

УДК 576.851.49:663.1

Д. В. ГАЛИНОВСКИЙ¹, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ²**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА β -КАРОТИНА
В РАЗЛИЧНЫХ ШТАММАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

(Представлено академиком Л. В. Хотылёвой)

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск²Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 11.05.2009

Введение. Каротиноиды представляют собой широко распространенный в природе класс жирорастворимых пигментов с разнообразными функциями. В организме человека каротиноиды являются предшественником витамина А, который играет важную роль в реакциях, обеспечивающих зрительную функцию, а также необходим для нормального состояния слизистых оболочек. В хозяйственной деятельности каротиноиды производят как витаминные препараты в фармацевтической промышленности, пищевые добавки для животных, как антиоксиданты и пищевые красители в пищевой промышленности и др. Широкое применение каротиноидов приводит к ежегодному росту объемов использования данных пигментов, что создает все возрастающий спрос на эти вещества. Бактерии *Pantoea agglomerans* способны синтезировать каротиноиды и накапливать в клетках зеаксантин в гликозилированной форме. За последние десятилетия сделаны важные открытия в расшифровке структуры генов, обеспечивающих синтез каротиноидов (*crt*-генов). Установлено, что у *P. agglomerans* имеется шесть генов, объединенных в *crt*-кластер, которые обеспечивают синтез зеаксантина и его гликозилирование [1], изучены некоторые особенности функционирования и регуляции генов данного кластера [2]. Несмотря на значительный прогресс в изучении биохимических и генетических аспектов биосинтеза каротиноидов, продуктивность имеющихся бактериальных штаммов недостаточно высокая для промышленного использования. В связи с этим конструирование продуцентов каротиноидных пигментов при помощи генно-инженерных подходов представляется актуальной задачей.

Гидрофобные каротиноиды связываются с клеточной мембраной [3], и продуктивность штаммов может быть ограничена не количеством каротиноидов, которое способна синтезировать клетка, а количеством пигмента, которое может вместить ее мембранная система без функциональных нарушений [4]. Следовательно, для эффективной экспрессии *crt*-генов важную роль имеют особенности физиологии клеток, в которых синтезируются пигменты. Важным этапом на пути создания продуцентов каротиноидных пигментов является поиск оптимального штамма-хозяина для экспрессии генов биосинтеза каротиноидов, т. е. штамма, обладающего максимальной мембранной емкостью. С помощью современных методов молекулярной биологии можно осуществить перенос и экспрессию генов *crt*-кластера бактерий *P. agglomerans* в клетки других микроорганизмов. Этим открывается возможность использования микроорганизмов, способных накапливать большее количество каротиноидов. Предпринятые ранее эксперименты позволили клонировать [5] и экспрессировать гены синтеза β -каротина в разных штаммах *E. coli* и показать различия в продуктивности данных штаммов [6].

Цель работы – изучить экспрессию генов *crt*-кластера бактерий *P. agglomerans* 206, обеспечивающих биосинтез β -каротина, в различных штаммах грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы. В качестве источника генов биосинтеза β -каротина использовали плазмиду pHRP308–1-31ee [6]. Указанная плаزمида обеспечивала способность клеток синтезировать β -каротин, что фенотипически проявлялось в свойстве желтой окраски колоний. Плазми-

да рHRP308–1-31ее сконструирована на основе вектора рHRP308 [7], несущего ген устойчивости к гентамицину. Плазмида рHRP308 является мобилизуемой и для ее переноса в реципиентные клетки требуется функция генов *tra*-области плазмиды рRP4 [8]. Бактериальный штамм *E. coli* BW19851 несет интегрированные в свой геном необходимые гены *tra*-области, поэтому может быть донором плазмиды рHRP308–1-31ее [9]. Данную плазмиду вводили в бактерии *E. coli* BW19851 посредством трансформации по методике с использованием холодного раствора 0,1М CaCl₂ [10]. Отбор трансформантов проводили на плотной LB-среде с гентамицином в концентрации 10 мкг/мл.

Из бактериального штамма *E. coli* BW19851 плазмида рHRP308–1-31ее путем конъюгации передавалась в различные штаммы грамотрицательных бактерий. Перенос осуществляли совместным культивированием донора и реципиента на нитроцеллюлозной мембране на чашке Петри с плотной LB-средой в течение 40–60 мин при 28 °С. Затем бактериальные клетки смывали с мембраны 0,9 %-ным раствором NaCl и высевали по 100 мкл из разных разведений на плотную LB-среду с селективными факторами, исключавшими рост донора и реципиента. В качестве реципиентов в работе использовали штаммы *Pseudomonas aureofaciens* BU, *Ps. aureofaciens* B1249, *Ps. caryophylli* B1296, *Ps. chlororaphis* B1246, *Ps. chlororaphis* B1391, *Ps. fluorescens* B894, *Ps. mendocina* B972, *Ps. palleronii* B1328, *Ps. pseudoalcaligenes* B1295, *Ps. putida* KT2442, *Ps. putida* B899, *Ps. putida* BS394, *Ps. saccharophila* B902, *Ps. stutzeri* B975, *Comamanas testosteroni* B1241, *Agrobacterium tumefaciens* 2592, *Agr. tumefaciens* 1D1, *Alcaligenes ruhlandii* B1333, *Erwinia chrysanthemi* 49, *Er. chrysanthemi* 49–50.

Для получения спонтанных мутантов, устойчивых к ампициллину, 1 мл бактериальной культуры в стационарной фазе роста концентрировали в 10 раз и высевали на плотную LB-среду, содержащую антибиотик в концентрации 50 мкг/мл.

Для количественного определения каротиноидов бактериальные штаммы, содержащие плазмиды с генами *crt*-кластера, выращивали в течение 24 ч при температуре 28 °С и аэрации в LB бульоне, содержащем 5 мкг/мл гентамицина. Клетки из 8 мл культуры осаждали центрифугированием и экстракцию пигментов проводили 4 мл смеси метанол–хлороформ (2 : 1) в течение 40–60 мин [11]. После чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 461 нм. Параллельно с выделением каротиноидов проводили определение белка по методу Брэдфорда [12]. Продукцию каротиноидов выражали в количестве мкг пигментов на 1 мг общего клеточного белка либо в мкг пигментов на 1 мл культуры клеток. Для каждого штамма проводили не менее трех измерений, полученные данные подвергали статистической обработке.

В случаях, когда фенотипический признак, сообщенный плазмидой, проявлялся нечетко, и необходимо было подтвердить наличие плазмиды в бактериальных клетках, проводили выделение плазмидной ДНК по методике щелочного лизиса [10]. Проверка осуществлялась с помощью реакций рестрикции с использованием эндонуклеазы EcoRI (Fermentas, Литва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. При расщеплении плазмиды рHRP308–1-31ее ферментом EcoRI образовывалось два фрагмента размером 12 т. п. н., который соответствует вектору рHRP308, и 7 т. п. н., который соответствует фрагменту *crt*-кластера бактерий *P. agglomerans* 206. Последующее разделение продуктов гидролиза молекул ДНК осуществляли при помощи электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с использованием TAE-буфера [10].

Результаты и их обсуждение. Для переноса плазмиды рHRP308–1-31ее в клетки других бактерий использовали штамм *E. coli* BW19851, обеспечивающий конъюгативный перенос мобилизуемых плазмид. После введения плазмиды рHRP308–1-31ее в клетки данных бактерий у гентамицин-резистентных клонов подтверждали наличие плазмиды с генами биосинтеза β-каротина и использовали в качестве доноров для конъюгативного переноса рHRP308–1-31ее. Устойчивость к гентамицину является селективным маркером на наследование плазмиды, поэтому бактерии, которые планировали использовать в качестве реципиентов, проверяли на чувствительность к гентамицину. Все проверенные бактерии были чувствительны к данному антибиотику за исключением *C. testosteroni* B1241. В дальнейших экспериментах мы не использовали этот штамм. В качестве контрселективного маркера против донорских клеток использовали устойчивость к ампициллину, поэтому были получены реципиентные клетки, устойчивые к ампициллину. Для штаммов *Ps. aureofaciens* B1249 и *Ps. saccharophila* B902 не удалось отобрать клетки, резистентные к ампициллину, поэтому данные штаммы не использовали в дальнейшей работе.

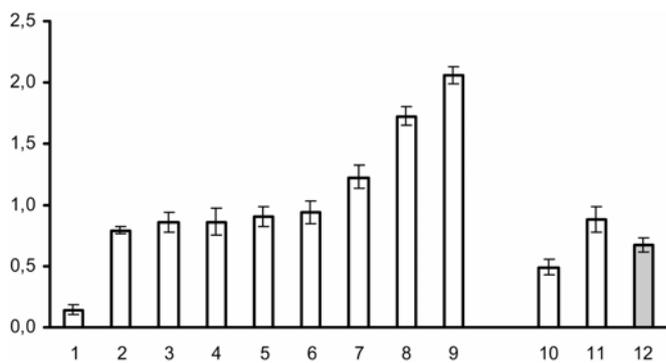


Рис. 1. Уровень продукции каротиноидных пигментов (в мкг на мг белка) различными бактериями, несущими плазмиду рHRP308-1-31ee: 1 – *Ps. caryophylli* B1296, 2 – *Ps. palleronii* B1328, 3 – *Ps. putida* B899, 4 – *Ps. mendocina* B972, 5 – *Ps. aureofaciens* BU, 6 – *Ps. chlororaphis* B1391, 7 – *Ps. chlororaphis* B1246, 8 – *Ps. fluorescens* B894, 9 – *Ps. stutzeri* B975, 10 – *E. coli* XL1-Blue [6], 11 – *E. coli* DH5 α [6], 12 – *P. agglomerans* 206

пигментов на мг белка (рис. 1)). *Ps. aureofaciens* BU, *Ps. chlororaphis* B1391, *Ps. mendocina* B972, *Ps. palleronii* B1328, *Ps. putida* B899 продуцировали на 20–40 % каротина больше по сравнению с *P. agglomerans* 206 (рис. 1). При использовании в качестве реципиента *Alc. ruhlandii* B1333 не удалось отобрать бактерии, устойчивые к гентамицину, что свидетельствовало об отсутствии в клетках плазмиды рHRP308–1-31ee. Остальные три штамма – *Ps. chlororaphis* B1246, *Ps. fluorescens* B894, *Ps. stutzeri* B975 – продуцировали в два и более раза больше пигментов, чем *P. agglomerans* 206 (рис. 1). Особенно выделялись *Ps. fluorescens* B894 и *Ps. stutzeri* B975, которые накапливали соответственно в 2,5 и 3,2 раза больше каротина по сравнению с бактериями *P. agglomerans* 206. Как указывалось выше, каротиноиды в бактериальных клетках связываются с липофильными структурами, а именно клеточными мембранами. Можно предположить, что данные штаммы обладают особенностями строения мембран, которые позволяют накапливать большее количество пигмента.

Кроме особенностей организации мембранной системы клетки, на свойства мембран оказывают влияние факторы внешней среды, например температура. Поэтому в следующей серии экспериментов оценивали влияние температурного фактора на способность накапливать каротиноиды бактериями *Ps. fluorescens* B894 и *Ps. stutzeri* B975, несущими плазмиду рHRP308–1-31ee. В качестве контроля использовали *P. agglomerans* 206.

Штаммы *P. agglomerans* 206, *Ps. fluorescens* B894 и *Ps. stutzeri* B975 выращивали при температуре 28 °C (является оптимальной), а также при температуре 18 и 37 °C. Для бактериальных культур определяли содержание каротиноидов и общего клеточного белка. Результаты измерений представлены на рис. 2. Для *Ps. fluorescens* B894 и *Ps. stutzeri* B975 наибольшее количество пигмента накапливалось при температуре 28 °C, и разница с 18 и 37 °C составляла более чем 2,5 раза. Для *P. agglomerans* 206 максимум продукции пигментов также наблюдался при 28 °C, хотя разница с 18 °C была не такой значительной, как для других штаммов.

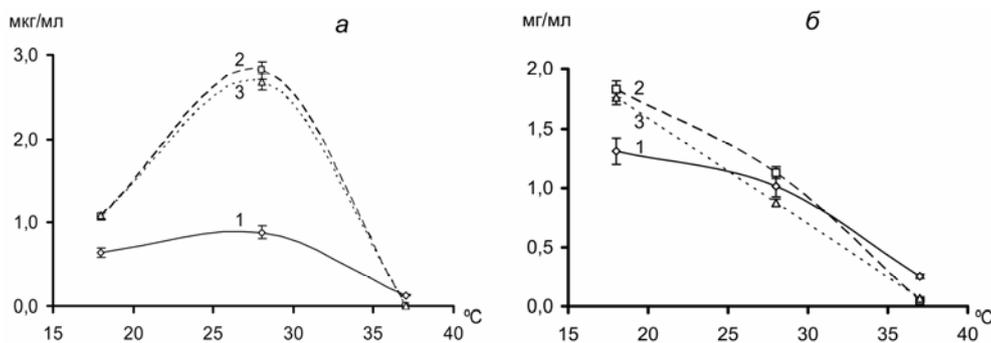


Рис. 2. Содержание каротиноидов (а) и общего клеточного белка (б) в культуре клеток у различных штаммов бактерий в зависимости от температуры культивирования: 1 – *P. agglomerans* 206, 2 – *Ps. fluorescens* B894 с плазмидой рHRP308-1-31ee, 3 – *Ps. stutzeri* B975 с плазмидой рHRP308-1-31ee

Для всех бактерий максимальное количество белка содержалось в культурах, которые выращивали при 18 °С. При культивировании бактерий *Ps. fluorescens* B894 и *Ps. stutzeri* B975 при 37 °С количество белка в пробах было очень низким, что свидетельствовало об отсутствии роста культур. Содержание общего клеточного белка является параметром, характеризующим метаболическое состояние клеток культуры. Чем больше содержание клеточного белка в культуре, тем выше метаболическая активность клеток. Из полученных результатов можно заключить, что оптимальной температурой культивирования бактерий *Ps. fluorescens* B894 и *Ps. stutzeri* B975, содержащих плазмиду рHRP308–1-31ee, является температура 18 °С и при повышении температуры рост культуры угнетается вплоть до полного подавления при 37 °С. Оптимальная температура роста не совпадает с температурой, при которой накапливается максимальное количество β-каротина.

Обычно при понижении температуры культивирования бактерий наблюдается ингибирование роста микроорганизмов (холодовой шок), что связано с увеличением вязкости мембраны, «замерзанием» мембраны. Клеточные механозимы, которые включаются при холодовом шоке, направлены на то, чтобы предотвратить «замерзание» мембраны и поддержать ее полужидкое состояние, обеспечивающее функциональность. Возможно, в бактериальных клетках β-каротин, связываясь с клеточной мембраной, увеличивает ее текучесть, компенсируя тем самым влияние пониженной температуры. В то время как при повышенной температуре и накоплении некоторого количества каротиноидов мембрана разжижается настолько, что не может выполнять свои биологические функции. Этим можно объяснить токсический эффект, проявившийся при 37 °С. В таком случае способность синтезировать каротиноиды может быть конкурентным преимуществом при температуре ниже оптимума культивирования и, наоборот, служить фактором, угнетающим рост, при температуре выше оптимальной. Можно предполагать, что мутации, приводящие к повышению вязкости мембраны, смогут снять токсическое действие β-каротина и способствовать увеличению емкости мембран, а значит, и увеличению продуктивности штаммов.

Заключение. Генетическую конструкцию на основе плазмиды широкого круга хозяев, несущую гены биосинтеза каротиноидов, посредством конъюгации передали в клетки различных штаммов грамотрицательных бактерий. Полученные штаммы накапливали β-каротин, что фенотипически проявлялось как признак желтой окраски бактериальных колоний. Наибольшее количество пигмента продуцировали бактерии *Ps. stutzeri* B975, несущие плазмиду с *crt*-генами. Показано, что данные бактерии накапливали в 3,2 раза больше пигмента по сравнению с бактериями дикого типа *P. agglomerans* 206. Установлено, что наибольшее количество β-каротина данный штамм накапливал при температуре 28 °С.

Литература

1. Sedkova N., Luan Pierre E. Rouvière, Qiong Cheng // J. Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71, N 12. P. 8141–8146.
2. Селезнёва Ю. В. Генетический контроль синтеза каротиноидных пигментов у бактерий *Pantoea agglomerans*: Дис. ... канд. биол. наук. Минск, 2006.
3. Ruther A., Misawa N., Böger P., Sandmann G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 48. P. 162–167.
4. Albrecht M., Misawa N., Sandmann G. // Biotechnology Letters. 1999. Vol. 21. P. 791–795.
5. Галиновский Д. В., Селезнёва Ю. В., Евтушенко А. Н. // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2006. № 5. С. 40–43.
6. Галиновский Д. В., Барай Ю. В., Евтушенко А. Н. // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2009. № 1. С. 68–71.
7. Catalog of the cloning vector collection / Department of microbial genetics, National institute of genetics; Comp. and ed. by S. Yasuda, S. Tamura, M. Yamamoto. Mishima, 2006.
8. Haase J., Lurz R., Grahm A. M. et al. // J. of Bacteriology. 1995. Vol. 177, N 16. P. 4779–4791.
9. Metcalf W. W., Jiang W., Wanner B. L. // Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984.
11. Hundle B. S., Yeager P., Kleining H. et al. // Photochemistry and photobiology. 1991. Vol. 54, N 1. P. 89–93.
12. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991. С. 466–477.

GALINOUSKY D. V., EVTUSHENKOVA A. N.

dimgal200@rambler.ru

EXPRESSION OF β-CAROTENE SYNTHESIS GENES IN DIFFERENT STRAINS OF GRAM NEGATIVE BACTERIA

Summary

A plasmid based on a broad host range vector is harboring genes of synthesis of β-carotene. The plasmid was transferred to different strains of gram negative bacteria by conjugation. The obtained strains collected β-carotene and had yellow pigmentation of bacterial colonies. Strain *Pseudomonas stutzeri* B975 harboring the plasmid produced the maximum yield of pigment. This strain collected β-carotene 3.2 as much as wild-type bacteria *Pantoea agglomerans* 206. We revealed the optimal growth temperature and the maximum pigment collecting temperature of *Ps. stutzeri* B975 caring the β-carotene synthesis genes.