

**УВЕЛИЧЕНИЕ ВЫХОДА L-ТРЕОНИНА В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ШТАММАМИ
ESCHERICHIA COLI ПУТЁМ РЕГУЛИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ 4-ГИДРОКСИ-
ТЕТРАГИДРОДИПИКОЛИНАТСИНТАЗЫ**

С.С. Филиппова, Д.М. Бубнов, Т.В. Выборная, С.П. Синеокий

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Москва, Россия

L-треонин является ценной пищевой добавкой в животноводстве и птицеводстве. Мировое производство L-треонина основано на микробиологическом методе синтеза. Главным компонентом, от которого зависит эффективность производства L-треонина, является штамм-продуцент, на основе него разрабатывается технология микробной ферментации. Безусловными лидерами по продуктивности оказались штаммы *Escherichia coli* благодаря своей всесторонней изученности и широкому спектру молекулярных инструментов, доступных для введения направленных модификаций.

Для создания промышленного штамма-продуцента L-треонина требуется методами генной инженерии осуществить глубокую реконструкцию метаболических путей. Помимо модификации метаболических путей актуальной проблемой является накопление биомассы культуры продуцента. Очевидно, что синтез биомассы и целевого продукта являются конкурирующими процессами, которые потребляют поступающие питательные соединения. С другой стороны, от массы клеток зависит скорость синтеза, то есть продуктивность штамма. Поэтому, в промышленной ферментации уровень биомассы должен быть ограничен на минимальном уровне, достаточном для обеспечения необходимой скорости синтеза. Таким образом достигается наивысшая конверсия используемого источника углерода и энергии в конечный продукт.

Среди методов снижения накопления биомассы можно выделить создание лимитирующих условий по соединениям необходимым для роста культуры штамма, например по аминокислотам. Однако этот подход обладает существенным недостатком – продуктивность культуры зависит от состава питательной среды, в которую часто вносят компоненты, полученные из растительного, животного сырья или дрожжевой биомассы. Поэтому целесообразно использовать мутации, снижающие активность ферментов, участвующих в синтезе таких соединений которые необходимы для роста бактериальных клеток, но не встречаются в животных и растительных тканях.

Основываясь на этих рассуждениях, мы выбрали в качестве мишени ген *dapA*, который кодирует фермент 4-гидрокси-тетрагидродипиколонатсинтазу, осуществляющий первую стадию синтеза диаминопимелиновой кислоты. Диаминопимелат является непротеиногенной аминокислотой, входящей в состав пептидного мостика между слоями пептидогликана, компонента клеточной стенки бактерий, а также прекурсором лизина. Таким образом, лимитирование роста культуры по диаминопимелату приводит не только к дефекту синтеза клеточной стенки, но и к недостатку лизина. Поэтому дополнительным эффектом мутаций в гене *dapA* является активация «строгого ответа», который, как известно, приводит к усилению синтеза всех аминокислот.

Путем направленного мутагенеза гена *dapA* нам удалось отобрать клоны, способные расти без диаминопимелата, но нуждающиеся в нем для роста с максимальной скоростью. Такие клетки несут мутантные аллели гена *dapA*, кодирующего фермент со сниженной активностью. Проведя скрининг двухсот клонов, нам удалось отобрать шесть, которые обладали повышенным синтезом L-треонина при сохранении исходной скорости и пониженным уровнем накопления биомассы. Наиболее продуктивные клоны накапливали на 7–29,5 % больше L-треонина по сравнению с родительским штаммом. Таким образом, нам удалось найти новую мишень, введение мутаций в которую позволяет увеличить продукцию L-треонина и, возможно, других аминокислот.

*Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61017x0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов»
НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика.*