

Усиление экспрессии генов биосинтеза L-валина в штамме *Corynebacterium glutamicum* для повышения продукции данной аминокислоты**Научный руководитель – Шереметьева Марина Евгеньевна*****Розанцева Вероника Викторовна****Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра микробиологии, Москва, Россия

E-mail: v.rozantseva@bk.ru

L-валин (далее - валин) - одна из незаменимых аминокислот, широко применяемых в животноводстве: её добавление в корма приводит к повышению качества и количества мяса. Основным способом производства валина, как и других аминокислот - биотехнологический. Продуцентами часто служат штаммы, полученные на базе *Corynebacterium glutamicum* [3]. Сегодня весь валин, потребляемый в РФ, импортируется из Китая; собственное производство отсутствует. При этом спрос на валин постоянно растёт, поэтому актуальной задачей является создание такого производства, а значит, штаммов-продуцентов.

При разработке штаммов-продуцентов необходимо усиливать путь биосинтеза целевого продукта и модифицировать пути, ответственные за доступность предшественников и кофакторов. Биосинтез валина у коринебактерий состоит из 4 последовательных реакций, катализируемых 4 ферментами: ацетолактатсинтазой АНАS, ацетолактатредуктазоизомеразой АНАIR, дегидратазой дигидроксикислот ДНАD и трансаминазой ВСАТ (продукты генов *ilvBN*, *ilvC*, *ilvD* и *ilvE*, соответственно). На синтез 1 молекулы валина идут 2 молекулы пирувата (источник - гликолиз), и 2 восстановительных эквивалента в форме НАДФН (источник - пентозофосфатный путь) [3]. Создание штамма - продуцента валина требует повышения активности перечисленных ферментов, усиления биосинтеза пирувата и НАДФН и уменьшения их оттока в другие метаболические пути.

Объект нашего исследования - валин-продуцирующий штамм *C. glutamicum* (рабочее название VE) из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Данный штамм, продуцирующий до 20 г/л валина в 72-часовых пробирочных ферментациях, был получен с помощью ненаправленного мутагенеза. Ранее в Курчатовском институте провели полногеномное секвенирование штамма VE, выявившее наличие более 400 мутаций, среди которых есть мутации, затрагивающие образование пирувата и НАДФН, а также превращение пирувата в ацетил-КоА, лактат и изолейцин, но нет мутаций в генах биосинтеза валина. Нашей целью было проверить, приведёт ли усиление экспрессии последних к повышению продуктивности штамма по валину.

Усиление экспрессии генов осуществляли путём замены промотора. Модификацию генома проводили методом гомологичной рекомбинации с использованием интегративной суицидной плазмиды [2]. Наличие изменений подтверждали с помощью ПЦР и секвенирования, продукцию валина оценивали в пробирочных ферментациях, уровень экспрессии модифицированных генов определяли с помощью ОТ-ПЦР.

Гены *ilvBN* и *ilvC* находятся в одном опероне, поэтому замена промотора перед ним приведёт к изменению экспрессии и АНАS, и АНАIR. Мы получили 3 штамма (VE7, VE8, VE9) с различными модификациями в регуляторной области - в штаммах VE7 и VE8 wt-промотор заменили сильными конститутивными промоторами генов *sod* и *eftu*, соответственно, в штамм VE9 перенесли точечную мутацию, открытую ранее в рамках данного проекта [1]. Все эти модификации привели к многократному увеличению экспрессии генов

ilvBNC, но на продукции валина они практически не сказались. Затем в штаммах VE8 и VE9, а также в штамме VE модифицировали ген *ilvE* (штаммы VE10, VE11, VE12, соответственно). Постановка данного гена под *sod*-промотор привела к повышению продукции у штаммов VE10 и VE11 (до 25 г/л), но не у штамма VE12. По-видимому, повышение продукции валина у VE-штаммов происходит лишь в том случае, когда усилена экспрессия и оперона *ilvBNC*, и гена *ilvE* одновременно.

Источники и литература

- 1) Рябченко Л.Е., с соавт. Бактерия *Corynebacterium glutamicum* с повышенной способностью продуцировать L-валин и способ получения L-валина с использованием этой бактерии. Патент РФ № 2753996, 2021, Бюл. № 24.
- 2) Jäger W., et al. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*// *J. Bacteriol.*, 1992, 174(16), 5462-5465.
- 3) Liu J., et al. L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* based on systematic metabolic engineering: progress and prospects// *Amino Acids*, 2021, 53(9), 1301-1312.