

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗ ШТАММА *E. faecalis* БИМ В-1012**

А. В. Лагодич¹, А. И. Буко², А. М. Галкина³, А. Э. Наронская⁴, А. В. Соколюк⁵, М. Ю. Шонина⁶, Н. П. Максимова⁷,
В. А. Шетко⁸, Н. А. Головнева⁹

^{1,3,4,5,6,7}Белорусский государственный университет, пр-т Независимости, д.4, г. Минск, 220030, Беларусь

^{2,8,9}Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, д.2, г. Минск, 220141, Беларусь.

Для микробиологического синтеза лактатов могут быть использованы различные представители лактококков, энтерококков и др. [1, 2, 3]. Продуктивность промышленных штаммов в оптимизированных условиях составляет от 2 до 57 г/л·ч с выходом продукта от 22-26 до 92-120 г/л. Наряду с выделением новых изолятов, способных эффективно продуцировать целевой продукт, актуальным является совершенствование технологического процесса, а так же улучшение свойств имеющихся культур посредством генетической модификации штаммов-продуцентов [4, 5].

Штаммы *E. faecalis* обладают хорошим потенциалом. Они ферментируют мелассу без ее предварительной обработки, при этом содержание L-изомера составляет 97-98 % [6]. Одним из преимуществ их использования для промышленного получения молочной кислоты является отсутствие побочных продуктов метаболизма.

В работе использовали бактериальный штамм *E. faecalis* БИМ В-1012 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (Институт микробиологии НАН Беларуси) и его кислотоустойчивые варианты, полученные в результате химического мутагенеза.

С использованием метода множественного выравнивания была построена консенсусная последовательность генов для двух типов L-лактатдегидрогеназы (L-ЛДГ), были установлены их консервативные и варьируемые области, что позволило разработать специфические праймеры для амплификации генов ЛДГ первого и второго типов. Длина ожидаемого продукта амплификации составляла 1013 и 983 п.н. при общей протяженности открытой рамки считывания генов ЛДГ1 – 984 п.н., а гена ЛДГ2 – 954 п.н.

ПЦР проводили в два этапа с использованием температурного инкремента на стадии отжига праймеров (15 циклов): 94°C – 5 мин, 1 цикл; 94°C – 30 сек, 64-56°C – 30 сек*, 68°C – 2 мин 10 сек, 15 циклов; 94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек*, 68°C – 2 мин 10 сек (20 циклов); 72°C – 10 мин, 1 цикл; 4°C – ∞. Для амплификации гена L-лдг2 значения температуры, отмеченные (*), были снижены на 4°C.

Для изучения полиморфизма генов был осуществлен сравнительный ПДРФ и сиквенс-анализ нуклеотидных последовательностей генов L-ЛДГ у различных штаммов *E. faecalis*, нуклеотидные последовательности которых представлены в открытых базах данных, и штамма *E. faecalis* БИМ В-1012, полученных в данном исследовании.

Нуклеотидная последовательность генов L-ЛДГ штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 типична для лактатдегидрогеназ *E. faecalis* (уровень идентичности 95-99 %) и кодирует белковую последовательность, содержащую 2 домена: НАД-связывающий домен на N-терминальном конце и гликозид-гидролазный домен, расположенный со стороны C-конца. Так же в центральной области белковой молекулы предсказывается характерный для всех дегидрогеназ активный сайт – акцептор протонов.

Выявленная общность строения генов L-ЛДГ штамма *E. faecalis* БИМ В-1012 с таковыми других представителей вида так же демонстрирует существенные отличия между лактатдегидрогеназами обоих типов. Выявляемая идентичность по аминокислотному составу составляет только около 44 %.


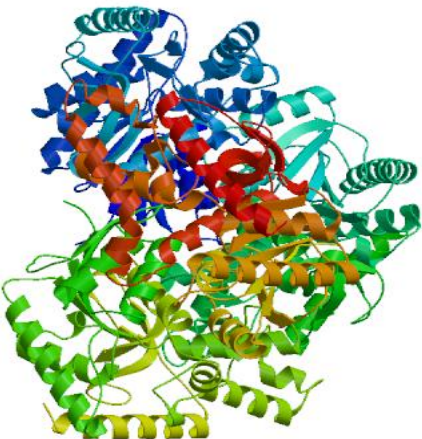
L-лактатдегидрогеназа 1-го типа	L-лактатдегидрогеназа 2-го типа
	

Рис. 1. Пространственная организация L-лактатдегидрогеназ 1-го и 2-го типа бактерий *E. faecalis* (данные получены с использованием консенсусных последовательностей и ресурса: <http://www.uniprot.org/uniprot/>)

Литература

1. Roble N.D. L-lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cell immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) / N.D. Roble, J.C. Ogbonna, H. Tanaka // *Biotechnol. Lett.* – 2003. – Vol. 25. – P. 1093–1098.
2. Исакова Д.М. Способ получения молочной кислоты. Патенты России (База патентов на изобретения РФ) [Электронный ресурс]. – 2001. – Режим доступа: <http://ru-patent.info/21/75-79/2175014.html>.
3. Галкина Г.В. Штамм бактерий *Enterococcus faecium* B-2240 D - продуцент оптически чистой L(+)-молочной кислоты и промышленный способ получения L(+)-молочной кислоты или ее солей. [Электронный ресурс]. – 2003. – Режим доступа: <http://bd.patent.su/2205000-2205999/pat/servlet/servlet5298.html>.
4. The US corn ethanol industry: an overview of current technology and future prospects / B.S. Dien [et al.] // *Int Sugar J.* – 2002. – Vol. 104. – P. 204–211.
5. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure l-(+)-lactic acid / K. Kylä-Nikkilä [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 3835–3841.
6. Wee Y.-J. Biotechnological production of Lactic Acid / Y.-J. Wee, J.-N. Kim, H.-W. Ryu // *Food Technol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 44. – № 2. – P. 163–172.