

Преимущества использования микроорганизмов для создания продуцентов ферментов.

В настоящее время человечеству известно около 2000 ферментов, из них только две сотни получены или синтезированы как индивидуальные соединения. Вместе с тем микроорганизмы представляют большой интерес как продуценты этих соединений. Этот интерес обусловлен рядом факторов:

- метаболизм микроорганизмов (следовательно, и работа ферментных систем) отличаются высокой интенсивностью. КПД работы клеток *Azotobacter* в 200-400 раз превышает таковой у клеток печени человека;
- микроорганизмы отличаются высокой степенью прироста биомассы;
- многие микроорганизмы растут на дешевых средах (целлюлоза, углеводороды нефти, метан, метанол и т. д.);
- микроорганизмы могут продуцировать ферменты во внешнюю среду (экзоферменты) и это не требует разработок специальных технологий по их выделению;
- микроорганизмы являются источником некоторых уникальных ферментов: танназы (расщепляет дигаллат до галловой кислоты), рацемазы (превращение аминокислот), кератиназы (гидролизующей серосодержащие белки – кератины), пенициллиназы (расщепление пенициллина до пеницилловой кислоты), нитрогеназы (образование аммиака из молекулярного азота и воды);
- некоторые бактерии (термофильные) имеют оптимум роста 60-80 °С и выше, что позволяет получать на их основе термостабильные ферменты и белки. Так, экстремальный термофил *Thermus aquaticus* обладает энолазой с оптимумом действия при 90 °С. А гриб *Malbranchea pulchella* выделяет термостабильную протеиназу, сохраняющую активность при 73 °С; 2
- большой интерес как продуценты ферментов представляют анаэробные микроорганизмы. Использование этих организмов позволит проводить процесс в больших емкостях с высоким слоем сред;
- ферменты, продуцируемые многими микроорганизмами, являются индуцибельными. Так, синтез в-галактозидазы *E. coli* индуцируется лактозой и происходит через 3 мин после ее внесения.

В настоящее время микробиологическим способом получают разнообразные ферменты (как правило, это внеклеточные ферменты – их производство относительно дешево). Всего же 90 % от объема производства ферментных препаратов составляют следующие: гидролазы, протеазы, гликозидазы, липазы и другие.

ФЕРМЕНТЫ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ КРАХМАЛ

Наиболее важными промышленными гидролазами являются ферменты, гидролизующие крахмал (α-амилаза; β-амилаза; глюкоамилаза; глюкоизомераза). Их традиционными продуцентами являются бациллы. Так, наибольшее промышленное значение для получения бактериальной α-амилазы (фермента, «осахаривающего» крахмал) имеют *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*. Имеются генно-инженерные разработки продуцентов этого фермента на основе бактерий *B. subtilis*. Японскими учеными сконструирована гибридная плазида pTV B257, в которой структурный ген *bla* β-лактамазы *E. Coli* соединен с α-амилазным геном *amyE*. Такой плазмидой трансформировали клетки штамма *B. subtilis*, дефектные по α-амилазе. Трансформанты отличались уровнем продукции фермента на порядок превышающем синтез его у исходного штамма. α-Амилаза получена также в виде промышленного препарата из *Aspergillus oryzae*, но в отличие от бациллярных амилаз, этот фермент является гликопротеином и обнаруживает более низкую термостабильность. Широко используемая в пивоваренной и спиртовой промышленности β-амилаза, также получается на основе бацилл: *B. cereus*, *B. polymyxa*, *megaterium*, а также на основе некоторых штаммов *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Глюкоамилаза (также гидролизующая крахмал) производится преимущественно на основе грибов, так как у бактерий практически не встречается. Ферменты из *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Endomyces* преобладают на рынке, однако предпочтение отдается первому, так как ферменты на его основе более термостабильны.

Глюкоизомеразу (фермент, осуществляющий превращение глюкозы во фруктозу, что обеспечивает сладость продукта и используется в пищевой промышленности) получают на основе *Lactobacillus brevis*, *Streptomyces albus*, *B. coagulans*. Появились сообщения о конструировании штамма *Saccharomyces diastolicus*, являющегося продуцентом глюкозоамилазы. Штамм получен путем слияния протопластов гаплоидных штаммов, что увеличило копийность гена *STA*, отвечающего за синтез глюкозоамилазы. К классу гидролаз относятся также липазы. Из имеющих промышленное значение выделяются триацилглицеролгидролазы и ацилгидролазы, которые осуществляют гидролиз триглицеридов с образованием глицерина и жирных кислот. Продуцентами внеклеточных липаз являются грибы из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, дрожжи *Candida* и бактерии *Pseudomonas*. Большое практическое значение имеет микробиологический синтез пенициллинамидаз, которые гидролизуют пенициллин. Фермент используется для химического синтеза замещенных пенициллинов, а также инактивации антибиотика. Наиболее эффективными продуцентами этого фермента являются штаммы *E. Coli*, *Neurospora crassa*. Широкое применение в пищевой, деревообрабатывающей и легкой промышленности находит целлюлаза. Этот

фермент, участвующий в деградации целлюлозы, получают на основе плесневых грибов *Trichoderma reesei*. Еще один фермент, участвующий в разложении целлюлозы до глюкозы – α -глюкозидаза. Активными продуцентами этого фермента являются *Aspergillus* spp, а также дрожжи *Cladosporium resinae*. Специфический фермент, обладающий целлюлолитической активностью – эконаза – находит широкое применение в легкой и пищевой промышленности для редукации солода и утилизации целлюлозы. Продуценты – *Trichoderma reesei* (продуктивность – 50 000 – 80 000 ед/мл). Промышленными продуцентами изомераз – ферментов, гидролизующих сахарозу до глюкозы и фруктозы и используемых в кондитерской и пищевой промышленности, являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Продуцентами лактазы – фермента, гидролизующего лактозу до глюкозы и галактозы, являются грибы рода *Aspergillus*.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Являются самыми распространенными из всех секретируемых микробных ферментов. Микробные протеазы группируются в три класса: сериновые, металлои кислые протеазы, которые обладают различным оптимумом активности при щелочной, нейтральной и кислой реакциях среды, соответственно. 4 Сериновые и металлопротеазы производятся в промышленном масштабе на основе штаммов бацилл, а кислые - из грибов (главным образом, *Mucor* и *Endothia*). Сериновые протеазы используются в производстве моющих средств для очистки одежды и по своим свойствам напоминают животный фермент трипсин. Металлопротеазы применяются в пищевой, кожевенной и пивоваренной промышленности. Кислые протеазы используются для производства сыров и имеют свойства, сходные с животным пепсином. Следует отметить, что протеазы, ферменты гидролиза крахмала и глюкозоизомеразы в целом заполняют рынок производства ферментов на 90 %. Все остальные из перечисленных ферментов составляют лишь незначительный процент. Большое значение имеет производство очищенных ферментов для исследовательских целей, в частности, эндонуклеаз рестрикции. Ассортимент рестриктаз в мировом производстве очень широк. Большинство рестриктаз получают из штаммов *E. coli*, *B. subtilis*, *Haemophilis influenzae*, *Micrococcus* spp. и др.

СЕЛЕКЦИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ВАЖНЕЙШИХ ФЕРМЕНТОВ

В селекции продуцентов ферментов используются как традиционные в селекции микроорганизмов подходы (мутагенез и ступенчатый отбор на сверхсинтез), так и методы генной инженерии (получение генетических рекомбинантов и клонирование генов). Все эти методы традиционно направлены на изменение или полное снятие регуляции синтеза ферментов. Известно, что эта регуляция осуществляется на пяти основных стадиях:

- 1) связывание РНК-полимеразы и инициация транскрипции;
- 2) индукция или дерепрессия транскрипции;
- 3) катаболитная репрессия транскрипции;
- 4) связывание рибосом и стабильность мРНК;
- 5) проникновение фермента через мембрану и стенку клетки с последующим процессингом (если это внеклеточный фермент).

Мутанты по РНК-полимеразе легко выделяют с помощью селекции на антибиотикоустойчивость (например, к рифампицину или стрептолидигину). Такой подход использовался в получении продуцентов α -амилазы у *B. subtilis*. Нарушение синтеза данного фермента происходило, очевидно, вследствие изменения узнавания мутировавшей РНК-полимеразой промоторов для генов α -амилазы.

Индукция или репрессия ограничивают экспрессию многих оперонов внеклеточных ферментов. Соответственно мутации, приводящие к устранению потребности в индукторе либо снимающие репрессию, обеспечивают конститутивный синтез данного продукта. Так, фенил-в-О-галактозид можно использовать для отбора на конститутивный синтез в-галактозидазы у *E. coli*. Примером получения продуцента промышленного масштаба может служить синтез глюкоизомеразы у *Streptomyces phaeochromogenes*. Этот фермент используется для метаболизма ксилозы и ликсозы, однако ликсоз не индуцирует его синтез. Поэтому проводят отбор мутантов, выросших на среде с ликсозой, поскольку они будут иметь конститутивный синтез этого фермента. Мутанты, нечувствительные к катаболитной репрессии, представляют ценность в нескольких отношениях. Во-первых, они синтезируют ферменты на ранних стадиях ростового цикла культуры. Во-вторых, они всегда секретируют ферменты на более высоком уровне и допускают использование дешевых субстратов. Такие мутанты получают несколькими путями:

- простой отбор мутантов на агаризованных средах, содержащих высокие концентрации глюкозы или глицерола;
- путем селекции на рост в присутствии антиметаболитов, например целлобиозы. Таким путем были получены, например, продуценты глюкозидазы из *Trichoderma*;
- отбор на способность к спорообразованию в присутствии глюкозы путем пасеризации культур. Так, мутанты *Actinomyces fradiae* дерепрессированы в отношении спорообразования в присутствии глюкозы и образуют повышенное количество сериновой протеазы благодаря мутации в области *catA*.

Что касается контроля трансляции, то существует три способа ее модифицировать:

- а) увеличить стабильность мРНК;
- б) повысить эффективность сайтов инициации трансляции;
- в) повысить элонгацию цепи.

Мутации, изменяющие секрецию ферментов, особенно полезны для повышения выхода ферментов, хотя молекулярные механизмы этих процессов редко расшифрованы. Такие мутации получают селекцией на устойчивость к различным антибиотикам, изменяющим структуру клеточной стенки. Например, по устойчивости к циклосерину, ампициллину, новобиоцину были получены продуценты у *B. subtilis*, секретирующие в 5 раз больше фермента, чем исходный штамм. Сходным образом были получены продуценты у *Fusarium* и *Trichoderma*.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Для получения рекомбинантов при селекции продуцентов ферментов обычно используется техника переноса генов. У грамотрицательных бактерий (в основном *E. coli*) применяют конъюгацию, основанную на мобилизации хромосомы с помощью конъюгативных плазмид. У других бактерий применяют трансдукцию либо транспозоновый мутагенез. У грамположительных бактерий (*B. subtilis*) успешно применяют трансформацию. Например, в селекции промышленного штамма *B. subtilis* Marburg был использован комплексный подход. Дикий тип образовывал около 10 ед. мл⁻¹ амилазы. Его регуляторный мутант по гену *amyR3* давал амилазы в 5 раз больше. А мутант по гену *par*, который отвечает за секрецию фермента обеспечивал увеличение выхода амилазы в 3 раза. Эти локусы были введены путем трансформации в штамм *B. subtilis* Marburg и дали усиление эффекта в 14 раз. Еще более продуктивные штаммы получают посредством мутаций на антибиотикорезистентность. Так, мутант С-108 продуцировал амилазы в 5 раз больше и протеазы в 80 раз больше, чем бактерии дикого типа. Хромосомальной ДНК из этих мутантов трансформировали указанный штамм. Продуктивность его по амилазе возросла в 1500 раз и составила 15 000 ед. мл⁻¹. Повышения продуктивности рекомбинантных микроорганизмов можно достигнуть путем введения высокоэкспрессируемых векторов с сильными промоторами, обеспечивающими высокий уровень транскрипции чужеродных генов. Одним из таких промоторов является *trp*-промотор. Он применялся для экспрессии генов интерферона и гормона роста. Данный

промотор обладает уникальным свойством - регулируемостью. Это позволяет отделить процесс роста рекомбинантных микроорганизмов от экспрессии чужеродных генов, жизнедеятельность которых может отрицательно сказаться на росте клеток-хозяев. Тф-промотор был введен в состав рекомбинантной плазмиды, в которой ген *галактозидазы* находился под контролем этого промотора. Работу промотора можно было регулировать добавлением в среду индуктора (индолилукриловой кислоты), а также изменением концентрации триптофана в среде.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ СЛИЯНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ

Для создания промышленных штаммов на основе грибов применяется техника слияния протопластов. Так был получен продуцент *глицериндегидрогеназы* при слиянии протопластов *Cellulomonas* sp. NT. Гибридный штамм обладал по сравнению с родительским в 18 раз более высокой активностью фермента. Имеются сообщения о получении высокоэффективного продуцента *амилазы* на основе протопластов гриба *Chalara paradoxa*. В настоящее время широко используются возможности клонирования генов для получения высокоэффективных продуцентов ферментов. Было получено увеличение выхода *амилазы* из *B. amyloliquefaciens* в составе мультикопийной плазмиды, при этом число копий этого гена возросло в 50 раз. Для увеличения экспрессии клонированных генов используют *lac*-промотор перед вводимыми генами. Чужеродный ген вводят в рестрикционный сайт плазмиды. Плазида расщепляется рестриктазой в другом сайте, после чего на нее воздействуют третьей эндонуклеазой в сайте гена *amp* и соединяют со сконструированным сборным *lac*-промотором. Этим способом была сконструирована плазида, которая определяет синтез от 10 000 до 15 000 молекул *в-глобулина кролика* на одну клетку *E. coli*. В случае эукариотических генов это, по-видимому, гибридный сайт связывания рибосомы, включающий последовательность *Шайна-Дельгарно* промотора и начальный триплет из последовательности вводимого гена. Чтобы получить оптимальное положение для промотора, брешь расширяется за счет соответствующей эндонуклеазы. Классический мутационно-селекционный подход использовался в течение многих десятилетий. Метод обогащался рядом модификаций: например, совместным воздействием разных мутагенов, действие которых заведомо направлено на разные локусы, сочетанием обработки физическим и химическим мутагеном и т. д.