

# ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ ШТАМУ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* ATCC 21831 ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА L-АРГІНІНУ

Журомський Є.О.<sup>1</sup>, Непомняща М.М.<sup>2</sup>, Горго Ю.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, zhuromskiy.zhenia@iit.kpi.ua

<sup>2</sup>ХНУ ім. В. Н. Каразіна

## Abstract

We describe the improvement of the strain *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21831 for the production of L-arginine. First, its tolerance to L-arginine analogs was increased by random mutagenesis. Then, systemic metabolic engineering was applied by removing regulatory repressors, optimizing NADPH levels, disrupting L-glutamate export, and tuning biosynthetic reactions to increase L-arginine production.

**Keywords:** amino acid, L-arginine, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21831 AR6, metabolic pathway.

**Вступ.** L-аргінін є умовно-незамінною амінокислотою, яка широко використовується у медицині, зокрема для виготовлення препаратів для лікування гепатиту і серцевої недостатності, у харчовій промисловості та сільському господарстві. З усіх методів отримання L-аргінину, найбільш ефективним і рентабельним є біосинтез. На сьогодні одним із найкращих і найбільш ефективних із виробничих продуцентів L-аргінину є штам *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21831 AR6 [1, 2].

Актуальність роботи полягає у важливості виробництва амінокислоти – L-аргінину, попит на яку на ринку постійно зростає. Однак через певні особливості в метаболічних шляхах бактерії-продуцента *C. glutamicum*, виробництво L-аргінину залишається на низькому рівні. Тому питання оптимізації росту і біосинтезу цієї амінокислоти є актуальним та важливим для збільшення об'ємів її виробництва в промисловому масштабі.

Мета роботи полягає у виконанні метааналізу та огляду шляхів оптимізації метаболізму в штамі *C. glutamicum* ATCC 21831 для посилення виробництва L-аргінину.

**Матеріали та методи.** Для проведення метааналізу та створення ревію використовувалися дані наукової літератури і досліджень, що стосуються розробки генетично модифікованого штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 для посиленого виробництва L-аргінину.

**Результати та обговорення.** Серед методів отримання продуктивного промислового продуцента *C. glutamicum* ATCC 21831 особливе місце відводиться метаболічній інженерії. Багато продуктивних штамів також отримують шляхом індукованого мутагенезу, проте використовуючи комбінацію двох методів можна розробити штами *C. glutamicum* ATCC 21831 AR0 – AR6 із великими можливостями продукування L-аргінину.

Нами було проаналізовано шляхи оптимізації штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 для виробництва L-аргінину з продукуючою здатністю 17 г/л. Відомо, що за біосинтез L-аргінину відповідають 8 генів: кластер генів *argC*, *argJ*, *argB*, *argD*, *argF*, *argR*, та кластер генів *argG*, *argH*. Експресія цих генів чітко регулюється для забезпечення ефективного виробництва L-аргінину такими білками, як FarR

та ArgR. Білок FarR регулює транскрипцію генів “аргінінового шляху”, відповідаючи на пряме зв’язування з промоторними ділянками *argC*, *argB*, *argF* та *argG*, змінюючи їх активність. Ген *argR* кодує білок ArgR – транскрипційний репресор генів оперону *arg*, що включає *argC*, *argB*, *argD*, впливаючи на активність їх промоторів [2, 3].

Вихідний штам – *C. glutamicum* ATCC 21831 AR0, дослідники [2] піддавали дії хімічного мутагену шляхом обробки клітин спочатку N-метил-N-нітросо-N’-нітрогуанідином, потім ультрафіолетом, внаслідок чого був отриманий аналогорезистентний до канаваніну та аргінін гідроксамату мутант *C. glutamicum* ATCC 21831 AR1. Отриманий мутантний штам AR1 в умовах періодичного культивування синтезував 34,2 г/л L-аргініну, що більш ніж удвічі більше, ніж при культивуванні штаму AR0 за аналогічних умов [2].

Механізм накопичення L-аргініну в клітинах *C. glutamicum* ATCC 21831 AR1 полягає у тому, що білок ArgR зв’язується з генами *argC* і *argG* та інгібує біосинтез. Ступінь інгібування збільшується за збільшення L-аргініну в середовищі. Для створення більш ефективного штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 AR2 гени *argR* та *farR* у штамі AR1 були інактивовані, що призвело до подальшого збільшення синтезу L-аргініну. У результаті періодичного культивування штаму AR2 було отримано 61,9 г/л L-аргініну, що на 28 г/л більше, ніж у випадку періодичного культивування штаму AR1 [2, 3].

L-аргінін є НАДФН-залежним метаболітом, тому надходження кофактора НАДФН є одним із критичних факторів для його ефективного виробництва. Для біосинтезу 1 моля L-аргініну потрібно 3 моля НАДФН, який генерується головним чином через пентозофосфатний шлях, проте його кількість недостатня для продукування L-аргініну. Для збільшення утворення НАДФН у штамі *C. glutamicum* ATCC 21831 AR2, за допомогою точкової мутації, було знижено експресію гена *pgi*, що кодує глюкозо-6-фосфат-ізомеразу, тим самим змушуючи метаболічний потік спрямовуватися в бік пентозофосфатного шляху. Культура штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 AR3 дозволила отримати 80,2 г/л L-аргініну, що на 30% більше, ніж у штамі AR2. Однак, при цьому швидкість накопичення біомаси зменшилась, що було пов’язано з меншою швидкістю споживання глюкози [2].

Щоб вирішити цю проблему, дослідниками було прийнято рішення оптимізувати метаболічний шлях, замінивши нативний промотор на *sod*-промотор у штамі AR3. Таким чином було отримано штам *C. glutamicum* ATCC 21831 AR4, у якому гени *opcA*, *pgl*, *tal*, *tkt* та *zwf* були надекспресовані. Це дало змогу цьому штаму при культивуванні на суміші глюкози та сахарози отримати 71,7 г/л L-аргініну [2].

Для подальшої оптимізації біосинтетичних шляхів L-аргініну в штамі AR4 було видалено ген *Ncgl1221*, який кодує механочутливий канал-експортер глутамату в дикому типі *C. glutamicum*, оскільки більше L-аргініну може вироблятися, якщо L-глутамат перетворюється на L-аргінін, а не виводиться в середовище. При розробці штаму AR1 була попередньо внесена точкова мутація, що змінило активність гена *argF*. Це призвело до збільшення часу

культивування, тому було прийнято рішення за генно-інженерної маніпуляції повернути ген до вихідної послідовності. Щоб збільшити доступність карбамоїлфосфату, необхідного для перетворення L-орнітину в L-цитрулін за допомогою білка ArgF, у штамі AR4 було замінено нативний промотор генів *carAB* на *sod*-промотор. Культура нового штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 AR5 дозволила отримати 82 г/л L-аргініну, що є більшим, ніж отримано зі штаму AR4 [2, 4].

Виробництво і виведення L-цитруліну, як побічного продукту, призводило до зниження виходу L-аргініну і збільшення витрат на виділення і очищення L-аргініну. Ця проблема потребувала певного вирішення. Тому потік ArgGH був збільшений шляхом заміни нативного промотора генів *argGH* на промотор фактора елонгації EF-Tu в геномі штаму AR5. Внаслідок чого був отриманий остаточний штам – *C. glutamicum* ATCC 21831 AR6, при культивування якого було отримано 92,5 г/л L-аргініну [2].

### **Висновки**

1. Наведений алгоритм оптимізації штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 шляхом індукованого мутагенезу призвів до підвищення виходу кінцевого продукту, разом із тим відбулась інактивація важливих для біосинтезу L-аргініну генів, що було недоліком.

2. Вирішенням проблеми стало конструювання штамів *C. glutamicum* ATCC 21831 AR2 – AR6 із використанням методів генної інженерії, що дозволило зменшити час культивування та збільшити кількість накопиченого L-аргініну.

3. У результаті культивування генетично модифікованого штаму *C. glutamicum* ATCC 21831 AR6 було отримано продукуючу здатність L-аргініну в 92,5 г/л.

**Подяка.** Автори висловлюють глибоку вдячність професорові кафедри промислової біотехнології та біофармації КПІ ім. Ігоря Сікорського, Дугану Олексію Мартем'яновичу, за цінні поради та корисні консультації під час підготовки роботи.

### **Список використаної літератури:**

1. Kurhaluk N. The Effectiveness of L-arginine in Clinical Conditions Associated with Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 9. P. 8205. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24098205>.

2. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production / S. H. Park et al. *Nature Communications*. 2014. Vol. 5, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms5618>.

3. Interaction of Transcriptional Repressor ArgR with Transcriptional Regulator FarR at the *argB* Promoter Region in *Corynebacterium glutamicum* / S. Y. Lee et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 77, no. 3. P. 711–718. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01610-10>.

4. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production / J. Nakamura et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73, no. 14. P. 4491–4498. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.02446-06>.