



УДК 575.24:576.851

Т. Н. Шевченко, В. В. Кметь, Н. В. Менделева

## АКТИВАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИЗИНА У *STREPTOCOCCUS BOVIS*

Полученные в работе мутантные штаммы *S. bovis*, устойчивые к аналогу лизина S-2-аминоэтил-L-цистеину, характеризуются повышенной ферментативной активностью аспараткиназы и диаминопимелатдекарбоксилазы, катализирующих первый и последний этапы биосинтеза лизина у микроорганизмов. Эти мутанты экскретируют лизин в культуральную среду. Показана трансформация протопластов *S. bovis* с помощью рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей гены биосинтеза лизина *Bacillus subtilis*. Генетический анализ плазмидной ДНК подтвердил стабильное сохранение *lys*-генов *B. subtilis* в клетках гетерологичного хозяина.

**Введение.** Микроорганизмы рода *Streptococcus* наряду со многими другими видами представлены в рубце крупного рогатого скота. Интерес к этим бактериям определяется возможностью их использования в животноводстве в качестве биопрепаратов, так как они синтезируют ферменты, в частности  $\alpha$ -амилазу, и способствуют лучшему усвоению кормов. За рубежом имеется опыт использования таких микроорганизмов в качестве биологической добавки в раннем возрасте животным с целью ускоренного перехода на твердые корма, поскольку тем самым ускоряется создание в рубце популяции полезной микрофлоры [1]. В связи с этим перспективной является задача генетической модификации этих микроорганизмов с целью интенсификации синтеза полезных веществ — витаминов, аминокислот. Исходя из вышеизложенного, мы поставили цель получить штаммы *S. bovis*, продуцирующие лизин — незаменимую аминокислоту, недостаток которой наблюдается в растительных кормах. Используя разработанные ранее подходы для получения подобных мутантов *B. subtilis* [2], мы модифицировали штамм *S. bovis* и получили штаммы, экскретирующие лизин, обладающие повышенной активностью диаминопимелатдекарбоксилазы, последнего фермента пути биосинтеза лизина у микроорганизмов, а также аспараткиназы — фермента, катализирующего первый этап биосинтеза лизина.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *S. bovis* A024/85, описанный в [1], а также штаммы *B. subtilis*, ауксотрофные по лизину, Tch42 (*lys*42), Tch13 (*lys*13), полученные из коллекции Ленинградского института ядерной физики АН СССР (Гатчина).

Штамм Tch14 (*lys*13 *recE*) (*pMC3*), использованный для выделения препарата ДНК плазмиды *pMC3*, получен нами при трансформации плазмидной ДНК, описанной в работе [9].

Лизин-продуцирующие мутанты *S. bovis* отбирали на чашках с LB-агаризованной средой, содержащей 1—10 мг/мл S-2-аминоэтил-L-цистеина (АЭЦ). После высева на чашку  $\sim 10^8$  клеток в центр ее помещали кружок фильтровальной бумаги, пропитанный раствором мутагена *NNG* (500 мкг/мл). Далее клетки инкубировали 3—4 дня при

© Т. Н. ШЕВЧЕНКО, В. В. КМЕТЬ, Н. В. МЕНДЕЛЕВА, 1991

37 °С, после чего вокруг кружка появлялись колонии микроорганизмов, устойчивые к аналогу лизина АЭЦ. Затем клетки повторно пересеивали на среду, содержащую АЭЦ, и анализировали.

Концентрацию лизина в культуральной среде определяли по [3]. Активность диаминопимелатдекарбоксилазы — согласно [4].

Плазмидную ДНК из *B. subtilis* и *S. bovis* выделяли по методу [5]. Протопласты, полученные согласно [6], трансформировали препаратами ДНК в концентрации 2 мкг/мл. Для отбора трансформантов

*Активность аспартокиназ, ДАП-декарбоксилазы и накопление лизина в штаммах S. bovis*

*Aspartokinase, DAP-decarboxylase activity and lysine storage in S. bovis strains*

Штамм	Суммарная активность аспартокиназ, $\mu\text{M}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка	Активность ДАП-декарбоксилазы, $\mu\text{M}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ белка	Лизин, мкг/мл
24/85	0,5	8	—
acc16	5	30	100
acc64	50	100	250
acc106	44	180	500

после введения ДНК клетки инкубировали предварительно с 0,05 мкг/мл эритромицина, а затем высевали на регенерирующую среду, содержащую эритромицин в концентрации 10 мкг/мл.

Трансформацию *B. subtilis* осуществляли по методу [7]. Аспартокиназную активность определяли по [8].

**Результаты и обсуждение.** В результате мутагенеза и селекции нами было получено несколько десятков мутантных штаммов *S. bovis*, способных расти в присутствии 1—10 мг/мл АЭЦ. Как правило, такие мутанты могут нести нарушения либо в генах, кодирующих биосинтез лизина, либо детерминирующих структуру клеточной стенки, что препятствует проникновению АЭЦ в клетки. Для наших целей представляют интерес мутанты первой группы, а именно: те, которые синтезируют повышенные количества лизина и способны экскретировать эту аминокислоту. Для того чтобы отобрать такого рода колонии, мы использовали в качестве тест-системы штамм *B. subtilis* AT42, ауксотрофный по лизину. После посева на чашки с LB-средой и АЭЦ (1 мг/л) этот индикаторный штамм не проявляет признаков роста до тех пор, пока в среде не накапливается определенная концентрация лизина. Перекальвая колонии *S. bovis* АЭЦ<sup>R</sup> на такие чашки, мы отбирали те, вокруг которых наблюдается наибольший ореол подрастающих клеток *B. subtilis* через 24 ч. Таким образом, нами выделено несколько штаммов *S. bovis*, продуцирующих лизин. Анализ этих мутантов проводили по следующим параметрам: определяли активность ключевых ферментов пути биосинтеза лизина — аспартокиназы и диаминопимелатдекарбоксилазы — первого и последнего этапов биосинтеза лизина. В таблице приведены результаты такого анализа, свидетельствующие о том, что АЭЦ<sup>R</sup>-фенотип у *S. bovis*, так же как и *B. subtilis* [2], обусловлен изменениями в регуляции синтеза лизина. Значительное возрастание ферментативной активности ключевых ферментов пути синтеза лизина связано, вероятно, с депрессией синтеза этих ферментов.

Одним из эффективных модифицирующих приемов для повышения синтеза метаболитов является введение плазмидных ДНК, содержащих соответствующие генетические детерминанты. Поэтому интерес представляло изучение влияния введения плазмиды *pMC3*, содержащей репликативный сигнал *S. piogenes* и клонированные гены биосинтеза лизина *B. subtilis* [9].

В результате трансформационных экспериментов получены штаммы *S. bovis*, устойчивые к эритромицину и АЭЦ, в которых определяли активность ДАП-декарбоксилазы и синтеза лизина. Оказалось, что при трансформации *S. bovis* аес16 наблюдается увеличение активности ДАП-декарбоксилазы до 75 ед., а концентрация лизина в культуральной среде повышается до 200 мкг/мл. Такое небольшое изменение в биосинтезе лизина может быть связано с низкой копийностью плазмидной ДНК в клетках *S. bovis* или же с низкой эффективностью экспрессии гетерологичных генов в *S. bovis*. Более глубокое исследование трансформации *lys*-генов *B. subtilis* в клетках *S. bovis*, начатое нами, может способствовать решению этого вопроса.

Для того чтобы выяснить, сохраняется ли ДНК плазмиды *pMC3* в клетках *S. bovis* без изменений, мы реэкстрагировали плазмидную ДНК из трансформированных клеток и анализировали генетическими методами. Для этого трансформировали штаммы *B. subtilis*, ауксотрофные по лизину, и изучали появление *lys*-независимых трансформантов.

После трансформации штаммов, содержащих мутации в локусах *lys21*, *lys42*, *lys9*, *lys3*, мы выяснили, что плазмидная ДНК не утратила *lys*-детерминанты, так как все эти штаммы достаточно эффективно ( $1 \cdot 10^2$  клеток на 1 мкг ДНК) трансформировались к лизин-независимости.

В заключение следует отметить, что, несмотря на не столь существенное увеличение синтеза лизина в клетках *S. bovis* после введения плазмидной ДНК, содержащей гены биосинтеза лизина *B. subtilis*, все же нельзя исключить возможности такого рода модификации *S. bovis* для биотехнологических целей.

Показано, что в мутантах *S. bovis*, устойчивых к АЭЦ, наблюдается активизация синтеза ферментов биосинтеза лизина — аспартокиназы и ДАП-декарбоксилазы, а также повышение синтеза лизина, сопровождающееся экскрецией его в культуральную среду. Введение плазмидной ДНК, содержащей гены биосинтеза лизина *B. subtilis*, приводит к некоторому увеличению синтеза лизина в трансформированных клетках.

#### Резюме

Одержані в роботі стійкі до аналогу лізину — S-2-аміноетил-L-цистеїну — мутантні штами *S. bovis* характеризуються більш високою ферментативною активністю аспартаткінази і діамінопімелатдекарбоксилази, що каталізують перший та останній етапи біосинтезу лізину у мікроорганізмів. Ці мутанти екскретують лізин в культуральну рідину. Показана трансформація протопластів *S. bovis* за допомогою рекомбінантної плазмидної ДНК, яка містить гени біосинтезу лізину *Bacillus subtilis*. Генетичний аналіз плазмидної ДНК підтвердив стабільне збереження *lys*-генів *B. subtilis* у клітинах гетерологічного хазяїна.

#### Summary

S-2-aminoethyl-L-cysteine resistant *S. bovis* strains have been obtained. The high level of aspartokinase and diaminopimlate decarboxylase activity as well as lysine biosynthesis activation have been shown in crude extracts of AEC mutants. *B. subtilis* lysine gene containing plasmid has been introduced into *S. bovis* protoplasts. The stability of recombinant plasmids in the cells has been confirmed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pat. A0 260766 Czechoslovak. The strain of microorganism *Streptococcus bovis* A0 24/85 / V. Kmet. — Publ. 1985.
2. Шевченко Т. Н., Тимашова Е. О., Алексеева З. М. Мутанти *Bacillus subtilis*, устойчивые к аналогу лизина S-2-аминоэтил-L-цистеину // Генетика. — 1989. — 25, № 11. — С. 1937—1945.

3. Боздырева Н. М., Куцева Л. С. Спектрофотометрический метод определения лизина в культуральной жидкости *Brevibacterium* // Прикл. биохимия и микробиология.— 1974.— 10, № 5.— С. 756.
4. White P. I. Diaminopimelate decarboxylase (*E. coli*) // Meth. Enzymol.— 1971.— 17.— Р. 140.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М. : Мир, 1984.— 477 с.
6. Kmet V., Kuncova P., Yovorsky. Production and regeneration of Rumex *Streptococcus bovis* protoplasts // Biologia.— 1988.— 43.— Р. 977—982.
7. Spizizen J., Reilly B. E., Evans A. H. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // Annu. Rev. Microbiol.— 1966.— 20, N 1.— Р. 341.
8. Кара-Мурза С. И., Ивановская Л. В., Жданова И. И. Влияние аминокислот на активность аспартокиназы *Corynebacterium glutamicum* штамма дикого типа и его мутантов // Прикл. биохимия и микробиология.— 1974.— 10, № 5.— С. 756.
9. Изучение области 210° хромосомы *Bacillus subtilis* с помощью рекомбинантных плазмид / М. Л. Чикиндас, Е. В. Лукьянов, П. М. Рабинович, А. И. Степанов // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1987.— № 3.— С. 20—24.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 20.11.90