

УДК 577.112.382.3; 579.871.8

СЕЛЕКЦИЯ НОВЫХ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ L-АЛАНИНА У *BREVIBACTERIUM FLAVUM* И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ АЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

© 2013 г. Г.Е. Аветисова, Л.О. Мелконян, А.Х. Чахалян, С.К. Келешян, А.С. Сагиян

Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН РА,
Государственная некоммерческая организация, Ереван, Армения,
e-mail: gavetisova@yahoo.com

Поступила в редакцию 4 июля 2012 г. Принята к публикации 14 июля 2013 г.

У исходного штамма *Brevibacterium flavum* AA5 получены новые, не описанные ранее, устойчивые к L-цикloserину и β -хлор-L-аланину мутанты. Изучена их аланинпродуцирующая способность. Установлено, что устойчивость к L-цикloserину существенно не влияет на выход L-аланина, в то время как у устойчивых к β -хлор-L-аланину штаммов-продуцентов *B. flavum* GL1 и *B. flavum* GL18 уровень синтеза L-аланина превышает исходный на 23 и 38 % соответственно.

Ключевые слова: *Brevibacterium flavum*, мутагенез, штамм-продуцент, L-аланин.

L-аланин является одной из важных заменимых аминокислот и имеет широкое применение в медицине в качестве компонента смеси для парентерального питания, в пищевой промышленности в составе дезодорантов, антиоксидантов, красителей и для имитации вкуса и запаха природных продуктов. Аланин используется также в сельском хозяйстве как составная часть гербицидов и фунгицидов, в парфюмерии и в химической промышленности при синтезе органических соединений и полимеров.

В настоящее время мировое производство L-аланина составляет около 500 тонн в год и основано на способах энзиматического гидролиза из ацетил D,L-аланина с помощью аминоацилазы или микробиологической трансформации из L-аспарагиновой кислоты с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов, обладающих β -декарбоксилазной активностью (Hols *et al.*, 1999; Ikeda, 2003; Dworkin, 2006). В источниках патентной и научно-технической информации о микробиологических способах получения L-аминокислот нет сведений о промышленном производстве L-аланина прямой

ферментацией, что в первую очередь связано с отсутствием соответствующих штаммов-продуцентов, способных обеспечить рентабельное производство (Патент США, 1996; Dworkin, 2006; Wada *et al.*, 2007).

В то же время проблема разработки подобных производств продолжает оставаться актуальной, поскольку применяемые способы получения L-аланина многостадийны, трудоемки и требуют использования дорогостоящих ферментов, которые также необходимо получать микробиологическим путем. Эти способы целесообразно применять в основном при мелкосерийном производстве (Патент США, 2003; Dworkin, 2006).

Общеизвестно, что грамположительные и грамотрицательные бактерии синтезируют аланин в виде рацемической смеси, состоящей из равных количеств D и L-форм аланина. У коринеформных бактерий L-аланин может синтезироваться из пировиноградной кислоты с участием аланинтрансаминазы (КФ 2.6.1.2) и валинпируват-трансаминазы (КФ 2.6.1.66) (Гайбакян и др., 2003; Marienhagen, Eggeling, 2008; Melkonyan *et al.*, 2008; Патент США, 2010).

Ранее нами было проведено сравнительное изучение регуляции биосинтеза L-аланина у родительского штамма дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 и генетико-селекционным путем полученного продуцента *B. flavum* AA5, нуждающегося для роста в D-аланине и устойчивого к D,L- α -аминомасляной кислоте (D,L- α -АМК) (Патент США, 1992). Штамм депонирован во Всесоюзной (Всероссийской) коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ В-3991.

В частности, было изучено влияние D-аланина и L-валина, а также аналогов аминокислот D,L- α -АМК, L-цикloserина и β -Cl-L-аланина на активность основного фермента пути синтеза аланина – аланинтрансаминазу. Было показано, что у обоих штаммов исследуемые вещества в одинаковых концентрациях на 50 % ингибируют активность этого фермента. Однако ингибирование L-цикloserином и β -Cl-L-аланином наблюдалось при их значительно низких концентрациях (Melkonyan *et al.*, 2008). Полученные результаты позволили заключить, что резистентность к D,L- α -АМК не повлияла на активность аланинтрансаминазы штамма-продуцента *B. flavum* AA5 и L-цикloserин и β -Cl-L-аланин являются сравнительно сильными ингибиторами активности фермента, что коррелирует с данными других авторов (Beuster *et al.*, 2011).

В настоящей работе была поставлена цель усовершенствования продуцента *B. flavum* AA5 получением устойчивых к L-цикloserину и β -Cl-L-аланину мутантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным штаммом для получения нового более активного продуцента L-аланина служил продуцент *B. flavum* AA5 (D-ala⁺, D,L- α -АМК-^r), способный при ферментации в колбах на круговой качалке синтезировать 43,8 г/л L-аланина (Патент США, 1992).

Штамм *B. flavum* ATCC 14067 дикого типа был использован для сравнительной характеристики полученных нами мутантов.

Для выращивания исследуемых штаммов использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА) и минимальную среду Гловера, содержащую (%): NH_4Cl – 0,5, NH_4NO_3 – 0,1, Na_2SO_4 – 0,2, K_2HPO_4 – 0,3,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, KH_2PO_4 – 0,1, агар-агар – 1,5. Необходимые добавки вносили в следующих концентрациях: глюкоза – 1 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, дестибіотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин – 100 мкг/мл.

Для получения новых мутантов были выбраны аналоги аланина – L-цикloserин и β -Cl-L-аланин (Cornell *et al.*, 1984; Whalen *et al.*, 1985), использование которых в селекционных работах не описано в литературе.

Культуру обрабатывали мутагеном – раствором N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина в цитратном буфере (pH = 5,5) с концентрацией 300 мкг/мл в течение 30 мин при 30 °C по стандартной методике (Миллер, 1976) и высевали на минимальную среду, содержащую соответствующее количество исследуемого аналога. Выросшие колонии повторно пересеивали на среду с аналогом для получения чистых клонов.

Морфологические исследования клеток штаммов проводили с помощью микроскопа Leica DM500 trinocular ($\times 1000$) и программного обеспечения Digital Camera EC3 Leica Microsystem ($\times 10$).

Оценку аланинпродуцирующей способности отобранных аналогрезистентных мутантов осуществляли по результатам глубинной ферментации на круговой качалке Innova 43 Shaker «New Brunswick Scientific» (США) со скоростью вращения 220 об/мин при температуре 30 °C в течение 96 ч. В колбы Эрленмейера объемом 500 мл разливали по 15 мл инкубационной среды следующего состава: сахароза – 15 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,5 %, KH_2PO_4 – 0,1 %, MgSO_4 – 0,1 %, CaCO_3 – 5 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 %, тиамина хлорид – 70 мкг/л, биотин – 500 мкг/л, D-аланин – 100 мкг/мл. Посевной материал получали смывом суточной культуры с поверхности МПА физиологическим раствором и добавляли в ферментационные колбы в количестве 5 % от объема среды.

Содержание L-аланина в культуральной жидкости (КЖ) после ферментации определялось методом тонкослойной хроматографии (пластины «Silufol») в системе растворителей – аммиак : изопропиловый спирт : ацетон : вода (2 : 4 : 4 : 1) и бумажной хроматографии в системе Парtridge – бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5), с последующим окрашиванием

0,5 %-м раствором нингидрина в ацетоне. Количество аминокислоты определялось колориметрически при длине волны 490 нм после элюирования окрашенных пятен.

Количество остаточного сахара в культуральной жидкости определяли по методу Бертрана (Филлипович и др., 1982). Оптическую плотность (ОП) бактериальной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм после предварительного растворения мела в среде добавлением 2N HCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения устойчивых мутантов предварительно были определены минимальные концентрации аналогов, ингибирующие рост штамма *B. flavum* AA5. Испытуемые концентрации аналогов подбирались на основе полученных ранее данных об ингибировании активности аланинтрансминазы на 50 % L-цикloserином в концентрации 0,23 мг/мл и β -Cl-L-аланином в концентрации 0,024 мг/мл.

Обработанную мутагеном культуру *B. flavum* AA5 высевали на минимальную среду, содержащую 0,25 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл L-цикloserина. Было выделено всего 33 НГ-индуцированных мутанта, устойчивых к 0,25 мг/мл L-цикloserина.

Определение синтетической активности мутантов проводили в 2 этапа. Предварительно аланинсинтезирующую способность проверяли в кратковременной ферментации в течение 24 ч при 30 °С в пробирках, содержащих по 2 мл жидкой минимальной среды Гловера с 2 % глюкозы и 100 мкг/мл D-аланина. Содержание L-аланина в КЖ определяли методом тонкослойной хроматографии. На этом этапе из проверенных 33 мутантов были отобраны 3 мутанта, которые по активности синтеза L-аланина превосходили исходный штамм. Для более точной характеристики мутанты были проверены в ферментации в колбах на качалке.

Усредненные результаты количественного определения аланина в КЖ методом бумажной хроматографии приведены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, устойчивые к L-цикloserину мутанты в условиях глубинной ферментации в колбах существенно не отличаются от контрольного штамма по аланинпродуци-

рующей способности, несмотря на данные об ингибирующем действии использованного аналога на активность фермента.

Иная картина была получена при отборе устойчивых к β -Cl-L-аланину мутантов. Обработанную мутагеном культуру *B. flavum* AA5 высевали на минимальную среду, содержащую 0,025 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл β -Cl-L-аланина. Всего было выделено 13 мутантов: 9 мутантов со среды, содержащей 0,025 мг/мл β -Cl-L-аланина и 4 мутанта – со среды с 0,05 мг/мл аналога. Характеристика отобранных штаммов по устойчивости к разным дозам β -Cl-L-аланина приведена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, выделенные мутанты различались по степени устойчивости к аналогу, что свидетельствует об их независимом происхождении. Аланинсинтезирующая способность всех мутантов была определена в условиях глубинной ферментации в колбах.

В табл. 2 приведены характеристики двух мутантов, аланинсинтезирующая активность которых существенно отличалась от активности исходного штамма.

Из данных табл. 2 следует, что мутант GL1, выделенный на среде с 0,025 мг/мл β -Cl-L-аланина и одновременно устойчивый к 0,05 мг/мл β -Cl-L-аланина, превосходит исходный штамм по активности синтеза аланина в среднем на 23 %, а мутант GL18, выделенный со среды с 0,05 мг/мл β -Cl-L-аланина, на 38 %.

Отобранные штаммы-продуценты L-аланина *B. flavum* GL1 и *B. flavum* GL18 по своим культурально-морфологическим признакам не отличаются от родительского штамма *B. flavum* AA5. На

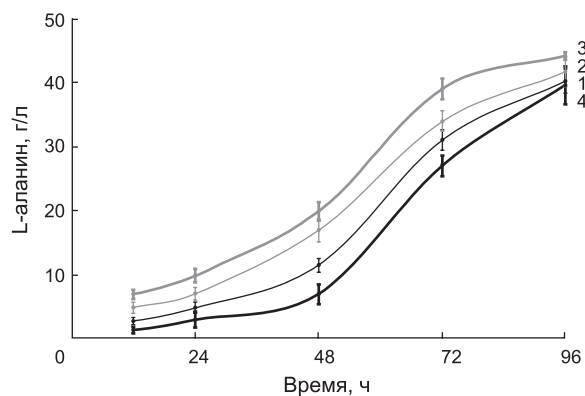


Рис. 1. Выход L-аланина у мутантов, устойчивых к L-цикloserину *B. flavum* AA5; 2) мутант 1; 3) мутант 2; 4) мутант 3.

Таблица 1

Характеристика устойчивых к β -Cl-L-аланину штаммов *B. flavum*

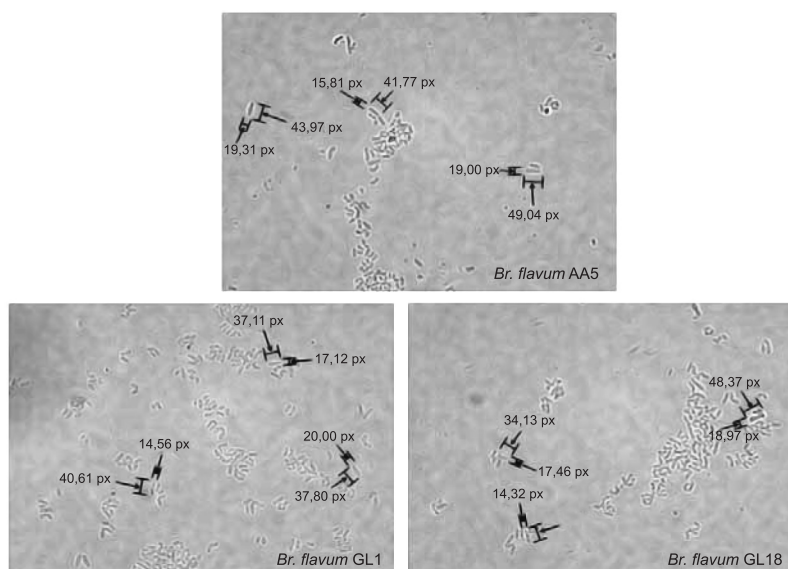
Штамм	Концентрация β -Cl-L-аланина при отборе резистентных мутантов, мг/мл	Минимальная среда			
		без D-аланина	с D-аланином	с D-аланином и β -Cl-L-аланином, мг/мл	
				0,025	0,05
AA5	0,0	—	+	—	—
GL1	0,025	—	+	+	+
GL6		—	+	+	+
GL9		—	+	+	—
GL11		—	+	+	+
GL14		—	+	+	—
GL15		—	+	+	±
GL24		—	+	+	±
GL25		—	+	+	—
GL52		—	+	+	±
GL11	0,05	—	+	+	±
GL16		—	+	+	+
GL18		—	+	+	+
GL19		—	+	+	—

Примечание. (+), (—) – наличие или отсутствие роста; (±) – следовой рост.

Таблица 2

Сравнительный выход L-аланина у новых штаммов-продуцентов *B. flavum*

Штамм	Оптическая плотность $\lambda = 540$	Титр (КОЕ/мл)	Остаточный сахар, %	Выход L-аланина, г/л
AA5	45	$4,2 \times 10^9$	0,08	43,2
GL1	56	$1,0 \times 10^{10}$	0,04	53,7
GL18	75	$2,1 \times 10^{10}$	0	60,5

Рис. 2. Микроскопический снимок клеток *B. flavum* штаммов-продуцентов L-аланина.

(1 пиксель (px) = 263,6 микрометра).

МПА на 2-е сутки роста при 30 °С они образуют круглые, гладкие, окрашенные в желтоватый цвет колонии диаметром 2 мм. Под микроскопом клетки штаммов неспороносные, овальные, со средним размером $1,1 \times 0,5$ мкм (рис. 2).

Таким образом, получены новые высокоактивные штаммы-продуценты L-аланина *B. flavum* GL1 и *B. flavum* GL18, которые в результате приобретения устойчивости к аналогу аланина, β -Cl-L-аланину, продуцируют до 60,5 г/л L-аланина и превосходят по активности исходный штамм в среднем на 23 и 38 % соответственно. Штаммы депонированы в Центре депонирования микробов НАН Армении под регистрационными номерами ИНМИА 11841 (*B. flavum* GL1) и ИНМИА 11842 (*B. flavum* GL18).

Существенное повышение выхода L-аланина у устойчивых к β -Cl-L-аланину мутантов в отличие от L-цикloserин устойчивых мутантов, по-видимому, связано с разной степенью ингибирования активности и разрегуляции синтеза основного фермента пути биосинтеза L-аланина – аланинтрансминазы.

ЛИТЕРАТУРА

- Гайбалян Л.Д., Аветисова Г.Е., Азизян А.Г. и др. Изучение ферментов биосинтеза аланина у *Brevibacterium flavum* // Биотехнология. 2003. № 1. С. 44–48.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 438 с.
- Патент США. 1992. № 5124257.
- Патент США. 1996. № 5559016.
- Патент США. 2003. № 6627420.
- Патент США. 2010. № 20100151449A1.
- Филипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М., 1982. 318 с.
- Beuster G., Zarse K., Kaleta C. *et al.* Inhibition of alanine aminotransferase *in silico* and *in vivo* promotes mitochondrial metabolism to impair malignant growth // J. Biol. Chem. 2011. V. 25. P. 22323–22330.
- Cornell N.W., Zuurendonk P.F., Kerich M.J. *et al.* Selective inhibition of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in rat hepatocytes // Biochem. J. 1984. V. 220. P. 707–716.
- Dworkin M. The Prokaryotes: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. 3rd / Ed. H. Kumagai. Springer, 2006. V. 1. Chapter 3.2. P. 756–765.
- Hols P., Kleerebezem M., Schanck A. *et al.* Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering // Nature Biotechnol. 1999. V. 17. P. 588–592.
- Ikeda M., Amino acid production processes // Adv. Biochem. Engineer./Biotechnol. 2003. V. 79. P. 1–35.
- Marienhagen J., Eggeling L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases AlaT and AvtA and impact on L-valine production // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. No. 24. P. 7457–7462.
- Melkonyan L.H., Avetisova G.E., Hambardzumyan A.A. *et al.* Study of L-glutamate-pyruvate aminotransferase inhibition in wild type strain of *Brevibacterium flavum* 14067 and L-alanine strain-producer *Br. flavum* AA5 // Intern. Conf. «State-of the-Art Biotechnology in Armenia and ISTC contribution». Armenia, 2008. P. 72.
- Wada M., Narita K., Yokota A. Alanine production in an H⁺-ATPase- and lactate dehydrogenase-defective mutant of *Escherichia coli* expressing alanine dehydrogenase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. No. 4. P. 819–825.
- Whalen W.A., Wang M.D., Berg C.M. beta-chloro-L-alanine inhibition of the *Escherichia coli* alanine-valine transaminase // J. Bacteriol. 1985. V. 164. No. 3. P. 1350–1352.

DEVELOPMENT OF NEW HIGHLY ACTIVE L-ALANINE PRODUCER STRAINS OF *BREVIBACTERIUM FLAVUM* AND COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF THEIR ALANINE-SYNTHESIZING ACTIVITY

G.Ye. Avetisova, L.H. Melkonyan, A.Kh. Chakhalyan, S.Gh. Keleshyan, A.S. Saghyan

Scientific and Production Center «Armbiotechnology», National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, Armenia, e-mail: gavetisova@yahoo.com

Summary

New mutants, not described previously, resistant to L-cycloserine and β -chloro-L-alanine were derived from the parental strain *Brevibacterium flavum* AA5. Their alanine-producing ability was studied. It was found that the resistance to L-cycloserine did not affect the yield of L-alanine significantly, whereas the resistance to β -chloro-L-alanine of *B. flavum* GL1 and *B. flavum* GL18 strain-producers exceeds the initial level of L-alanine synthesis by 23 and 38 %, respectively.

Key words: *Brevibacterium flavum*, mutagenesis, producer strain, L-alanine.