutamicum* или *B. flavum*, выросших на среде с фузидиевой кислотой. В качестве контроля использовали культуры исходных штаммов *C. glutamicum* или *B. flavum*. Чашки инкубировали 48 ч при 30°C, затем визуально определяли и отбирали клоны, которые обеспечивали большие зоны роста штамма *E. coli* ВКПМ В-558, чем родительские штаммы *C. glutamicum* и *B. flavum*.

### Определение концентрации лизина в культуральной жидкости

Штаммы бактерий культивировали в пробирках, содержащих 3 мл ферментационной среды в течение 36 ч или 48 ч. После удаления клеток концентрацию лизина определяли в супернатанте с помощью тонкослойной хроматографии.

Образцы и стандартные растворы наносили на пластинки «Сорбфил» (АО «Сорбполимер», Россия), используя автосамплер ATS4 (CAMAG, Швейцария). Разделение аминокислот проводили в системе растворителей изопропиловый спирт–аммиак. После хроматографии пластину высушивали и выявляли пятна путем обработки нингидриновым растворителем (Sigma-Aldrich Co. (Merck)).

Содержание лизина определяли с помощью сканирующего денситометра CAMAG TLC Scanner 3 при длине волны 500 нм и размере щели 3,00 × 0,2 мм. Количественную обработку полученных данных проводили на компьютере с использованием программы WinCATS.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Синтез лизина фузидиностойчивыми мутантами *C. glutamicum* и *B. flavum*

Мутанты *C. glutamicum* Gen1-6 и *B. flavum* 90, устойчивые к фузидиевой кислоте, были получены путем посева ночных культур на агаризованную среду LB с добавлением фузидиевой кислоты (от 5 до 10 мкг/мл). Через 3–5 сут инкубации при 30°C на поверхности агаризованной среды вырастали

разные по размеру колонии. Частота возникновения таких колоний составляла  $10^5$ – $10^7$ . Значительная часть таких колоний (около 90%) при последующих пересевах утрачивала способность расти на среде, содержащей фузидиевую кислоту. Всего было отобрано 25  $Fus^R$ -клонов *C. glutamicum* Gen1-6 и 48  $Fus^R$ -клонов *B. flavum* 90, которые характеризовались стабильным ростом на среде с фузидиевой кислотой (5 мкг/мл).

Предварительную оценку уровня продукции лизина  $Fus^R$ -клонами штаммов *C. glutamicum* Gen1-6 и *B. flavum* 90 проводили с помощью модифицированного ауксаногрического метода. Для этой цели использовали ауксотрофный штамм *E. coli* ВКПМВ-558, способный образовывать колонии на минимальной среде только в присутствии лизина. Бактерии *E. coli lys<sup>-</sup>* высевали сплошным газоном на чашки с минимальной средой и затем уколом наносили клетки из  $Fus^R$ -клонов. По величине зоны роста клеток вокруг укола судили об уровне продукции лизина тестируемыми клонами. Оказалось, что 10–20% тестируемых клонов формировали большие зоны роста, чем родительские штаммы.

Уровень продукции лизина  $Fus^R$ -клонами, отобранными в предварительном тесте, количественно определяли после 2-суточного культивирования в пробирках с ферментационной средой (см. «Условия эксперимента»). Всего было отобрано 4  $Fus^R$ -клона с повышенной продукцией лизина. Результаты тестирования для двух таких клонов представлены в табл. 3. Из этих результатов следует, что часть клонов, устойчивых к фузидиевой кислоте, продуцировали на 9–10% больше лизина, чем родительские штаммы.

Таблица 3

#### Продукция L-лизина фузидиностойчивыми мутантами *C. glutamicum* Gen1-6 и *B. flavum* 90

##### L-lysine production by fusidic acid-resistant *C. glutamicum* Gen1-6 and *B. flavum* 90 strains

Показатели	<i>C. glutamicum</i> Gen1-6		<i>B. flavum</i> 90	
	родительский штамм	$Fus^R$ №6 (мутант)	родительский штамм	$Fus^R$ №30 (мутант)
Концентрация лизина в КЖ, г/л	16,5	18,0	36,0	39,5
Повышение уровня синтеза L-лизина у мутанта по сравнению с родительским штаммом	9%		10%	

Примечание: представлены средние значения трех экспериментов.

Footnote: mean results of 3 measurements are represented

### Секвенирование гена *fusA* у Fus<sup>R</sup>-мутантов с повышенной продукцией лизина

Известно, что устойчивость к фузидиевой кислоте у *Staphylococcus aureus* обусловлена мутациями в гене *fusA* [5], кодирующем белок EF-G – фактор эмитации G, входящий в состав рибосомного комплекса.

С учетом этого нами было проведено секвенирование гена *fusA* из клонов, устойчивых к фузидиевой кислоте и демонстрирующих повышенный уровень продукции лизина. С помощью ПЦР-амплификации и с использованием праймеров *fusA-F* и *fusA-R*, комплементарных началу и концу гена *fusA*, были получены варианты гена *fusA* из мутантных клонов (№6, №16, №30) и исходных штаммов.

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *fusA* из родительских штаммов *C. glutamicum* Gen1-6 (GeneID:1021501) и *B. flavum* 90 показало, что эти гены обладают высоким уровнем гомологии (98%). При этом выявлено 35 различий между этими двумя штаммами в нуклеотидных последовательностях генов, которые привели к 9 аминокислотным заменам в белке EF-G. Оказалось также, что ген *fusA* из *B. flavum* 90 полностью идентичен гену, кодирующему фактор элонгации G из штамма *C. glutamicum* strain ATCC 13869 (GenBank ID: CP016335.1).

Исходными родительскими штаммами для фузидиностойчивых бактерий, изученных в данной работе, являлись два разных штамма, *C. glutamicum* Gen1-6 и *B. flavum* 90. Несмотря на это, как показал анализ нуклеотидных последовательностей вариантов гена *fusA*, оба мутантных штамма *C. glutamicum* Gen1-6 Fus<sup>R</sup> и *B. flavum* 90 Fus<sup>R</sup> с увеличенной продукцией лизина содержали мутации в гене *fusA* в положении 1383. В результате этих мутаций остаток цитозина был замещен остатком гуанина или аденина, что привело к аминокислотной замене гистидина на глутамин в положении 461 белка EF-G (H461Q).

Логично было предположить, что мутации C1383G и C1383A в гене *fusA* в клетках *C. glutamicum* Gen1-6 и *B. flavum* 90, соответственно, привели одновременно и к устойчивости клонов к фузидиевой кислоте, и к повышению продукции лизина.

### Мутация C1383G в гене *fusA* в коринеформных бактериях действительно приводит к повышению продукции лизина

Чтобы получить прямые доказательства того, что повышение продукции лизина связано с

мутацией C1383G в гене *fusA*, были сконструированы производные штаммов *C. glutamicum* Gen1-6 *fusA*<sup>H461Q</sup> и *B. flavum* 90 *fusA*<sup>H461Q</sup>, у которых с помощью гомологичной рекомбинации исходный аллель гена *fusA* был замещен на мутантный (*fusA*-C1383G). С этой целью были сконструированы плазмиды pIKA-Cor-*fusA*-C1383G и pIKA-Brev-*fusA*-C1383G, которые содержали ген *fusA* с мутацией C1383G из штаммов *C. glutamicum* Gen1-6 Fus<sup>R</sup> №6 и *B. flavum* 90 Fus<sup>R</sup> №30, соответственно. Эти плазмиды были использованы для трансформации исходного штамма *C. glutamicum* Gen1-6 или *B. flavum* 90.

Плазмиды pIKA-Cor-*fusA*-C1383G и pIKA-Brev-*fusA*-C1383G не способны автономно поддерживаться в клетках *Corynebacterium* и *Brevibacterium*. В связи с этим после введения плазмид в клетки с помощью электропорации были отобраны клоны, обозначенные как *C. glutamicum* Gen1-6 *fusA*<sup>H461Q</sup> и *B. flavum* 90 *fusA*<sup>H461Q</sup>, устойчивые к фузидиевой кислоте, в хромосоме которых в результате двух циклов гомологичной рекомбинации происходило замещение нативного гена *fusA* мутантной копией *fusA*-C1383G. Наличие такого замещения у всех отобранных фузидиностойчивых клонов подтверждали с помощью ПЦР-анализа с SNP-полимеразой и секвенирования.

Уровень продукции лизина у полученных клонов с мутантным геном *fusA* был изучен в тестах после их культивирования в ферментационной среде в течение 36 ч (табл. 4).

Оказалось, что мутантный штамм *C. glutamicum* Gen1-6 *fusA*<sup>H461Q</sup> продуцировал на 18% больше лизина, чем родительский штамм. В то же время, мутантный штамм *B. flavum* 90 *fusA*<sup>H461Q</sup> продуцировал лизина на 9% больше, чем исходный. Следует заметить, что и сами родительские штаммы отличались по уровню продукции лизина: штамм *C. glutamicum* Gen1-6 синтезировал 12,3 г/л, а штамм *B. flavum* 90 – в 2,4 раза больше (29,6 г/л). Следовательно, мутация C1383G в гене *fusA* приводит к увеличению уровня синтеза лизина у штаммов с разной продуктивностью, хотя влияние этой мутации с повышением продуктивности штаммов снижалось.

Таким образом, в данной работе впервые была изучена взаимосвязь между устойчивостью коринеформных бактерий к фузидиевой кислоте и уровнем продукции ими лизина. Оказалось, что устойчивость к фузидиевой кислоте бактерий *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* связана с мутациями в гене *fusA*, кодирующем фактор элонгации G, как это ранее было показано для *Staphylococcus aureus* [5]. Только небольшая

**Продукция L-лизина штаммами *C. glutamicum* Gen1-6 и *B. flavum* 90, содержащими мутацию C1383G в гене *fusA***

**L-lysine production by *C. glutamicum* Gen1-6 and *B. flavum* 90 strains that contain C1383G mutation in *fusA* gene**

Штамм	Содержание L-лизина в КЖ, г/л
<i>C. glutamicum</i> Gen1-6 fusA <sup>H461Q</sup> № 38 (мутантный штамм)	14,6 ± 0,4
<i>C. glutamicum</i> Gen1-6 (родительский штамм)	12,3 ± 0,3
<i>B. flavum</i> 90 fusA <sup>H461Q</sup> , № 24 (мутантный штамм)	32,3 ± 1,0
<i>B. flavum</i> 90 (родительский штамм)	29,6 ± 0,8

*Примечание:* представлены средние значения трех экспериментов.

*Footnote:* mean results of 3 measurements are represented.

часть Fus<sup>R</sup>-клонов (2–10%) обладала повышенной продуктивностью по лизину. Как показало секвенирование гена *fusA*, мутантные клоны с повышенной продукцией по лизину содержали мутации в гене *fusA* только в положении 1383 (C1383G и C1383A). Эти мутации приводят к аминокислотной замене в положении 461 белка EF-G, в результате которой гистидин замещается на глутамин (H461Q). Прямым доказательством влияния мутации C1383G в гене *fusA* на повышение продукции лизина явились результаты конструирования штаммов *C. glutamicum* Gen1-6 fusA<sup>H461Q</sup> и *B. flavum* 90 fusA<sup>H461Q</sup>, у которых с помощью гомологичной рекомбинации исходный аллель гена *fusA* был замещен на мутантный *fusA*-C1383G. Эти штаммы показали более высокий уровень продукции лизина по сравнению с родительскими. Примечательным является тот факт, что мутация C1383G в гене *fusA* приводила к повышению продукции лизина в штаммах как с относительно низким (*C. glutamicum* Gen1-6), так и с высоким (*B. flavum* 90) уровнем продуктивности. Следовательно, внесение мутации C1383G в ген *fusA* является универсальным подходом для повышения продукции лизина.

Причины повышения продукции лизина штаммами, у которых изменен фактор элонгации G, пока неизвестны. Недавно показано [12], что амплификация гена *fusA* на плазмиде в клетках штамма *C. glutamicum* приводит к увеличению продукции изолейцина. Исходя из этого, можно предположить, что ген *fusA* является перспективной мишенью для направленного конструирования штаммов с повышенной продукцией аминокислот.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62614X0003) с использованием ресурсов уникальной научной установки – «Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» и центра коллективного пользования ГосНИИгенетика.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Unique Project Identifier RFMEFI62614X0003), and was performed using the resources of the National Bioresource Center – All-Russian Collection of Industrial Microorganisms, and the Center for Collective Use of GosNIIGenetika.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ikeda M. Lysine Fermentation: History and Genome Breeding. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2016, 1–30. doi: 10.1007/10\_2016\_27
- Wendisch V., Bott M., and Eikmanns B. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006, 9(3), 268–274. doi: 10.1016/j.mib.2006.03.001
- Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, 71 (6), 1373–1386. doi: 10.1271/bbb.70007
- Park Young Hoon, Lim Sang Jo, Moon Jun Ok, and Sung Jin Suck. Microorganism of *Corynebacterium* genus having re-

- sistance to kanamycin and enhanced L-lysine productivity and method of producing L-lysine using the sam. US7736880, 2010.
5. Besier S., Ludwig A., Brade V. and Wichelhaus A. Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 2003, 47 (2), 463–469.
  6. Schrupf B., Eggeling L., Sahm H. Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, 37, 566–571. doi:10.1007/BF00240726.
  7. Tarutina M.G., Raevskaya N.M., Shustikova T.E., et al. Assessment of effectiveness of *Corynebacterium glutamicum* promoters and their application to enhancement of gene activity in lysine-producing bacteria. *Biotechnologiya* (Biotechnology), 2015, 6, 16–24. doi: 10.21519/0234-2758-2015-6-16-24
  8. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, 1982.
  9. Sidoruk K.V., Levitin E.I., and Piksasova O.V. Multipurpose method for isolation of high-molecular microbial DNA based on preliminary treatment of biomass by ammonium acetate solution. Actual items in genetics, radiobiology and radioecology. 2<sup>nd</sup> reading dedicated to the memory of V.I. Korogodin and V.A. Shevchenko. Mat. and Thes. Reports. Dubna: OIYaI, 2008, 100.
  10. Van der Rest M.E., Lange C., Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52(4), 541–545.
  11. Manual of methods for general bacteriology [Ed. Ph. Gerhardt]. Translated into Russian, Moscow: Mir. 1984, 264.
  12. Zhao J., Hu X., Li Ye, Wang X. Overexpression of ribosome elongation factor G and recycling factor increases L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99, 4795–4805. doi: 10.1007/s00253-015-6458-8

## Mutations in the *fusA* Gene that Encodes Elongation Factor G in Coryneform Bacterium Lead to Increased Lysine Production

I.P. TOKMAKOVA\*, L.E. RYABCHENKO, T.V. GERASIMOVA, S.V. KAMENEVA and A.S. YANENKO\*\*

*The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), 117545, Moscow Russia*

*e-mail: tokmakovai@yandex.ru\*, yanenko@genetika.ru\*\**

Received November 30, 2016

**Abstract** – Resistance to fusidic acid in *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum* is associated with mutations in the *fusA* gene that encodes the elongation factor G (EF-G). From 2% to 10% of fusidic acid-resistant clones were shown to produce more lysine than parent strains. Sequencing of the *fusA* gene in clones with high level of lysine production permitted to find out two mutations in the gene at position 1383 – C1383G and C1383A. These mutations cause the amino acid replacement at position 461 in the protein EF-G, namely, histidine is substituted by glutamine (H461Q). The mutation C1383G was introduced in the chromosomal copy of the *fusA* gene in *C. glutamicum* and *B. flavum* strains by homologous recombination. All clones containing the mutant variant of the *fusA* gene produced 10% more lysine than the parent strains.

**Key words:** *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum*, elongation factor G, *fusA* gene, L-lysine synthesis, mutations in *fusA* gene, resistance to fusidic acid.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2016-32-53-59