

На правах рукописи

Дорошенко Вера Георгиевна

**НАПРАВЛЕННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ХРОМОСОМЫ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ
СИСТЕМНОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА
ФЕНИЛАЛАНИНА**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Акционерном обществе «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»)

Научный консультант:	Машко Сергей Владимирович, доктор биологических наук, профессор, советник генерального директора по науке АО « Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»
Официальные оппоненты:	Абилев Серикбай Каримович, доктор биологических наук, профессор, учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук Демидюк Илья Валерьевич, доктор химических наук, доцент, профессор Российской академии наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» Патрушев Лев Иванович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
Ведущая организация:	Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности

Защита состоится 18 мая 2021 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНИИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и проработанность темы исследования

Производство аминокислот с помощью ферментации является одним из столпов промышленной биотехнологии, а получение штаммов для этого производства всегда было на переднем крае биоинженерных технологий. Технологии, разработанные с целью получения продуцентов аминокислот, использовались и будут использоваться в дальнейшем, как для получения продуцентов других полезных соединений, так и в исследовательской практике.

Датой рождения микробиологического производства аминокислот считается 1957 г., когда был изобретён дешёвый способ получения глутамата натрия из сахара и аммония посредством ферментации *Corynebacterium glutamicum*. Если *C. glutamicum* может продуцировать глутаминовую кислоту и лизин при определённых условиях культивирования, то получение других аминокислот микробиологическим способом удалось достичь только с помощью специально полученных штаммов, первоначально отобранных методами мутагенеза и селекции, позже с помощью генно-инженерных подходов. Внедрение последних подходов позволило заменить термин «селекция» в отношении получения новых штаммов на термин «конструирование». Одним из первых сконструированных таким образом штаммов был штамм-продуцент L-треонина на основе *Escherichia coli*, полученный во ВНИИГенетика в 80-ых годах прошлого века, под руководством акад. В.Г. Дебабова и проф. Ю.И. Козлова¹. В это время, благодаря молекулярно-генетической изученности и разработанности соответствующего инструментария, бактерия *E. coli* переходит из объекта исследований в один из первостепенных объектов для развития микробиологического производства. Позже методология получения продукции полезных соединений с помощью живых клеток стала называться метаболической инженерией². Метаболическая инженерия – это направленное улучшение процесса биосинтеза практически важного целевого продукта и свойств метаболизма организма как целостной системы путем модификации специфических биохимических реакций и их регуляции или создания новых метаболических путей с использованием технологии рекомбинантных ДНК и других молекулярно-биологических и биохимических методов.

Первый промышленный продуцент L-фенилаланина *E. coli* был получен в американской компании NutraSweet, название которой стало товарным знаком-маркой аспартама, низкокалорийного подсластителя, синтезированного из фенилаланина и аспарагиновой кислоты³.

Основной принцип конструирования продуцентов заключался в перенаправлении потока углерода по заданному пути. Это достигалось за счёт целенаправленно отбираемых мутаций, снимающих репрессию пути биосинтеза, амплификации целевых биосинтетических генов на плазмидах, инактивации

¹ Debabov V.G., Kozlov J.I. Bacterial strain of *Escherichia coli* ВКПМ В3996 as the producer of L-threonine // US Patent 5175107. – 1992.

² Bailey J. E. Towards a science of metabolic engineering // Science. – 1991. – V. 252. – №. 5013. – P. 1668-1673.

³ Grinter N.J. Developing an L-phenylalanine process // CHEMICAL TECHNOLOGY (ISSN: 0009-2703). – 1997. – V. 28. – №. 7. – P. 33-37.

конкурирующих путей биосинтеза. Для получения продуцентов использовались устойчивые к ретроингибированию формы ключевых ферментов биосинтеза фенилаланина: 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат (ДАНР)-синтазы (ЕС 4.1.2.15) и хорионатдегидратазы (ЕС 5.4.99.5/1.3.1.12). С помощью клонирования соответствующих генов на плазмидах усиливали активности ферментов общего ароматического пути и собственно биосинтеза фенилаланина из хорионовой кислоты. Амплифицируя гены *tktA* и *ppsA*, кодирующие транскетолазу (ЕС 2.2.1.1) и фосфоенолпируватсинтазу (ЕС 2.7.9.2), соответственно, увеличивали пулы предшественников, интермедиатов центрального метаболизма, эритрозо-4-фосфата (Е4Р) и фосфоенолпирувата (РЕР). Продуценты фенилаланина *E. coli* были ауксотрофами по тирозину. Последний признак предотвращал побочную продукцию тирозина, являющуюся следствием почти идентичных (за исключением двух последних реакций) путей синтеза тирозина и фенилаланина в *E. coli*.

Настоящая работа, в основном, посвящена разработке новых подходов или стратегий дальнейшего усовершенствования продуцента фенилаланина. Эти подходы должны были оптимизировать метаболизм клетки с учётом требований производства, т.е. процессов ферментации и очистки продукта. При этом необходимо было принимать во внимание появившиеся в ряде стран новые законодательные ограничения, касающиеся использования плазмидных штаммов в производстве продуктов для пищевой промышленности и медицины.

Для интеграции целевых генов в хромосому кишечной палочки в АО «АГРИ» проф. В.З. Ахвердян с сотрудниками была оптимизирована их Ми-опосредованная транспозиция⁴. Используя этот метод, бывший ещё на стадии доработки, мы оптимизировали разработанную ранее совместно с проф. В.А. Лившицем стратегию получения продуцентов, усваивающих сахарозу. Содержащая сахарозу меласса – побочный продукт сахарного производства, является выгодным сырьём для микробиологической промышленности. Однако, признак утилизации сахарозы является факультативным у энтеробактерий, и лабораторные штаммы *E. coli*, исторически используемые в качестве платформ для получения продуцентов аминокислот, не росли на средах, содержащих сахарозу в качестве источника углерода.

Поворотным моментом для перехода к конструированию бесплазмидных продуцентов *E. coli* явилось внедрение в практику АО «АГРИ» технологий рекомбинационной инженерии. В частности, под руководством проф. С.В. Машко и при участии автора этой работы была модифицирована методика Даценко и Ваннера, основанная на Red-зависимой системе гомологичной рекомбинации бактериофага λ.

К началу настоящей работы плазмидные продуценты *E. coli* могли накапливать более 50 г/л фенилаланина, т.е. до титров, значительно превышающих растворимость этой аминокислоты в среде культивирования (~ 25 г/л). Для увеличения продуктивности штамма в этих условиях необходимо было активировать экспорт продукта из клетки. Здесь наши исследования, касающиеся экспорта ароматических

⁴ Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Каплан А.М. и др. Разработка mini-Ми системы, обеспечивающей эффективную интеграцию генетического материала в хромосому бактерии *Escherichia coli* и его амплификацию // Биотехнология. – 2007. – №. 3. – С. 3-20.

аминокислот YddG, явились продолжением работ проф. В.А. Лившица с сотрудниками, которые уже нашли потенциальные экспортёры различных аминокислот в кишечной палочке⁵.

Ауксотрофия по тирозину (Tyr⁻) и связанная с этим необходимость добавлять его в ферментационную среду ставила себестоимость фенилаланина в прямую зависимость от стоимости *L*-тирозина. В то же время, при использовании продуцента Tyr⁺, тирозин, накапливающийся в культуральной жидкости, затруднял очистку продукта. Необходима была стратегия получения продуцента со сниженным уровнем тирозина в качестве примеси.

При поиске узких мест в пути биосинтеза фенилаланина в *E. coli* мы обратили внимание на то обстоятельство, что хоризмат-синтазы (EC 4.2.3.5) бактерий и растений утратили флавин-восстанавливающий домен, в отличие от подобных ферментов из дрожжей и грибов.

Для получения фенилаланина использовался периодический процесс с подпиткой глюкозы, где основное накопление продукта происходило в стационарной фазе. Один из предшественников фенилаланина E4P являлся интермедиатом пентозофосфатного пути (PPP), в который направлялось менее трети углерода из глюкозы при росте клеток *E. coli* на этом субстрате. Поэтому стратегия, направленная на дальнейшее увеличение продукции, была нацелена на оптимизацию синтеза фенилаланина в стационарной фазе и снижение его накопления во время роста.

Разработанные в работе стратегии являлись составными частями комплексного процесса создания промышленного продуцента, отвечающего требованиям коммерчески выгодного технологического процесса получения продукта. Наши стратегии материализовались в форме прецезионных генетических модификаций хромосомы *E. coli*. Эти модификации получали в лабораторных штаммах с известной первичной структурой, но с возможностью переноса в любой штамм кишечной палочки. Под системным конструированием мы понимаем создание продуцента с требуемыми свойствами с помощью комбинирования необходимых генетических модификаций.

Все исследования данной работы были проведены на некоммерческих штаммах, которые мы называли модельными продуцентами.

Цель исследований - разработка новых молекулярно-генетических подходов для конструирования бесплазмидного продуцента *L*-фенилаланина на основе *E. coli* с улучшенными технологическими свойствами.

В ходе работы решались следующие задачи:

- получение генетически стабильных штаммов *E. coli*, растущих на сахарозе;
- конструирование модельных продуцентов с помощью рекомбинационной инженерии;
- повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт усиления его экспорта из клетки;
- получение продуцента *L*-фенилаланина Tyr⁺, не зависящего от тирозина и не накапливающего его в процессе ферментации;

⁵ Aleshin V.V., Zakataeva N.P., Livshits V.A., A new family of amino acid efflux proteins // Trends in Biochemical Sciences. – 1999. – V. 24. – №. 4. – P. 133-135.

- исследование достаточности восстановленного флавина в хоризматсинтазной реакции в условиях сверхсинтеза *L*-фенилаланина в клетках *E. coli*;
- конструирование модельного продуцента с метаболической регуляцией синтеза *L*-фенилаланина.

Научная новизна и практическая значимость работы

На основные результаты данной работы компания Аджиномото (Япония) получила патенты, подтверждающие их приоритетность и практическую значимость.

Было показано, что кластер сахарозных генов *scr*, кодирующих ферменты утилизации сахарозы с транспортом, зависимым от фосфотрансферазной системы (PTS) бактерии, находится в составе псевдотранспозона Tn2555, который неспособен перемещаться как единое целое. Предложен способ получения сахарозоположительных продуцентов с генетически детерминированной структурой, содержащих гены утилизации сахарозы в хромосоме. (Патент РФ № 2212447 и его аналоги: EP 1149911; US 6960455; US 7179623).

Охарактеризован экспортер ароматических аминокислот YddG. Получены модификации хромосомы, приводящие к активации экспорта аминокислоты из клетки, которые были использованы в продуцентах ароматических аминокислот (Патент РФ № 2222596 и его аналоги: US 7666655; EP 1449918).

Разработан новый подход ослабления конкурирующего пути биосинтеза, основанный на С-концевой протеолитической деградации продукта прецизионно сконструированного аллеля целевого гена. С использованием этого подхода был впервые получен продуцент *L*-фенилаланина *E. coli*, не нуждающийся в тирозине и не накапливающий его в процессе ферментации (Патент РФ № 2264459 и его аналоги: US 9376695; FR 2922218; JP 5217850; US 9708637).

Впервые продемонстрировано использование гетерологичной хоризмат-синтазы для получения продукции *L*-фенилаланина в *E. coli*.

Впервые показано использование промоторов *Rho*-регулона для повышения продукции аминокислот, в частности, фенилаланина (Патент РФ № 2405040 и его аналоги: EP 1990416; US 8394612).

Большинство из разработанных подходов, исследованных или аналогичных генетических модификаций, было практически использовано автором и его коллегами при создании продуцентов фенилаланина на основе *E. coli*, внедрённых фирмой Аджиномото в действующее мировое биотехнологическое производство.

Апробация работы

Материалы диссертации представлялись в отчётах и отчётных докладах в АО «АГРИ» и в Аджиномото (Япония) на протяжении ряда лет (2002-2013 гг.); на международной конференции по транспозиции (1987 г.) в Санта-Фе (США); на IV Съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пущино, 2008); на III международной конференции по прикладной микробиологии BioMicroWorld 2009 в Лиссабоне (Португалия), на школе-конференции, посвященной 50-летию Института ГосНИИГенетика (Пущино, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, из которых 11 экспериментальных работ, две обзорные статьи, 10 патентов (без учёта их аналогов в разных странах).

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в АО «АГРИ». Основные результаты были получены в период работы автора над проектом «Фенилаланин» (2000-2013 гг.), сначала в качестве ответственного исполнителя, а затем – руководителя проекта, который был приостановлен ввиду решения поставленных задач. Автор искренне признателен всем соавторам своих публикаций. Особо хочется отметить сотрудников группы автора: Ларису Айрих, Ирину Цыренжапову и Анну Слесарёву. Автор благодарен своему первому научному руководителю Виталию Аркадьевичу Лившицу за длительное научное сотрудничество. Автор особо признателен своему научному консультанту Сергею Владимировичу Машко за дискуссии, стимулирующие написание этой работы.

Личный вклад соискателя состоял в формулировании целей и разработке стратегий исследования, планировании работы группы сотрудников, личном участии в лабораторных экспериментах, обобщении и интерпретации результатов.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из стандартных основных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего 308 цитируемых источников. Работа изложена на 210 страницах, включая 46 рисунков и 28 таблиц.

Положения, выносимые на защиту

- (1) Разработан способ получения продуцентов, усваивающих сахарозу, с помощью miniMu-интеграции кластера генов *scr* в хромосому *E. coli* и последующего картирования mini-Mu-*scr* инсерций методом обратной ПЦР.
- (2) С помощью рекомбинационной инженерии получены модельные продуценты гистидина и ароматических аминокислот, которые были спланированы на основе данных о пути биосинтеза и его регуляции.
- (3) Охарактеризован ген *yddG*, кодирующий белок цитоплазматической мембраны *E. coli*, искусственная сверхэкспрессия которого в хромосоме с использованием промотора P_L , увеличивала продукцию ароматических аминокислот в соответствующих модельных продуцентах.
- (4) С помощью С-концевого программируемого протеолиза подобран уровень активности хоризматмутазы/префенатдегидрогеназы, кодируемый геном *tyrA* *E. coli*, необходимый для роста продуцента *L*-фенилаланина и ограничивающий накопление *L*-тирозина в процессе ферментации.
- (5) С использованием модельных продуцентов фенилаланина с известной первичной структурой и двух типов хоризмат-синтаз исследована достаточность флавина в хоризматсинтазной реакции в условиях продукции *L*-фенилаланина.
- (6) Продемонстрирована метаболическая активация синтеза фенилаланина с помощью промоторов P_{pstS} и P_{phoA} генов *Pho*-регулона, обеспечивающего

клеточный ответ на лимитацию по неорганическому фосфату (Pi). Эти промоторы использовались для контроля гена устойчивой к фенилаланину ДАНР-синтазы, которая дерепрессировала ароматический путь биосинтеза.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение генетически стабильных штаммов-продуцентов *E. coli*, способных утилизировать сахарозу

1.1. Анализ первичной структуры варианта сахарозного транспозона Tn2555

К началу данной работы для получения продуцентов аминокислот, растущих на сахарозе, использовали сахарозный транспозон Tn2555, который происходил из непатогенного штамма *E. coli* дикого типа. Этот транспозон имел варибельную структуру⁶, причина возникновения которой была исследована в данной работе.

Была определена и проанализирована первичная структура одного из вариантов этого транспозона Tn2555.3, интеграцию которого удалось отобрать в плазмиду pBR325. Tn2555.3 (GeneBank:AY485150) содержал три копии IS26. Две копии фланкировали Tn2555.3 в прямой ориентации, третья, инвертированная, локализовалась внутри (Рисунок 1А). Внутренняя копия IS26 разделяла транспозон на две части: содержащую гены утилизации сахарозы (~ 7 т.п.н.) и незначущую область. Последняя часть не содержала протяженных рамок считывания и имела небольшие участки гомологии с бактериальными и фаговыми генами. Кластер генов утилизации сахарозы был на ~100% идентичен известным генам *scrKYABR* из плазмиды pUR400, выделенной из сальмонелл⁷. Эти гены кодировали фруктокиназу, сахарозный порин, транспортный белок EII^{Scr}, взаимодействующий с PTS хозяина, сахарозо-6-фосфат гидролазу и транскрипционный регулятор LacI-типа, соответственно. Таким образом, Tn2555 содержал гены, кодирующие ферменты PTS-зависимой утилизации сахарозы, т.е. транспорт сахарозы через внутреннюю мембрану сопровождался её фосфорилированием за счет PEP.

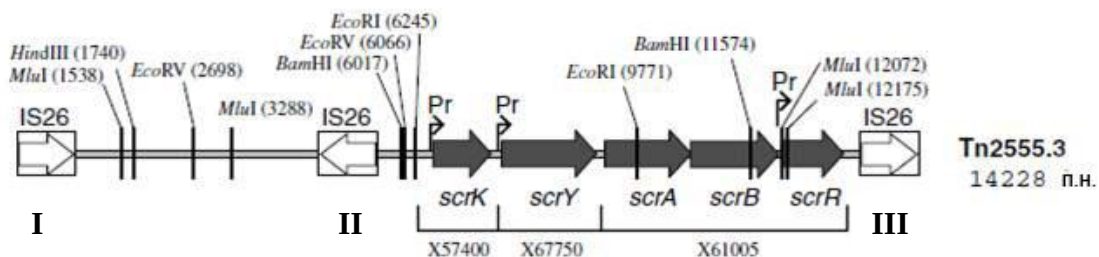
По сопоставлению данных первичной структуры и рестрикционного анализа была определена структура еще одного варианта Tn2555, Tn2555.1 (Рисунок 1Б). Tn2555.1 отличался от Tn2555.3 инверсией частей, содержащих и не содержащих гены *scr*. Учитывая, что IS26 перемещался посредством образования коинтеграторов между донорным и реципиентным репликонами⁸, мы предположили, что структура, называемая транспозоном Tn2555, не способна перемещаться как единое целое.

⁶ Дорошенко В. Г., Данилевич В.Н., Каратаев Г.И., Лившиц В.А. Структурная и функциональная организация транспозона Tn2555, несущего гены утилизации сахарозы // Молекулярная биология – 1988. – Т. 22. – № 3. – С. 645-658.

⁷ Schmid K., Schupfner M., Schmitt R. Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12 // Journal of Bacteriology. – 1982. – V. 151. – №. 1. – P. 68-76.

⁸ Galas D.J., Chandler, M. Bacterial insertion sequences. / Mobile DNA; Berg D.E., Howe M.M., Eds. – American Society for Microbiology, Washington, DC, 1989. – P. 109-162.

А



Б

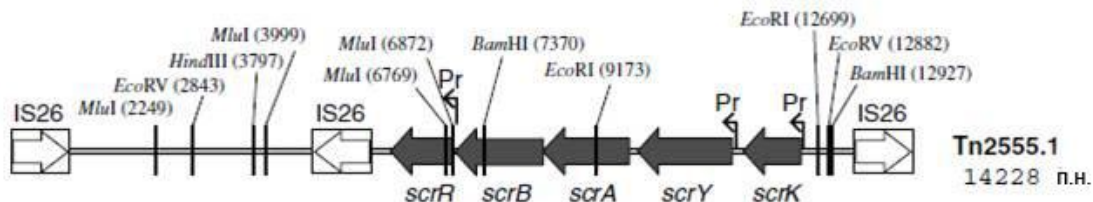


Рисунок 1 - Структуры Tn2555.3 (А) и Tn2555.1 (Б)

Ниже генов *scr* в Tn2555.3 указаны номера последовательностей фрагментов ДНК (GeneBank) из плазмиды pUR400. Показаны сайты рестриктаз, которые использовались для анализа коинтеграгов (Раздел 1.2).

1.2. Модель транспозиции Tn2555

Была предложена модель транспозиции Tn2555 (Doroshenko, Livshits, 2004), согласно которой каждая из трёх копий IS26 в Tn2555.1 или в Tn2555.3 может индуцировать образование коинтеграгов, которые разрешаются в результате гомологичной рекомбинации. Эта модель была рассмотрена на примере возможных перемещений генов *scr* и IS26 из донорной плазмиды pBR325::Tn2555.3 в реципиентную плазмиду RP4 (Рисунок 2).

Предложенная модель транспозиции была подтверждена экспериментально. Для отбора транспозиций Tn2555.3 из pBR325::Tn2555.3 ($Ap^r Cm^r Tc^r Suc^+$) в конъюгативную плазмиду RP4 ($Ap^r Km^r Tc^r$) проводили скрещивания биплазмидного штамма RecA⁻ штамма HB101(pBR325::Tn2555.3; RP4) с W3350. При анализе плазмидной ДНК из независимо полученных трансконъюгантов $Cm^r Suc^+$ были обнаружены, как неразрешённые, так и разрешённые коинтеграги (Рисунок 2А, Б). В последнем случае клетки содержали маленькую плазмиду, которая соответствовала pBR325::IS26, и большую плазмиду. Большие плазмиды анализировали после конъюгационного переноса в штамм HB101. Они содержали маркеры Ap^r , Km^r , Tc^r , Suc^+ и по рестрикционному анализу соответствовали RP4::Tn2555.3 или RP4::Tn2555.1.

В клетках одного трансконъюганта, помимо плазмиды RP4-типа, присутствовал делеционный вариант плазмиды pBR325, содержащий IS26 (pBR325Δ::IS26). Обнаружение плазмиды pBR325Δ::IS26 свидетельствовало о внутримолекулярной транспозиции IS26 внутри коинтеграта, которая приводила к разъединению репликонов и, следовательно, к образованию нового сочетания последовательностей (ПС) в сахарозном транспозоне (Рисунок 2В).

Таким образом, Tn2555 являлся псевдосоставным транспозоном. Как составной транспозон он был фланкирован копиями IS-последовательности, но при этом не

перемещался как единое целое. Tn2555 не содержал дополнительных генов, кроме генов *scr*, которые бы способствовали росту клеток на сахарозе. Установленный способ перемещения сахарозного транспозона Tn2555 был неоднозначен и не позволял получать штаммы с генетически детерминированной структурой.

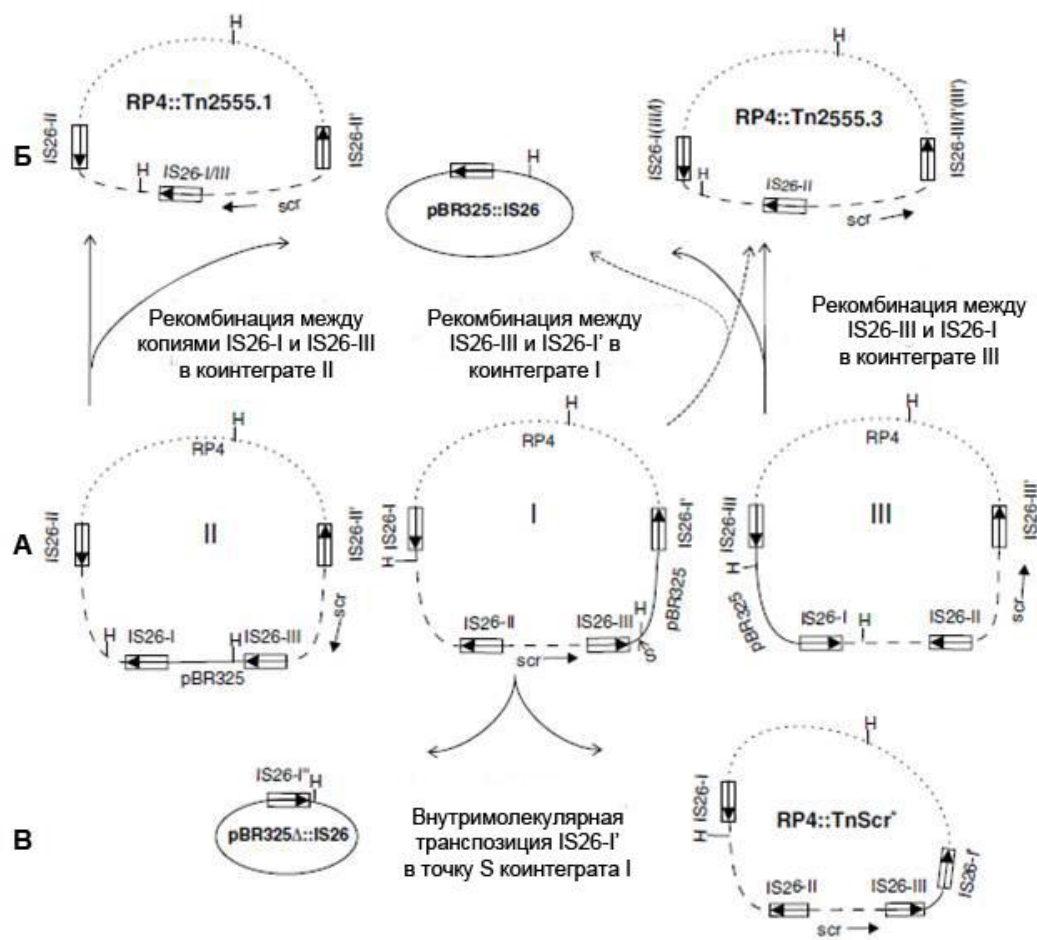


Рисунок 2 - Модель перемещения генов *scr*, находящихся в составе Tn2555.3

(А) Варианты коинтеграгов pBR325::Tn2555.3 и RP4, образованные I, II или III копией IS26. Нумерация копий IS26 в составе Tn2555.3 показана на Рисунке 1А.

(Б) Образование RP4::Tn2555.1 и RP4::Tn2555.3.

(В) Гипотетическое образование нового сахарозного транспозона TnScr.

Обозначен сайт расщепления рестриктазой *Hind*III (H), с помощью которой анализировали продукты транспозиции.

1.3. Интеграция генов *scr* с помощью miniMu в хромосому и получение ароматических аминокислот из сахарозы в *E. coli*

Для получения стабильных интеграций генов *scr*, сахарозные детерминанты были клонированы в интегративном векторе pMS1 (предоставлен В.З.Ахвердяном (АО «АГРИ»)) и встроены в хромосому *E. coli* MG1655 по технологии Му-интеграции (Patent EP 1149911). В обоих случаях необходимые клоны отбирали по росту на минимальной среде М9 с сахарозой в качестве источника углерода.

Для использования в продуцентах аминокислот выбирали интеграции в локусы, не существенные для жизнеспособности клетки и для продукции конкретной

аминокислоты. Точки интеграции генов *scr* в хромосоме определяли с помощью метода обратной ПЦР и последующего секвенирования полученных фрагментов ДНК (Зименков и др., 2004). Таким образом, была получена интеграция генов *scr* в ген *ebgA* (69,4 мин. ген. карты *E. coli*), которая использовалась в дальнейшем.

Для получения ароматических аминокислот из сахарозы представляло интерес сравнить катаболизм сахарозы, происходящий в клетках с участием и без участия PTS, т.е. содержащих вышеописанный кластер генов *scr* или кластер генов *csc*. Последний кластер был обнаружен в хромосоме штамма кишечной палочки, выделенного из почвы (chromosomally encoded sucrose catabolism)⁹. Кластер включал пять генов *cscB*, *cscK*, *cscA*, *cscR*, кодирующих сахарозоспецифичный протонный симпортёр, фруктокиназу, инвертазу и репрессор соответственно. Источником генов *csc* в нашей работе являлся штамм *E. coli* K12 LJ200¹⁰.

Оба кластера сахарозных генов, *ebgA::scrKYABR* и *dsd::cscBKAR*, переносили в продуценты с помощью трансдукции фагом T4GT7. Клоны трансдуктантов отбирали на минимальной среде с сахарозой в качестве источника углерода.

В работе представлены примеры тестирования в ферментации *Suc*⁺-вариантов продуцентов триптофана и фенилаланина, в которые были введены гены *scr* или *csc*. Используемые продуценты SV164(pGH5) (предоставлен компанией Аджиномото) и DV1017 (получен в работе) происходили из разных источников и не имели родственную генеологию, что могло быть причиной различий в эффектах генов *scr* и *csc* на продукцию Три и Фен из сахарозы. Выход Три из сахарозы был примерно одинаков для штаммов *scr* и *csc* и превышал выход из глюкозы на 1-1,5% (Таблица 1).

Таблица 1 - Продукция L-триптофана при ферментации в пробирках

Штамм	Глюкоза, 40 г/л			Сахароза, 40 г/л		
	ОП ₅₄₀	Три, г/л	Выход, %	ОП ₅₄₀	Три, г/л	Выход, %
SV164(pGH5)						
–	6,0	5,0	12,5	–	–	–
<i>scr</i>	6,2	5,1	12,7	6,2	5,5	13,7
<i>csc</i>	6,0	5,0	12,5	6,2	5,6	14,0

Производные продуцента фенилаланина DV1017 с генами *scr* и *csc* отличались по показателям на среде с сахарозой (Таблица 2). Для штамма DV1017*csc* продукция фенилаланина из сахарозы была в два раза ниже. Показатели штаммов DV1017*scr* и DV1017*csc* на среде с глюкозой были примерно одинаковы.

На сахарозе DV1017*csc* рос быстрее и меньше накапливал уксусной кислоты, в отличие от DV1017*scr*. Известно, что метаболизм природного *Suc*⁺-штамма *E. coli* W,

⁹ Bockmann J., H. Heuel, Lengeler J. W. Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132 // Molecular and General Genetics. – 1992. – V. 235. – P. 22-32.

¹⁰ Jahreis K., Bentler L., Bockmann J., Hans S., Meyer A., Siepelmeyer J., Lengeler J.W. Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132 // Journal of Bacteriology. – 2002. – V. 184. – №. 19. – P.5307-5316.

содержащего кластер *csc*, при росте на сахарозе сопровождался активацией цикла трикарбоновых кислот и низким накоплением уксусной кислоты.¹¹

Таблица 2 - Продукция *L*-фенилаланина в ферментации в аппаратах Biostat Q

Штамм	Источник	ОП ₅₄₀	Выход, %	Укс., г/л	μ, ч ⁻¹
DV1017	углерода				
<i>scr</i>	глюкоза	37±1	16±1	0,8±0,2	0,14
	сахароза	38±4	15,7±0,3	1,5±0,1	0,13
<i>csc</i>	глюкоза	36±1	15±2	1,1±0,4	0,14
	сахароза	35±4	8,2±0,5	0,4±0,2	0,18

Таким образом, было показано, что искусственно интегрированный кластер генов *scr*, наряду с кластером генов *csc*, обеспечивает получение продукции ароматических аминокислот из сахарозы. При использовании генов *csc* для некоторых штаммов наблюдалось снижение продукции аминокислоты на среде с сахарозой, по сравнению с глюкозой. Поскольку при культивировании на сахарозе метаболизм изменялся (о чём свидетельствовало, например, накопление уксусной кислоты), то для максимизации продукции аминокислот из сахарозы могла потребоваться дополнительная коррекция клеточного метаболизма.

2. Получение модельных продуцентов с помощью рекомбинационной инженерии

Рекомбинационная инженерия, основанная для *E. coli* на Red- системе фага λ и маркерах, удаляемых *in vivo*, позволяла получать штаммы с известной первичной структурой и требуемыми свойствами.

Для характеристики экспортёра ароматических аминокислот в работе были получены делеционные варианты лабораторного штамма MG1655 (GeneBank: U00096), продуцирующие Фен, Тир или Три. Все три ароматические аминокислоты (АА), как известно, синтезируются из общего предшественника – хоризмовой кислоты, образующейся в общем ароматическом пути (Рисунок 3). Если исходный штамм MG1655 не продуцировал АА, то после инактивации конкурирующего биосинтеза штаммы MG1655Δ*tyrA* и MG1655Δ*pheA* накапливали в культуральной жидкости Фен или Тир соответственно (Таблица 3). Инактивация транскрипционного регулятора общего ароматического пути *TyrR* снижала и повышала продукцию Фен и Тир в указанных штаммах. Различие в эффектах Δ*tyrR* на продукцию Тир и Фен, объяснялось регуляцией оперонов *pheL–pheA aroF–tyrA* в *E. coli*, в том числе и посредством транскрипционной интерференции¹² (Рисунок 4). Поскольку все делеции

¹¹ Arifin Y., Archer C., Lim S.A. et al. *Escherichia coli* W shows fast, highly oxidative sucrose metabolism and low acetate formation // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – V. 98. – №. 21. – P. 9033-9044.

¹² Hudson G.S., Davidson B.E. Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons of *Escherichia coli* K12 // Journal of Molecular Biology. – 1984. – V. 180. – №. 4. – P. 1023-1051.

Таблица 3 - Накопление Фен, Тир и Три в ферментации в пробирках

№	Штамм MG1655	АА, 0,125 г/л	ОП ₅₄₀	Фен, г/л	Тир, г/л	Три, г/л
1	–	–	30±3	<0,01	<0,01	<0,01
2	$\Delta tyrA^{1)}$	Тир	30±5	0,8±0,2	<0,01	<0,01
3	$\Delta pheA^{2)}$	Фен	29±2	<0,01	0,8±0,4	<0,01
4	$\Delta tyrR$	–	~ 30	<0,1	0,1-0,2	<0,01
5	$\Delta tyrA\Delta tyrR$	Тир	26±3	0,4±0,1	<0,01	<0,01
6	$\Delta pheA\Delta tyrR$	Фен	21±3	<0,01	2,5±0,5	<0,01
7	$\Delta tyrA\Delta trpR$	Тир	~ 25	~ 0.3	<0,01	<0,01
8	$\Delta trpR\Delta tnaA\Delta tyrA-pheA^{3)}$	Тир, Фен	30±1	<0,01	<0,01	0,8±0,2

¹⁾ – DV157; ²⁾ – DV683; ³⁾ – DV1060.

На примере получения продуцента гистидина было продемонстрировано конструирование штамма посредством последовательного комбинирования нескольких генетических модификаций (Дорошенко и др., 2013). В отличие от АА, конкурирующих друг с другом за общий предшественник, биосинтез гистидина из фосфорибозилпирофосфата (PRPP) и АТФ проходил по уникальному пути, где все реакции этого пути катализировались ферментами оперона *hisLGDCBNAFI* (Рисунок 5). Биосинтез регулировался гистидином на уровне активности первого фермента пути HisG (АТФ-фосфорибозилтрансферазы), по типу ретроингибирования, а также на уровне транскрипции *his* оперона – механизмом аттенуации транскрипции (Рисунок 6А).

Делецию аттенуатора, обозначенную как *hisL'*-Δ, получали в штамме MG1655⁺, который обладал улучшенными ростовыми характеристиками по сравнению с MG1655¹³. Для оптимизации экспрессии HisG использовали технологию трансляционного сопряжения, разработанную в АО «АГРИ»¹⁴ (Рисунок 6Б).

Для снятия ретроингибирования с АТФ-фосфорибозилтрансферазы использовали мутантный аллель *hisG* (E271K), кодирующий устойчивый к гистидину фермент HisG^{r15}. Продукция Гис начинала тестироваться только после введения

¹³ Бирюкова И.В., Крылов А.А., Киселёва Е.М. и др. Конструирование на основе *Escherichia coli* K-12 MG1655 нового штамма с улучшенными ростовыми характеристиками для экспериментов по метаболической инженерии // Генетика. – 2010. Т. 46. – №. 3. – С. 349-355.

¹⁴ Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю. и др. Новый метод конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами в бактериальной хромосоме // Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43. – № 3. – С. 547-557.

¹⁵ Аствацатурянц Г. В., Лисенков А.Ф., Смирнов Ю.В., Шакулов Р.С. Получение мутантов с нарушенным ретроингибированием биосинтеза гистидина // Генетика. – 1988. – Т. 24. – №. 10. – С. 1928-1934.

мутации *hisG^r* (Таблица 4). При комбинации *hisG^r* с *hisL'-Δ* продукция Гис возросла более, чем в 10 раз. Возрастание продукции коррелировало с увеличением устойчивой к гистидину активности АТР-фосфорибозилтрансферазы. Удельную активность HisG определяли в клеточных экстрактах штаммов MG1655⁺, MG1655⁺*hisL'-Δ* и MG1655⁺*hisG^rhisL'-Δ*. Для подтверждения относительного увеличения белков *his* оперона в клетке провели сравнительный анализ протеомных профилей штаммов с *hisL'-Δ* и без этой модификации (Рисунок 7). По результатам этого анализа было сделано заключение о возрастании количеств соответствующих белков в 10 (HisF) – 40 (HisD) раз (Таблица 5).

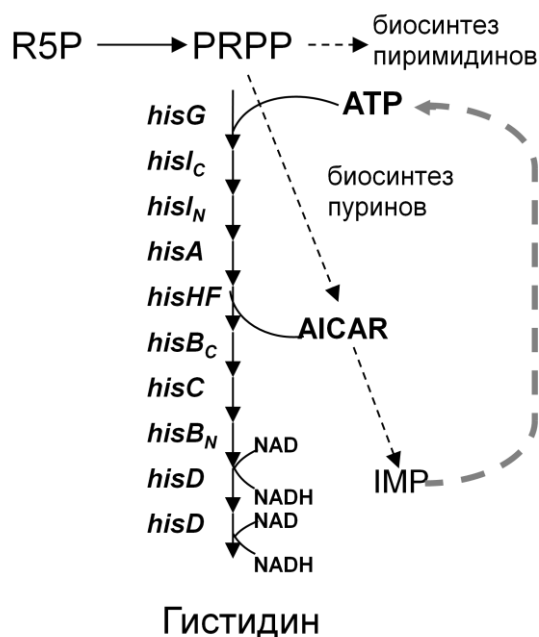


Рисунок 5 - Биосинтез гистидина и его связь с синтезом пуринов и пиримидинов в *E. coli*. Реакции обозначены, как продукты соответствующих генов *his*-оперона. Для бифункциональных ферментов нижние буквы С или N указывают какая часть фермента, карбоксильный или amino-конец, ответственна за данную реакцию. AICAR - 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид; IMP – инозин-5'-фосфат; R5P - рибозо-5'- фосфат.

До нашей работы мутации, нарушающие аттенуацию транскрипции *his* оперона, получали генетико-селекционным путем, отбирая мутанты, способные к росту в присутствии аналогов гистидина. Одна из удачных мутаций *hisO1242* (Рисунок 6А) приводила к возрастанию активности HisD в 15 раз¹⁶.

Штамм MG1655⁺*hisG^rhisL'-Δ* существенно снизил накопление биомассы по сравнению со своим предшественником MG1655⁺*hisG^r*, как при культивировании в ферментационной среде (Таблица 4, строка 4), так и при росте в среде M9 (Рисунок 7в). Добавление аденозина в ферментационную среду, которая исходно была лимитирована по пуринам, содержащимся только в дрожжевом экстракте,

¹⁶ Winkler M.E., Ramos-Montañez S. Chapter 3.6.1.9, Biosynthesis of Histidine / *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*; Böck A. et al. (eds). – ASM Press, Washington, DC. – 2009. – <http://www.ecosal.org>.

увеличивало накопление биомассы штамма MG1655⁺*hisG*^r*hisL*'-Δ. Для снижения зависимости от пуринов была введена делеция Δ*purR*, которая восстановила накопление биомассы при сохранении специфической продукции Гис на клетку (Таблица 4, столбец 5). Гипоксантин, образующийся из аденозина, являлся индуктором транскрипционного регулятора PurR, который регулирует биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, в том числе и синтез их общего с гистидином предшественника PRPP (Рисунок 5).

Полученный таким образом штамм MG1655*hisG*^r*hisL*'-ΔΔ*purR* (обозначен, как KF37) использовался коллегами из АГРИ для разработки подходов дальнейшего усовершенствования продуцента Гис¹⁷.

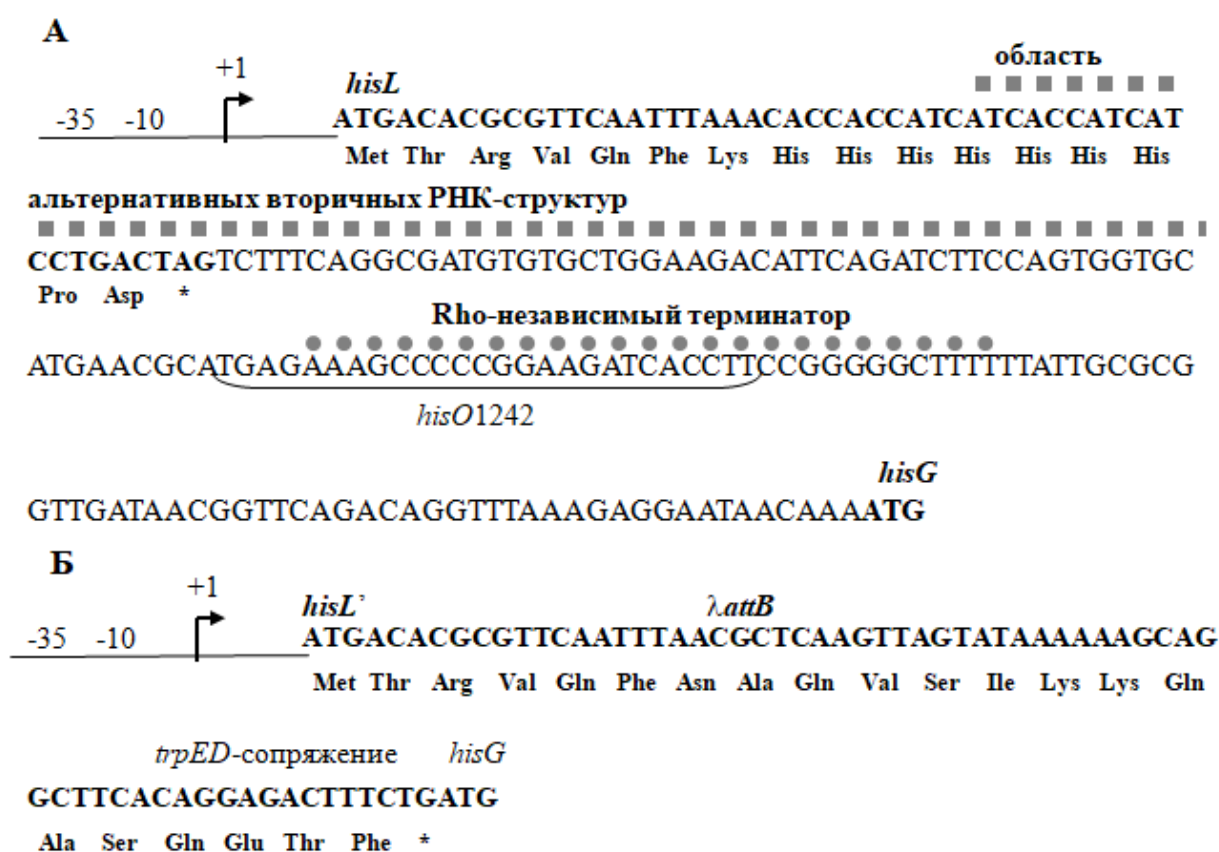


Рисунок 6 - ПС ДНК регуляторной области *his* -оперона *E. coli* (А) и её модификация (*hisL*'-Δ), полученная в работе (Б)

А: Делеция *hisO1242*, инактивирующая аттенуатор в *S. typhimurium*, отмечена скобкой.

Б: Технология трансляционного сопряжения включала соединение *hisG* с проксимальной частью *hisL*' (до гистидиновых кодонов) с использованием эффективного межцистронного сопряжения *trpED*. *λattB* остался после вырезания маркера *λattL*-Cm^r-*λattR*.

¹⁷ Malykh E.A., Butov I.A., Ravcheeva A.B. и др. Specific features of L-histidine production by *Escherichia coli* concerned with feedback control of AICAR formation and inorganic phosphate/metal transport // Microbial Cell Factories. – 2018. – V. 17. – №. 42. – <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0890-2>.

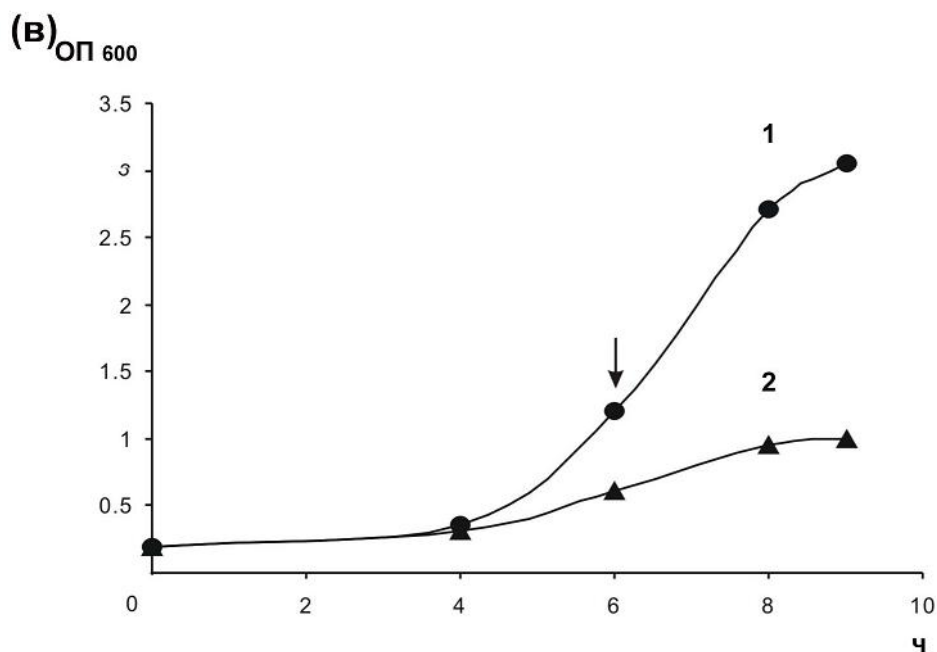
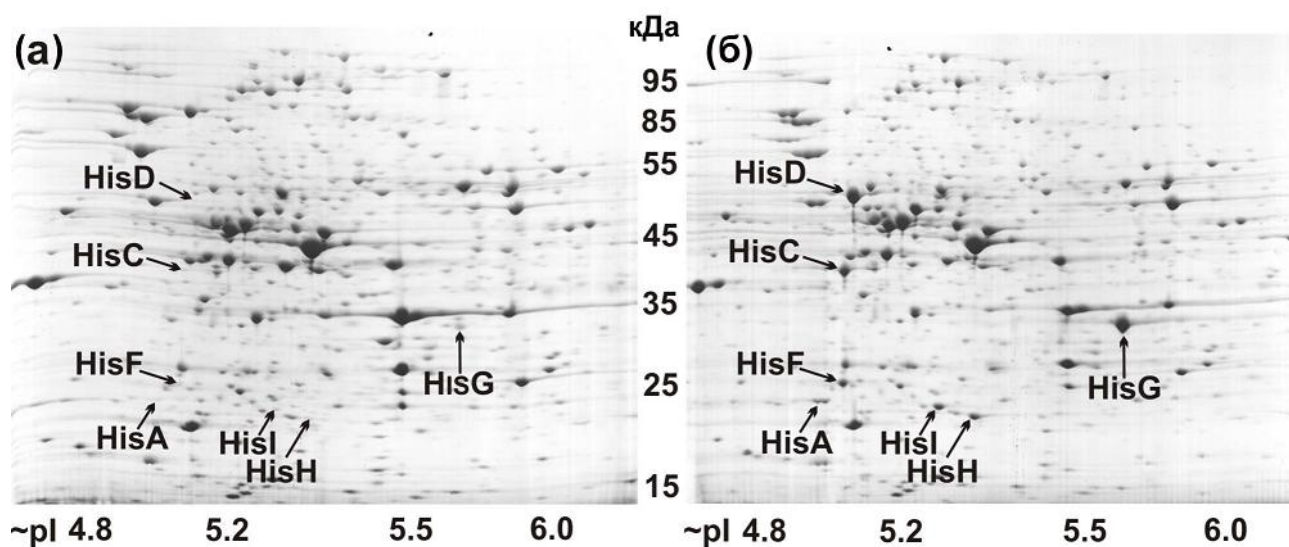


Рисунок 7 - Протеомные карты клеток MG1655⁺hisG^r (a) и MG1655⁺hisG^rΔhisL (б), отобранных в точке, указанной на кривых роста этих штаммов (в)

На (a) и (б) стрелками показаны пятна белков *his* оперона.

(в) Кривые роста MG1655⁺hisG^r (1) и MG1655⁺hisG^rΔhisL (2) на среде M9.

В качестве выводов к этой части работы следует отметить, что прецизионные модификации хромосомы (изменение нуклеотидной ПС), выполненные на основе данных о пути биосинтеза и его регуляции, подтверждали эти сведения своим эффектом на продукцию аминокислоты. В отличие от модельного продуцента гистидина, продуценты АА с реальной продукцией ~ 1 г/л были получены без использования соответствующих ферментов (PheA, TyrA, TrpDE) со снятым ретроингибированием. Таким образом, синтез гистидина в *E. coli* регулировался, в первую очередь, на уровне ретроингибирования первого фермента пути, тогда как синтез каждой из ароматических аминокислот из общего предшественника - хоризмовой кислоты регулировался не только ретроингибированием первого фермента пути, но и уровнем его синтеза.

Таблица 4 - Продукция *L*-гистидина в ферментации в пробирках

№	Генотип штамма MG1655 ⁺	Клетки, г/л	Гис, г/л	Спец. прод. Гис, мг/г сух. кл	Выход, %
1	–	18±2	< 0,05	–	–
2	<i>hisL</i> '-Δ	19±2	< 0,1	–	–
3	<i>hisG</i> ^r	11,3±0,8	0,2±0,1	20±10	0,5
4	<i>hisG</i> ^r <i>hisL</i> '-Δ	6±2	2,7±0,2	430±50	6,8
5	<i>hisG</i> ^r <i>hisL</i> '-Δ Δ <i>purR</i>	11±2	4,9±0,5	450±50	12,3

Таблица 5 - Относительные уровни белков *his* оперона (по результатам анализа протеомных профилей (Рисунок 3.5))

Штамм	Оптическая интенсивность пятен относительно всех пятен того же 2D-ПААГ						
	HisG	HisD	HisC	HisH	HisA	HisF	HisI
MG1655 ⁺ <i>hisG</i> ^r	0,15	0,05	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03
MG1655 ⁺ <i>hisG</i> ^r Δ <i>hisL</i> '-Δ	2,1	2,23	0,9	0,4	0,52	0,42	0,4

3. Повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт расширения его экспорта из клетки

К началу нашей работы над усовершенствованием продуцентов триптофана и фенилаланина В. А. Лившиц с сотrud. уже продемонстрировали, что амплификация генов *E. coli yddG* и *yedA* в составе плазмид pAYCTERYddG и pAYCTERYdeA повышает устойчивость клеток к аналогам фенилаланина и триптофана. Эти гены кодировали мембранные белки, паралоги уже охарактеризованного транспортёра аминокислот RhtA. Обе плазмиды pAYCTERYddG (Патент РФ 2222596) и pAYCTERYdeA (Патент РФ 2229513) повышали продукцию фенилаланина по сравнению с контрольным штаммом, содержащим вектор pAYCTER. Однако, плазида pAYCTERYdeA не давала устойчивого положительного эффекта на продукцию во всех штаммах, в отличие от pAYCTERYddG. Поэтому мы сосредоточились на исследованиях YddG.

3.1. Интеграция промотора P_L бактериофага λ перед геном *yddG* в хромосоме *E. coli* и свойства полученных штаммов

Для получения штамма, стабильно синтезирующего YddG, перед его геном в хромосоме интегрировали сильный промотор фага λ P_L , и его ослабленный вариант (P_{L1}) на случай, если интеграция промотора P_L оказалась токсичной для клетки. Ослабленный вариант P_{L1} соответствовал одноимённому основному промотору в составе P_L , но без UP(upstream promoter)-элемента, стимулирующего транскрипцию (Рисунок 8А).

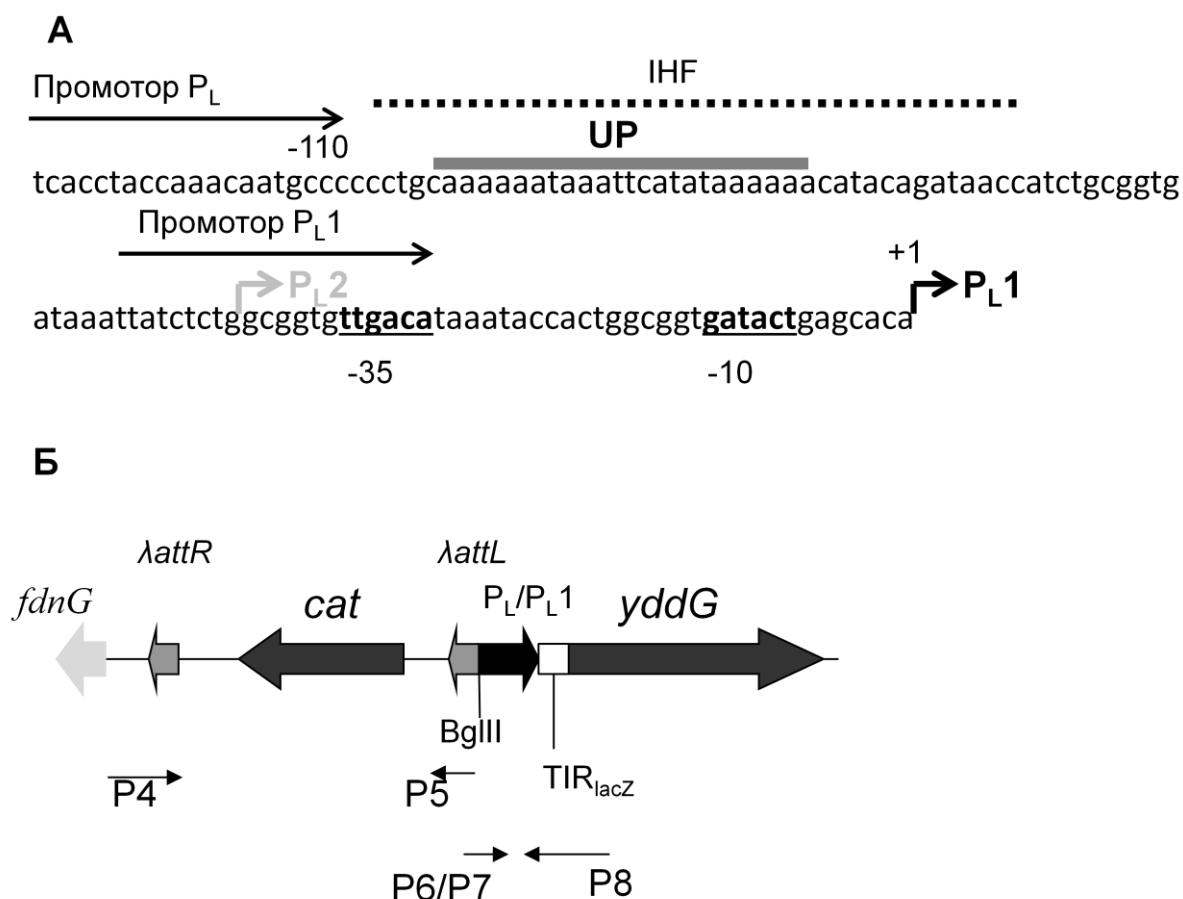


Рисунок 8 - Карта промотора P_L бактериофага λ (А) и структура участка хромосомы *E. coli* перед геном *yddG* после интеграции *attR-cat-attL- P_L / P_{L1}* (Б)

А: Обозначены: старты транскрипции основного и минорного промоторов P_{L1} и P_{L2} ; -10 и -35 сайты для P_{L1} ; область UP (upstream promoter)-элемента, стимулирующего транскрипцию; сайт узнавания INH (integration host factor), необходимого для функционирования UP-элемента. ПС олигонуклеотидов, использованных для амплификации ДНК-фрагментов с P_L и P_{L1} , обозначены стрелками.

Б: Показаны участки отжига олигонуклеотидов (P), использованных для получения фрагментов ДНК *attR-cat-attL- P_L* и *attR-cat-attL- P_{L1}* .

Промоторы были скомбинированы с областью инициации трансляции (TIR) мРНК гена *lacZ* *E. coli* (нетранслируемая ПС перед ATG-кодоном, включая ПС Шайна-Дальгарно, и, потенциально, трансляционный энхансер), которая должна была

повышать эффективность трансляции *yddG*. Фрагменты ДНК с промоторами, маркированными устойчивостью к хлорамфениколу (Рисунок 8Б), интегрировали в хромосому лабораторного штамма BW25113 с замещением примерно 110 н. перед *yddG*.

Полученные штаммы BW25113P_L-*yddG* и BW25113 P_{L1}-*yddG* не отличались по росту от BW25113, но характеризовались повышенной устойчивостью к *L*-Фен, причем у первого штамма она была выше (Рисунок 9А).

Увеличение транскрипции *yddG* анализировали с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Если транскрипт гена *yddG* дикого типа не тестировался, то препараты РНК из BW25113P_L-*yddG* и BW25113 P_{L1}-*yddG* после ОТ-ПЦР образовывали полосы разной интенсивности (после окрашивания бромидом этидия) в агарозном геле (Рисунок 9Б).

Модификация P_L-*yddG* была перенесена в продуцент триптофана SV164/pGH5 с помощью трансдукции фагом P1. Полученный штамм SV164P_L-*yddG*/pGH5 увеличил накопление Три примерно на 10% по сравнению с исходным SV164/pGH5 (Таблица 6) (Патент РФ 2229513).

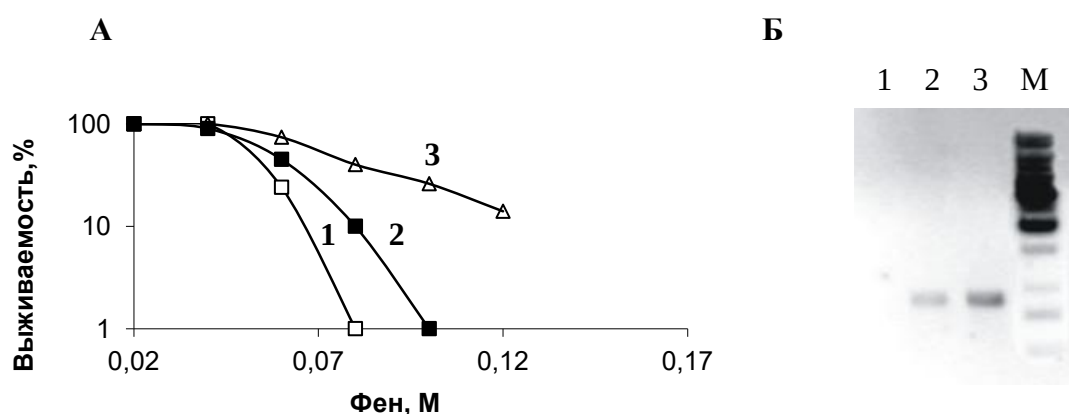


Рисунок 9 - Характеристика штаммов BW25113 (1), BW25113P_{L1}-*yddG* (2) и BW25113P_L-*yddG* (3) по устойчивости к Фен (А) и по уровню мРНК *yddG* с помощью ОТ-ПЦР (Б) М – маркеры (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, США).

Таблица 6 - Продукция *L*-Три в ферментации в пробирках

Штамм	ОП ₅₄₀	Три, г/л*
SV164/pGH5	7,8±0,5	3,7±0,2
SV164P _L - <i>yddG</i> /pGH5	7,9±0,7	4,1±0,3

* Усредненные значения восьми пробирок.

Ортолог YddG из *Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2 был охарактеризован как экспортёр метилвиологена (MV)¹⁸. Однако, штамм BW25113P_L-*yddG* оказался более чувствительным к этому соединению, чем исходный (Рисунок 10).

¹⁸ Santiviago C.A., Fuentes J.A., Bueno S.M. et al. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen // Molecular Microbiology. – 2002. – V. 46. – №. 3. – P. 687-698.

Чувствительность к MV могла быть обусловлена как различиями в свойствах YddG из этих бактерий, так и влиянием сверхэкспрессии *yddG* на соседние гены хромосомы. Ген *yddG* локализовался на 33,3 мин. ген. карты *E. coli* K-12 MG1655, в вариабельном у энтеробактерий локусе хромосомы (Рисунок 11). За геном *yddG* в хромосоме *S. enterica* LT2 следовал ген порина внешней мембраны OmpD, который по данным тех же авторов экспортировал MV совместно с YddG. В *E. coli* присутствовала только треть гена *ompD* (*ompD'*), которая кодировала нефункциональный белок. За *ompD'* в хромосоме *E. coli* находились открытые рамки считывания, которые отсутствовали в хромосоме LT2, но могли входить в единую с *yddG* транскрипционную единицу. Для избежания побочных эффектов от сверхэкспрессии соседних генов получили дополнительную копию *yddG* в хромосоме.

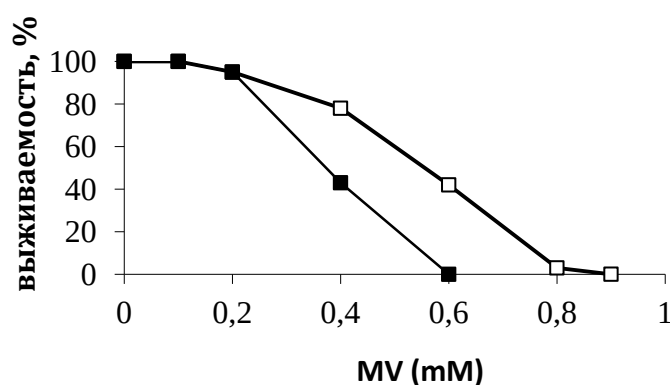
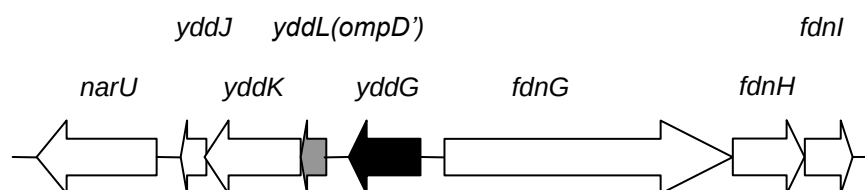


Рисунок 10 - Характеристика штаммов BW25113 (□) и BW25113P_{L-yddG} (■) по устойчивости к MV

А *E. coli* K12 MG1655



Б *S. enterica* LT2

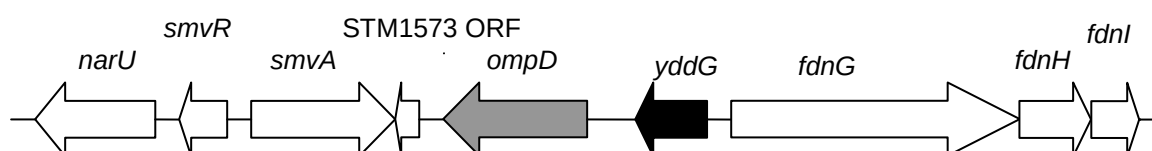


Рисунок 11 - Локусы хромосомы *E. coli* MG1655 (А; GeneBank:U00096) и *S. enterica* sv. Typhimurium LT2 (Б, GeneBank:NC003197), содержащие ген *yddG*

3.2. Характеристика штаммов *E. coli* с дополнительной копией гена *yddG* в хромосоме

Копии *yddG* в хромосоме MG1655 получали с помощью miniMu-интеграции. Первоначально *yddG* встраивали в виде молчащей копии. Для этого использовали промотор гена $\phi 10$ фага T7, узнаваемый T7 РНК-полимеразой, которая отсутствовала в клетках *E. coli*. Этот промотор был заменён на P_L в отобранном клоне MG1655 $P_{\phi 10}$ -*yddG* (DV033), рост которого на минимальной и богатой средах не отличался от исходного штамма MG1655. Точка интеграции miniMu- $P_{\phi 10}$ -*yddG* в DV033 была локализована в гене *htrE* (154.005 н. на физ. карте MG1655 (GeneBank:U00096)).

Штамм с активированной копией *yddG* (подтверждённой с помощью ОТ-ПЦР) был обозначен как DV036. Этот штамм характеризовался повышенной устойчивостью к Фен, аналогам Фен и Три по сравнению с MG1655 и DV033 (Таблица 7) (Doroshenko et al., 2007). Штамм с $\Delta yddG$ практически не отличался от MG1655 с геном *yddG* дикого типа. Делеция гена *yddG* в *E. coli* не сказывалась на устойчивости к MV, но DV036 оказался более чувствительным к MV. Таким образом, возросшая чувствительность к MV при сверхэкспрессии *yddG* в хромосоме была обусловлена свойствами YddG, а не местом локализации гена на хромосоме. Добавление каждой из ароматических аминокислот: Фен, Тир или Три (по 25 мкг/мл) в минимальную среду, содержащую MV, снижало негативный эффект MV. По нашему предположению неконтролируемый эффлюкс АА мог быть чувствительным для клеток DV036, вследствие повреждения транскетолазы. MV стимулировал образование супероксид радикала, который мог повреждать, в том числе, и этот фермент, ответственный за образование предшественника АА.

Таблица 7 - Устойчивость к Фен, аналогам Фен и Три, метилвиологену

Штамм	Модификация	МИК (мг/мл)				
		<i>L</i> -Phe	<i>DL-p-f</i> -Phe	<i>DL-o-f</i> -Phe	<i>DL-5-f</i> -Trp	MV
<i>E. coli</i>	<i>yddG</i>					
MG1655	–	14000	1500	50	0,2	20
DV064	$\Delta yddG$	14000	1500	50	0,1	20
DV036	<i>htrE::P_L-yddG</i>	>30000	3000	80	0,6	13
DV033	<i>htrE::P_{φ10}-yddG</i>	14000	1500	50	0,2	20

Проверка показала, что штамм *S. enterica* LT2 значительно более чувствителен к MV, чем MG1655. МИК MV для LT2 составляла всего 1 мг/мл в наших условиях тестирования. По-видимому, YddG не участвовал в экспорте MV из клеток *E. coli* на фоне более эффективного экспортёра EmrE, который отсутствовал у сальмонелл и который совместно с порином внешней мембраны OmpW обеспечивает устойчивость к четвертичным катионным соединениям, подобным MV¹⁹.

¹⁹ Beketskaia M. S., Bay D. C., Turner R. J. Outer membrane protein OmpW participates with small multidrug resistance protein member EmrE in quaternary cationic compound efflux // Journal of Bacteriology. – 2014. – V. 196. – №. 10. – P. 1908-1914.

YddG, подобно другим экспортёрам RhtA-типа, имел широкую субстратспецифичность. Положительные отличия в росте DV036, по сравнению с MG1655, тестировались в присутствии изолейцина, метионина и серина. Для подтверждения устойчивости к Мет проверили устойчивость DV036 к его аналогам норлейцину и Мет-сульфону (Таблица 8). Сверхэкспрессия гена *yddG* повышала устойчивость к норлейцину, тогда как мутация $\Delta yddG$ снижала устойчивость к этому аналогу. В случае Мет-сульфона наблюдались обратные эффекты. Вероятно, YddG экспортировал Мет и норлейцин, но не Мет-сульфон. Токсичный эффект последнего усиливался при сверхэкспрессии *yddG*, когда внутриклеточный пул Мет мог снижаться за счёт его активного выброса из клетки.

Таблица 8 - Устойчивость к Мет и его аналогам

Штамм <i>E. coli</i>	Модификация <i>yddG</i>	МИК (мг/мл)		
		L-Мет	Норлейцин	Мет-сульфон
MG1655	–	60	0.2	1.5
DV064	$\Delta yddG$	60	0.15	1.6
DV036	<i>htrE::P_L-yddG</i>	>60*	0.35	1.2

* 60 мг/мл является предельно растворимой концентрацией метионина в среде M9.

3.3. Репеллентные свойства *DL-p-f-Phe* для *E. coli* с *P_L-yddG*

Клеточные суспензии штаммов с *P_L-yddG* образовывали пятна большей площади при росте на среде с *DL-p-f-Phe*, чем штаммы MG1655, BW25113 и BW25113 $\Delta htrE::Cm^r$ (Рисунок 12). Клетки, выделяющие *DL-p-f-Phe*, разрастались по поверхности агара, вероятно, в результате взаимного отталкивания. Это наблюдение наглядно демонстрировало участие YddG в экспорте *DL-p-f-Phe*. Такой условной повышенной подвижностью обладал и штамм MG1655 $P_L-yddG\Delta yddL-yddJ$, в котором были удалены три открытые рамки, следующие за геном *yddG* в хромосоме и, предположительно, входящие в ту же транскрипционную единицу (Рисунок 11). Таким образом, белковые продукты этих генов не являлись необходимыми для функционирования YddG.

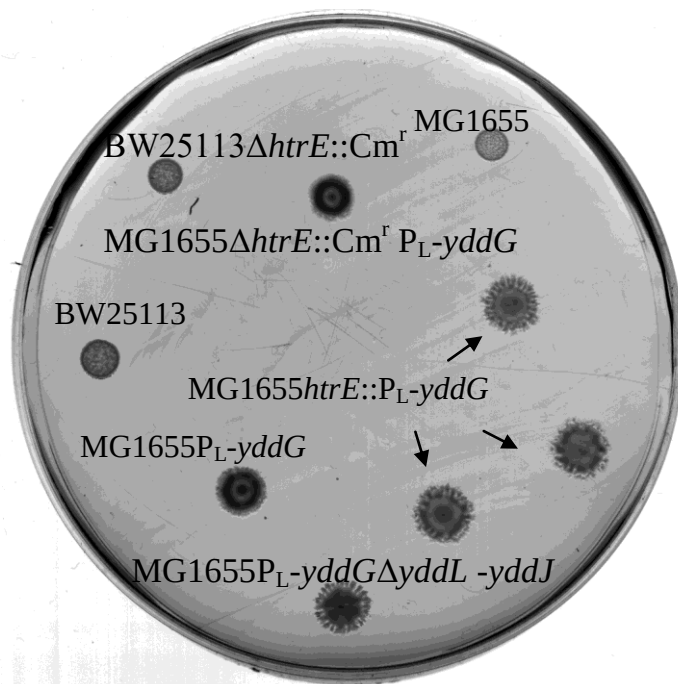


Рисунок 12 - Фотография чашки со средой M9 (агар ~ 1,2 %), содержащей 250 мг/л DL-*p*-f-Phe

3.4. Увеличение продукции ароматических аминокислот в результате сверхэкспрессии *yddG* в штаммах-продуцентах

Культивирование штамма DV036 в минимальной среде M9 не сопровождалось накоплением аминокислот в культуральной жидкости в количествах, которые мы могли достоверно определять. Поэтому для тестирования увеличения выброса АА из клеток, содержащих *P_L-yddG*, были использованы продуцирующие эти аминокислоты штаммы, которые сравнивали по накоплению АА в культуральной жидкости в пробирочной ферментации (Рисунок 13) (Doroshenko *et al.*, 2007). Модификации гена *yddG*: *htrE::P_{T7}-yddG*, *htrE::P_L-yddG*, *ΔyddG* были введены в модельные продуценты Тир, Три, Фен. Инактивация *yddG* снижала продукцию всех АА: фенилаланина – на 40%, тирозина – на 10%, триптофана – менее, чем на 10%. В то же время введение *htrE::P_L-yddG* привело к значительному увеличению продукции: Фен и Тир – в три раза, Три – в полтора раза. Сниженный эффект на продукцию Три объяснялся следующими обстоятельствами. Продуцент Три был ауксотрофом по Фен и Тир, добавление которых в среду ингибировало основные ДАНР-синтазы *E. coli* и, соответственно, поток углерода в общий ароматический путь. Кроме того, антранилатсинтаза ингибировалась Три при более низких концентрациях, чем PDT и PDH ингибировались Фен и Тир соответственно²⁰.

Для штамма с *P_L-yddG* (DV666) ускоренное накопление внеклеточного Фен коррелировало со снижением его концентрацией внутри клетки по сравнению со штаммом DV157, содержащим ген *yddG* дикого типа (Рисунок 14) (Doroshenko *et al.*, 2007).

²⁰ Pittard J., Yang J. Biosynthesis of aromatic amino acids // *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, 3rd edn.; Section editor: W. Hatfield. – 2008. – DOI: 10.1128/ecosal.3.6.1.8

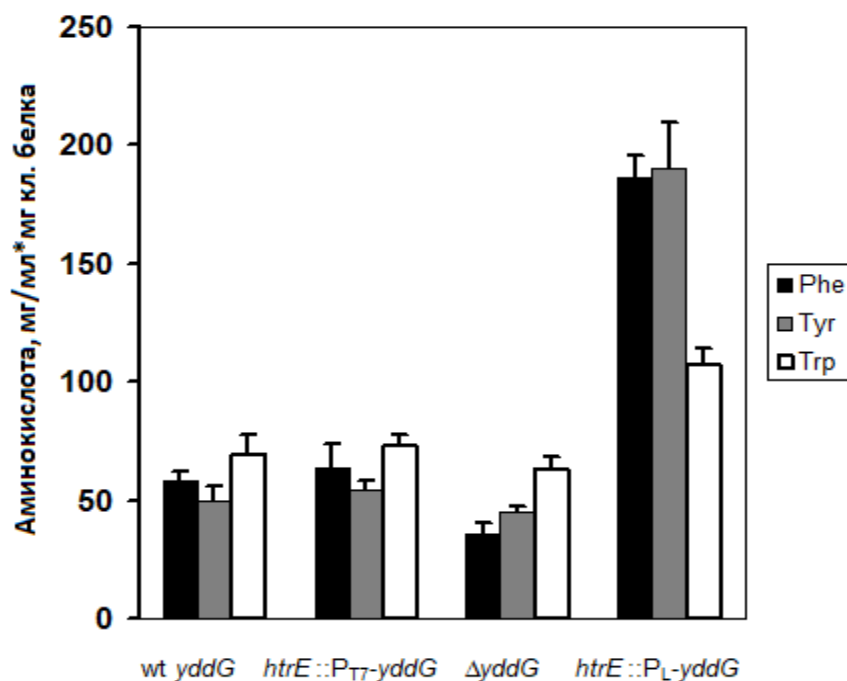


Рисунок 13 - Накопление Фен, Тир и Три в культуральной жидкости в ферментации в пробирках для штаммов *E. coli*, продуцирующих Фен (DV157), Тир (DV683), и Три (DV1060) и их производных, содержащих различные аллели *yddG* (указаны ниже диаграммы) Представлены средние значения трёх экспериментов.

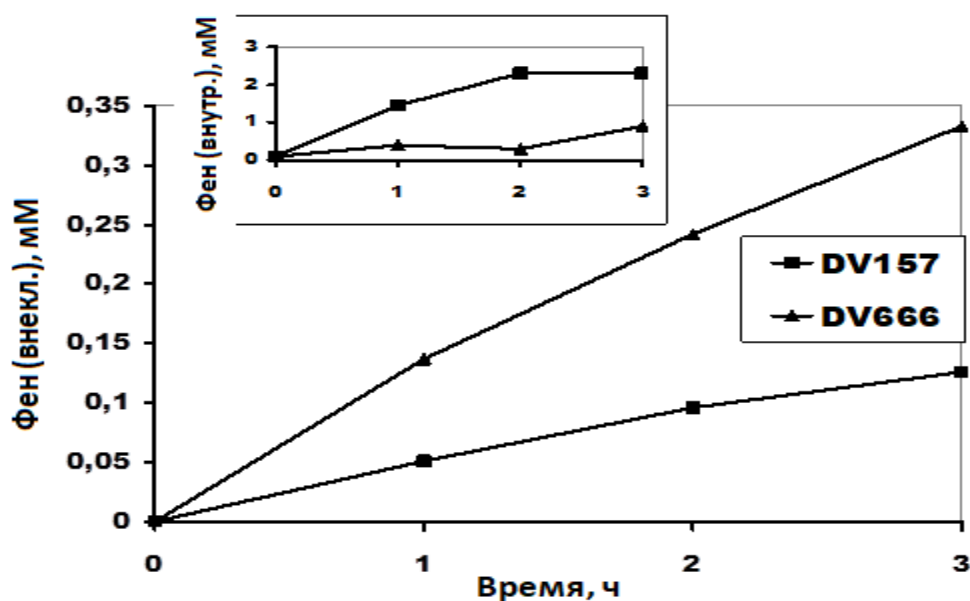


Рисунок 14 - Временные изменения вне и внутриклеточных концентраций Фен для продуцентов, содержащих ген *yddG* дикого типа (DV157) и *P_L-yddG* (DV666)

3.5. Сравнение протеомов штаммов с *P_L-yddG* и без этой модификации

Для анализа последствий, вызванных введением модификации *P_L-yddG*, провели сравнительный анализ протеомов продуцентов Фен DV157 и DV666, не содержащего

и содержащего эту модификацию. Штаммы для отбора проб культивировали в периодической ферментации (Таблица 9). Увеличение продукции Фен (на 30-60%) для штамма DV666 коррелировало с возрастанием продуктивности, т.е. продукции в единицу времени, так как общее время культивирования, продолжающееся до окончания потребления глюкозы, сократилось.

В пробах, отобранных на 5 и 15 часов культивирования, анализировали цитоплазматические белки, относительное содержание которых в клетках штамма DV666 возросло по сравнению с DV157 (Рисунок 14). Увеличения относительных количеств ферментов пути биосинтеза фенилаланина не было зафиксировано.

Таблица 9 - Влияние сверхэкспрессии гена *yddG* на продукцию Фен из глюкозы (50 г/л) (Ферментацию проводили в аппаратах Biostat Q (Германия).)

Штамм	№ аппарата	ОП540	Время культ., ч	Фен, г/л	Выход, %
DV157	1	10,4	20,95	0,7	1,6
	2	10,8	20,35	0,7	1,6
DV666	3	9,8	20,65	0,9	2,0
	4	9,5	19,8	1,1	2,4



Кислотный стресс	ЦТК	Оксид. стресс	Утил. азота	Транскрипция, трансляция	Стресс	Гол. по Рі
------------------	-----	---------------	-------------	--------------------------	--------	------------

Рисунок 14 - Сравнительный анализ протеомов штаммов DV157 и DV666, культивированных в периодической ферментации (Таблица 9: апп. № 2, 4)

В клетках штамма DV666 произошли изменения, свидетельствующие о кислотном стрессе: активировался синтез аргинина и лизина, которые могли декарбоксилироваться соответствующими Arg и Lys-зависимыми кислотоустойчивыми системами; активировался протонный насос цепи переноса электронов, кодируемый *nuo* опероном. Поскольку YddG, по аналогии с другими родственными переносчиками, должен был работать как антипортер протонов, то эффлюкс фенилаланина мог сопровождаться накоплением H^+ в цитоплазме. Усиление респираторного комплекса повлекло за собой активацию цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), активацию ответа на оксидативный стресс. Изменения, наблюдаемые в штамме DV666, можно было классифицировать как последствия более активного метаболизма, приводящего к накоплению Фен. Увеличение продукции Фен в штамме DV666 привело к активации утилизации азота. В клетках штамма DV666 раньше наступало голодание по неорганическому фосфору, увеличилось относительное содержание некоторых белков, связанных с трансляцией и транскрипцией.

Таким образом, наблюдаемые различия протеомов отвечали более высокой приспособленности штамма DV666 к условиям продукции Фен и, в целом, характеризовали более активный метаболизм последнего.

3.6. Молекулярно-генетическая характеристика YddG

Ген *yddG* транскрибировался с собственного промотора, который был охарактеризован (Рисунок 15) (Цыренжапова и др., 2009). Области «-10» и «-35» промотора были картированы относительно экспериментально определённого старта транскрипции. Неоптимальный спейсер между ними (18 нуклеотидов), вырожденная область «-35», а также наличие С в позиции «-13» были характерны для промоторов *E. coli*, которые узнавались РНК-полимеразой в комплексе как с σ^{70} , так и с σ^{S21} .

На электрофореграмме (Рисунок 15А) выше зоны основного транскрипта *yddG* были зафиксированы дополнительные полосы, которые свидетельствовали об образовании транскриптов разной длины. Известно было, что они появляются в результате проскальзывания РНК (slippage effect) без транслокации матричной ДНК в активном центре РНК-полимеразы. «Слипадж эффект», приводящий к повторной транскрипции подтверждался наличием гомополимерных трактов из Т нуклеотидов в районе старта транскрипции (Рисунок 16Б). По аналогии с регуляцией *purB*-оперона *E. coli*²² мы предположили, что экспрессия гена *yddG* может контролироваться с помощью «слипадж эффекта» или повторной транскрипции. Избыток уридинтрифосфатов (УТР) в клетке (при росте на богатой среде, например) мог приводить к удлинению уридинового тракта в 5'-мРНК *yddG* из-за повторной транскрипции. Как известно, транскрипты, удлинённые с использованием УТР, с большой вероятностью высвобождаются из комплекса инициации транскрипции²².

²¹ Typas A., Hengge R. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in σ^S promoter selectivity in *Escherichia coli* // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 59. – №. 3. – P. 1037-1051.

²² Turnbough C.L. Regulation of gene expression by reiterative transcription // Current Opinion in Microbiology. – 2011. – V. 14. – №. 2. – P. 142-147.

Ген *yddG* экспрессировался на низком уровне, что было показано с помощью конструирования гена гибридного белка YddG-LacZ в месте природной локализации *yddG* в хромосоме *E. coli*. В гибридной конструкции *yddG'*-*lacZ* к первым 15 нуклеотидам *yddG* была присоединена последовательность *lacZ* без ATG-кодона. Активность β -галактозидазы в полученном штамме MG1655 Δ *lacZyddG'*-*lacZ* (~100 ЕМ) была в 5 и 25 раз ниже активности LacZ в штамме MG1655 без индукции и в условиях индукции ИПТГ (~3000 ЕМ) соответственно. В условиях конститутивной экспрессии, т.е. без индукции, контрольный штамм имел максимальную активность β -галактозидазы на среде LB, тогда как исследуемый – максимальную активность на среде M9 с глюкозой. Ген *yddG* индуцировался в 1,5 раза при росте клеток MG1655 на минимальной среде. Этот факт согласовывался с регуляцией *yddG* посредством «слипадж эффекта».

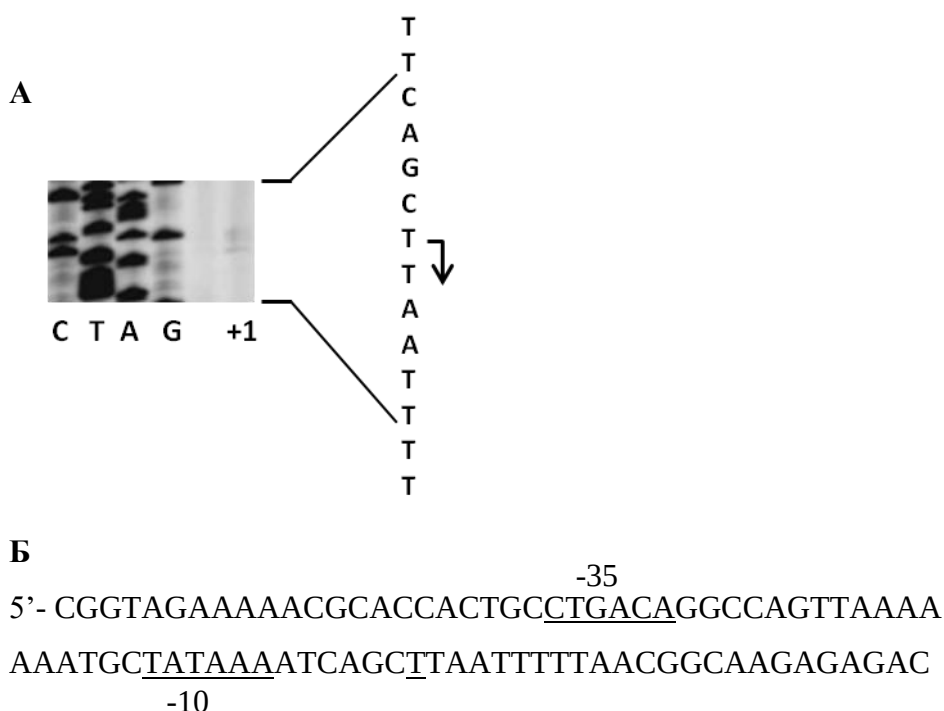


Рисунок 15 - Картирование промотора гена *yddG*

(А) Определение сайта инициации транскрипции методом «удлинения олигонуклеотидной затравки».

(Б) ПС промотора *yddG* (нематричная цепь). Области «-35», «-10» и старт транскрипции подчеркнуты.

Топология YddG в мембране *E. coli* была определена экспериментально сотрудниками нашей группы Айрих Л.Г. и Цыренжаповой И.С. (Airich et al., 2010). Проведённое исследование, подтверждающее наличие 10 трансмембранных (ТМ) сегментов подробно описано в кандидатской диссертации Цыренжаповой И.С. Топология YddG исследовалась с помощью получения гибридных генов P_{lac} -*yddG'*-*blaM* и P_{lac} -*yddG'*-*ZsGreen* в векторе pBR322, где укороченные варианты разной длины обозначены как *yddG'*. Гибридные белки в мембранной фракции визуализировали с помощью иммуноблотинга с моноклональными антителами к β -лактамазе и с поликлональными антителами к флуоресцентным белкам рифовых

кораллов соответственно. Несмотря на то, что все гибридные белки детектировались в мембранной фракции, только гибрид полноразмерного YddG с ZsGreen был активным. Т.е. плазида, кодирующая этот гибридный ген, сообщала клеткам устойчивость к L-Фен. После получения кристаллической структуры YddG из *S. novella*²³ стала ясна причина отсутствия активности укороченных вариантов YddG. Переносчик YddG имел форму корзины, для формирования которой необходимы были все ТМ сегменты. В частности, полость переносчика, по которой перемещался субстрат, образовывали 6 из 10 ТМ сегментов. С целью усовершенствования YddG Айрих Л.Г. были отобраны мутации в остатке G26, которые характеризовались ускоренным накоплением L-Три и L-Фен в культуральной жидкости (Патент РФ 2530171). Согласно современной модели YddG остаток G26 локализуется в районе выходного отверстия YddG в периплазму и, по нашему предположению, его изменения могут быть существенны для последующего транспорта гидрофобных молекул через периплазму.

Таким образом, было показано, что возрастающую токсичность фенилаланина в ферментации можно преодолевать с помощью тюнинга гена *yddG* в хромосоме. Ген *yddG*, экспрессирующийся исходно на низком, плохо детектируемом уровне, кодирует переносчик, который может осуществлять эффлюкс L-Фен из клетки в условиях суперпродукции последнего.

Ген *yddG* был одним из первых генов кишечной палочки, манипуляции с экспрессией которого проводили непосредственно в хромосоме. Впоследствии такой подход стал активно применяться в АО «АГРИ» для других генов (Патенты РФ 2268305; 2333953) и оптимизирован Ж. Каташкиной (Каташкина Ж.И. и др., 2005).

4. Получение продуцента фенилаланина *Tyr*⁺, не накапливающего тирозин

Для получения штаммов, не нуждающихся в Тир, необходимо было ослабить активность хоризматмутазы/префенатдегидрогеназы (PDH), кодируемой геном *tyrA*. Для этой цели был выбран С-концевой программируемый протеолиз, на тот момент уже изученный.

Для проверки функциональности PDH в присутствии SsrA-хвоста, ген *tyrA* был удлинен нуклеотидной ПС, кодирующей AANDENYALAA в штамме MG1655Δ*tyrR* (Рисунок 17).

Штамм MG1655Δ*tyrRtyrA-ssrA* продуцировал Фен на среде без добавления Тир и не накапливал Тир в количествах, которые могли бы тестироваться. (Таблица 10) (Патент РФ 2264459).

Для варьирования активности *TyrA* в продуценте Фен, были получены аллели гена *tyrA*, меченные модифицированными *ssrA*-концами, обозначенные далее как *ssrA'* (Рисунок 18А). Аллели *tyrA-ssrA'* получали в штамме BW25113 с одновременной делецией гена *pheA*, кодирующего чувствительную к Фен хоризматмутазу/префенатдегидратазу (Рисунок 18Б).

²³ Tsuchiya H., Doki S., Takemoto M. et al. Structural basis for amino acid export by DMT superfamily transporter YddG // Nature. – 2016. – V. 534. – №. 7607. – P. 417-420.

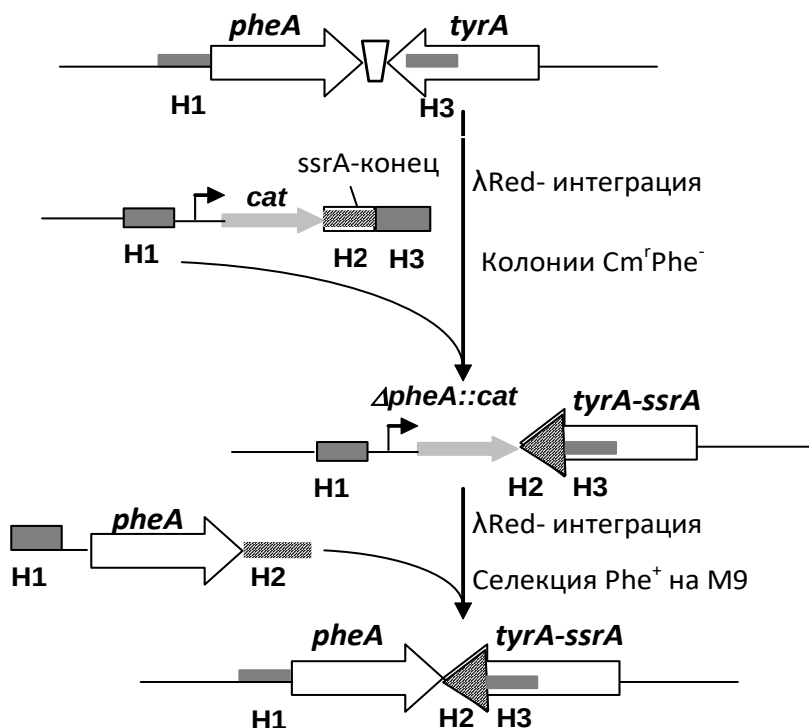


Рисунок 17 - Схема получения *tyrA-ssrA* в хромосоме MG1655Δ*tyrR*
Области гомологии для рекомбинации, обозначенные как H1 – H3, были заложены в ПС праймеров, которые использовались для получения фрагментов ДНК.

Таблица 10 - Накопление аминокислот в ферментации в пробирках

Штамм	OD ₅₄₀	Фен, г/л	Тир, г/л
MG1655Δ <i>tyrR</i>	28,5 ± 0,6	0,017 ± 0,002	0,13 ± 0,01
MG1655Δ <i>tyrR tyrA-ssrA</i>	26,3 ± 0,4	0,46 ± 0,04	<0,01

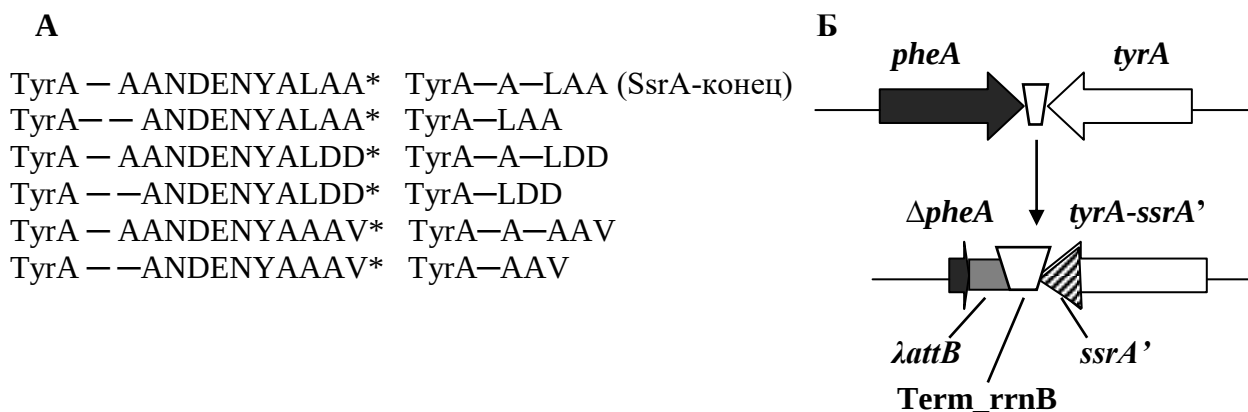


Рисунок 18 - Модификации SsrA (SsrA') на C-конце TyrA (А) и схема, демонстрирующая изменения локуса *pheA-tyrA* в хромосоме *E. coli* (Б)
При получении *tyrA-ssrA'* природный терминатор после гена *tyrA* был заменён на терминатор *rrnB*, ген *pheA* инактивирован. *λattB* остался после вырезания маркера.

По росту на минимальной среде М9 с Фен, но без Тир штаммы BW25113 Δ *pheA* *tyrA-ssrA'* можно было разделить на три группы: растущие, как BW25113 Δ *pheA*; слабо растущие штаммы (с TyrA-A-LAA и с TyrA-A-AAV), и промежуточный по росту штамм с TyrA-LAA (Рисунок 19) (Doroshenko *et al.*, 2010a).

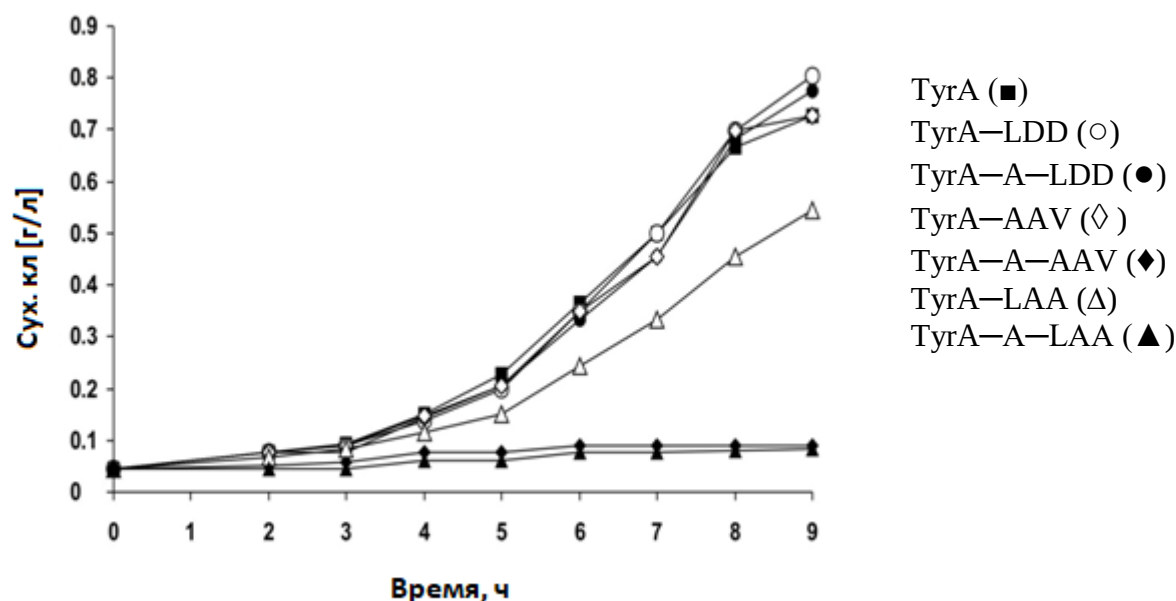


Рисунок 19 - Рост штаммов BW25113 Δ *pheA* и BW25113 Δ *pheA* *tyrA-ssrA'* в минимальной среде М9 с Фен (37°C, 240 об/мин)

Для подтверждения изменений в белках TyrA-SsrA' определяли их PDH-активность (Таблица 11). Активность снижалась по мере восстановления ПС SsrA-хвоста. Особенно это было заметно по PDH-активности клеточных экстрактов, приготовленных без глицерина, который, как известно, способствует поддержанию конформационной стабильности ферментов. При этом активность TyrA-A-LAA не определялась даже в присутствии глицерина.

Таблица 11 - Активность PDH в клеточных экстрактах производных штамма BW25113 Δ *pheA*

Продукт <i>tyrA-ssrA'</i>	Активность (нМ/мин мг), в присутствии		
	1% глицерина	—	—
	—	—	50 мкМ L-Тир
TyrA ^{wt}	31	29	9
TyrA-LDD	32	28	6
TyrA-A-LDD	28	9	не опред.
TyrA-LAA	20	<1	не опред.

Таким образом, SsrA'-хвост, по мере приближения к оригиналу, способствовал увеличению структурной нестабильности белка, по-видимому, из-за ускорения его протеолиза.

Гены, кодирующие TyrA, TyrA-LAA, TyrA-A-LAA, TyrA-LDD и TyrA-A-LDD, были введены в продуцент Фен DV269, который изначально был тирозиновым ауксотрофом ($\Delta tyrA$). Полученные штаммы тестировали в периодической ферментации на комплексной среде, содержащей Тир только в составе дрожжевого экстракта. Новые штаммы сравнивали со штаммами $\Delta tyrA$, TyrR⁺ и TyrR⁻: DV269 и DV269 $\Delta tyrR$ (Рисунок 20) (Doroshenko et al., 2010a).

Последние штаммы культивировали на такой же комплексной среде, что и штаммы TyrA-SsrA', но с добавлением 0,125 г/л Тир. Все штаммы с TyrA-SsrA' практически не накапливали Тир ($\leq 0,1\%$ от продукции Фен) по сравнению со штаммом TyrA⁺ (Таблица 12).

Штамм DV269TyrA-LAA (обозначен как DV1017) синтезировал в 1,5 раза больше Фен, чем DV269, что соответствовало продукции Фен штаммом DV269 $\Delta tyrR$. По-видимому, в клетках DV1017 подобрался оптимальный уровень синтеза тирозина, который сбалансировал накопление биомассы и TyrR-опосредованную репрессию, что привело к увеличению продукции фенилаланина.

Таким образом, результатом этой части работы явилась разработанная стратегия получения продуцента Фен, не нуждающегося в тирозине.

Таблица 12 - Примесь Тир для производных DV269, содержащих различные аллели *tyrA*

Аллель	TyrA	TyrA-LAA	TyrA-A-LAA	TyrA-LDD	TyrA-A-LDD
Тир, мг/л	50 $\pm$ 10	4 $\pm$ 2	< 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2
Tyr/Phe, %	1,3	0,06	<0,04	0,1	0,1

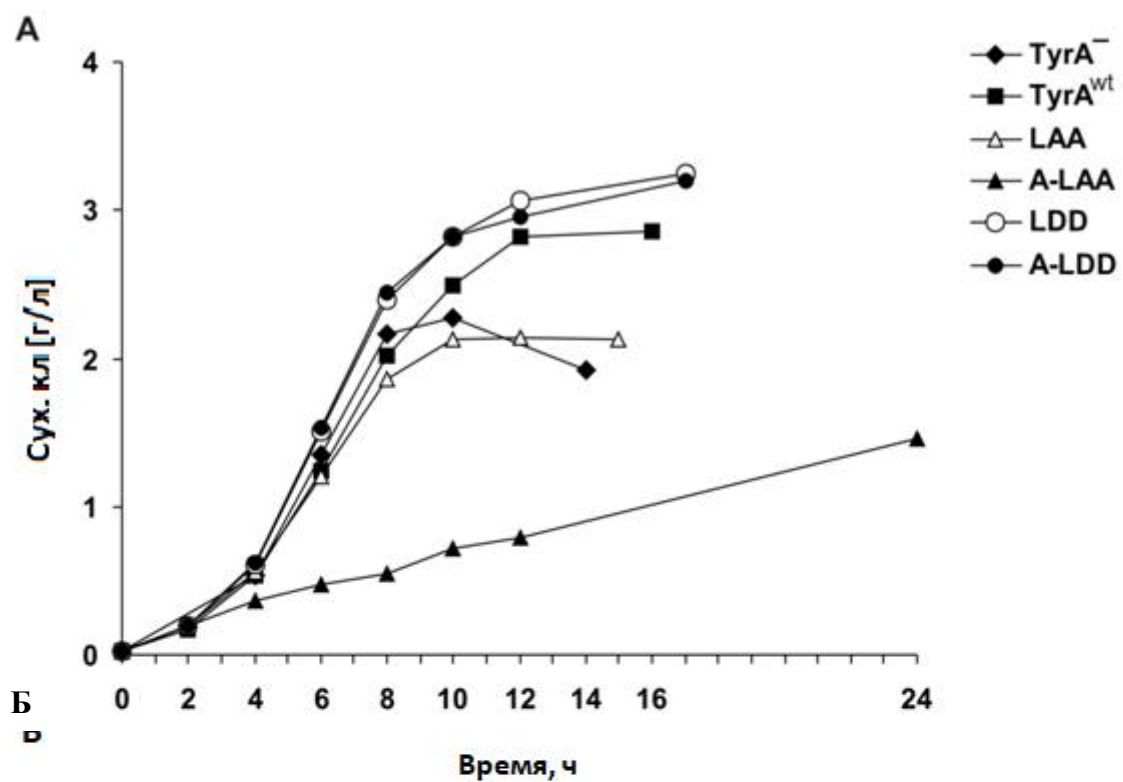


Рисунок 20 - Накопление биомассы (А) и продукция Фен (Б) в ферментации в аппаратах Biostat Q для штаммов $\Delta tyrA$: DV269 $\Delta tyrR$ (TyrR⁻) и DV269 (TyrR⁺); производных DV269, содержащих различные аллели *tyrA-ssrA'*, а так же *tyrA*

5. Исследование достаточности восстановленного флавина для хоризматсинтазы *E. coli* при продукции *L*-фенилаланина

Хоризмат-синтаза (CHS) *E. coli* (ген *aroC*), катализирующая последнюю реакцию общего ароматического пути (Рисунок 3), имела абсолютную зависимость от восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH₂), являющегося крайне нестабильным соединением. В отличие от монофункциональной CHS кишечной палочки бифункциональная CHS *Saccharomyces cerevisiae* (ген *ARO2*) восстанавливала флавин с использованием NADPH. Нами было сделано предположение, что FMNH₂ может быть в дефиците в клетках *E. coli*, продуцирующих Фен, и использование бифункционального фермента может привести к увеличению продукции последнего (Слесарёва и др., 2017).

Для гетерологичной экспрессии в кишечной палочке ген *ARO2* был химически синтезирован с заменой редких для *E. coli* кодонов. Экспрессию синтезированного гена *ARO2* с оптимизированными для *E. coli* кодонами тестировали в системе T7, используя вновь полученную плазмиду pET-*ARO2*, где этот ген был подставлен под промотор гена $\phi 10$, узнаваемый РНК-полимеразой фага T7. В дальнейшем область инициации трансляции *ARO2* из pET-*ARO2* (TIR $_{\phi 10T7}$) была использована для экспрессии этого гена, интегрированного в хромосому, под контролем промотора P_{tac}.

Субстрат для хоризмат-синтазы не являлся коммерчески доступным веществом, но он мог нарабатываться в клетке. Поэтому функциональность фермента *ARO2*, синтезирующегося в клетках *E. coli*, проверяли *in vivo*. Структурная часть гена *ARO2* была интегрирована в хромосому штамма TG1 Δ *aroC* в природный сайт *attB* фага $\phi 80$. Использовалась разработанная в АО «АГРИ» методика «Dual In/Out»²⁴. Для контроля аналогичным образом была проведена интеграция *aroC*. Полученные штаммы, изначально содержащие гены хоризмат-синтаз без промоторов, начинали расти на среде M9 после интеграции промотора P_{tac} перед генами *ARO2* и *aroC*. В штаммах TG1 Δ *aroC* $\phi 80attL$ -P_{tac}-*ARO2*- $\phi 80attR$ (TG1 Δ *aroC*P_{tac}-*ARO2*) и TG1 Δ *aroC* $\phi 80attL$ -P_{tac}-*aroC*- $\phi 80attR$ (TG1 Δ *aroC*P_{tac}-*aroC*) обе конструкции комплементировали функцию AroC без добавления ИПТГ. Штамм TG1 Δ *aroC*P_{tac}-*ARO2* (0,46 /ч) имел более высокую скорость роста по сравнению с TG1 (0,41 /ч) и TG1 Δ *aroC*P_{tac}-*aroC* (0,36 /ч). Белки *ARO2* и AroC из клеточных экстрактов TG1 Δ *aroC*P_{tac}-*ARO2* и TG1 Δ *aroC*P_{tac}-*aroC* анализировали с помощью SDS-ПААГ, проводя идентификацию соответствующих белковых зон с помощью MALDI-TOF. Поскольку *ARO2* был виден только в экстрактах клеток, индуцированных ИПТГ, в отличие от AroC, обнаруженного в клетках, выращенных как с ИПТГ, так и без него, было сделано заключение, что экспрессия гена *ARO2* была слабее, чем гена *aroC*. Такой вывод подтвердился количественной оценкой эффективности трансляции с помощью UTR Designer²⁵. Этот *in silico* метод предсказал в четыре раза более высокую трансляцию TIR $_{\phi 10T7}$ -*aroC* по сравнению с TIR $_{\phi 10T7}$ -*ARO2*.

²⁴ Minaeva N.I., Gak E.R., Zimenkov D.V. et al. Dual in/out strategy for genes integration into bacterial chromosome: a novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant *E. coli* strains with predesigned genome structure // BMC Biotechnology. – 2008. – №. 8. – V. 63. – DOI: 10.1186/1472-6750-8-63.

²⁵ Seo S.W., Yang J.-S., Kim I. et al. Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency // Metabolic Engineering. – 2013. – V. 15. – P. 67-74.

5.1. Сравнение двух типов хоризмат-синтаз в продуцентах фенилаланина DV1017 и DV1017 Δ tyrR

Полученные хромосомные модификации P_{tac}-ARO2 и P_{tac}-aroC полностью восстанавливали продукцию Фен в штамме DV1017 Δ aroC (Таблица 13). Новые штаммы DV1017 Δ aroCP_{tac}-aroC и DV1017 Δ aroCP_{tac}-ARO2 увеличили накопление биомассы на 6 - 9% по сравнению со штаммом DV1017 и это, вероятно, произошло из-за увеличения синтеза Тир, как примеси. Предположительно, активность хоризмат-синтазы не являлась узким местом биосинтеза Фен в штамме DV1017, т.к. продукция Фен в новых штаммах, практически не увеличилась. Клеточная флавинредуктазная активность могла быть достаточной для хоризмат-синтазы AroC, и использование бифункциональной хоризмат-синтазы ARO2 не давало преимуществ.

Таблица 13 - Накопление Фен (основной продукт) и Тир (примесь) в ферментации в аппаратах Biostat Q

№	Штамм	ОП _{540нм}	Фен, г/л	Тир, мг/л
1	DV1017	32 $\pm$ 2	6,6 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 2
2	DV1017 Δ aroC	13 $\pm$ 2	<0,02	<0,02
3	DV1017 Δ aroC P _{tac} -aroC	34 $\pm$ 2	6,8 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 2
4	DV1017 Δ aroC P _{tac} -ARO2	35 $\pm$ 2	6,7 $\pm$ 0,5	9 $\pm$ 2

Активность хоризмат-синтазы стала узким местом в биосинтезе Фен после инактивации репрессора общего ароматического пути TyrR, т.к. введение в штамм DV1017 Δ tyrR модификаций P_{tac}-ARO2 или P_{tac}-aroC повысило продукцию Фен (Рисунок 21).

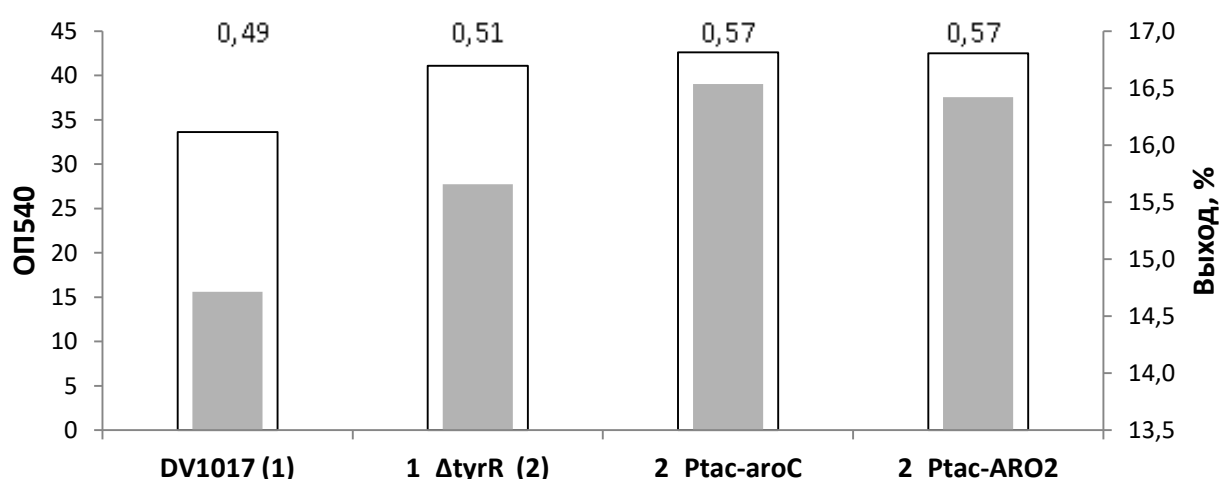


Рисунок 21 – Результаты ферментации в аппаратах Biostat Q штаммов DV1017 и вариантов DV1017 Δ tyrR (обозначены под диаграммами)

ОП и выход Фен из глюкозы – белые и серые прямоугольники соответственно. Выше прямоугольников показана продуктивность (г/л/ч).

Выход фенилаланина из глюкозы возрос на 0,8 - 0,9%, а продуктивность на 0,06 г/л/ч по сравнению с показателями DV1017 Δ *tyrR*. При этом положительный эффект от P_{tac}-ARO2 и P_{tac}-*aroC* на продукцию Фен был одинаковый. CHS ARO2 не показала преимуществ перед AroC. Поэтому возник вопрос о проявлении бифункциональности ARO2 в клетках *E. coli*.

5.2. Тестирование бифункциональности ARO2 в продуcente фенилаланина DV1017 Δ *pgi*

Бифункциональный фермент ARO2 был зависимым от NADPH и он мог иметь преимущества перед монофункциональным ферментом в случае усиления окислительной части PPP, в котором образуется NADPH. Для перенаправления потока углерода через окислительную часть PPP в штаммах DV1017 Δ *aroC*P_{tac}-ARO2 и DV1017 Δ *aroC*P_{tac}-*aroC* делетировали ген *pgi*, кодирующий фосфоглюкозоизомеразу. Перенаправление потока углерода через PPP имело негативный эффект на ферментационные характеристики обоих штаммов, но для штамма с ARO2 этот эффект был слабее (Рисунок 22).

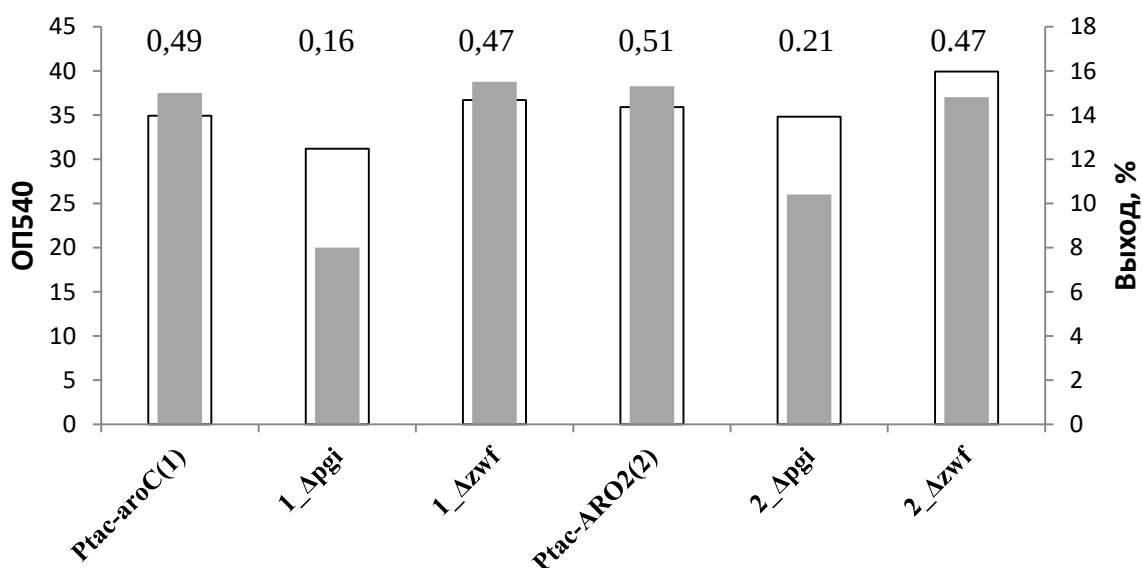


Рисунок 22 – Результаты ферментации, проведенной в аппаратах Biostat Q, штаммов - производных DV1017*aroC*

ОП и выход Фен из глюкозы – белые и серые прямоугольники соответственно. Выше прямоугольников показана продуктивность (г/л/ч).

Время ферментации штаммов Δ *pgi* стало более 20 часов, тогда как исходные штаммы потребляли то же количество глюкозы за 13-15 часов. Замедленный рост штаммов Δ *pgi* на среде с глюкозой объяснялся нарушением окислительно-восстановительного потенциала клетки из-за переизбытка образования NADPH. Тем не менее, штамм DV1017 Δ *aroC*P_{tac}-ARO2 Δ *pgi* дорос до более высокой оптической плотности (ОП₅₄₀ = 35), имел более высокую продуктивность (0,21 г/л/ч), по сравнению с показателями DV1017 Δ *aroC*P_{tac}-*aroC* Δ *pgi* (ОП₅₄₀ = 31, продуктивность – 0,16 г/л/ч). Выходы фенилаланина из глюкозы у обоих штаммов Δ *pgi* снизились относительно исходных штаммов DV1017 Δ *aroC*P_{tac}-ARO2 и DV1017 Δ *aroC*P_{tac}-*aroC* на 5 и 7% соответственно.

Инактивация окислительной части PPP в результате введения делеции гена *zwf* снизила продуктивность обоих штаммов. При этом снижение этой характеристики для штамма с P_{tac} -ARO2 было сильнее ($\Delta 0,04$ г/л/ч), чем для штамма с P_{tac} -aroC ($\Delta 0,02$ г/л/ч).

Таким образом, была продемонстрирована возможность использования бифункциональной CHS *S. cerevisiae* в продуценте Фен *E. coli*. Штамм-продуцент Фен, содержащий бифункциональный фермент ARO2, оказался более зависимым от функционирования окислительной части PPP. CHS ARO2 проявила своё бифункциональное свойство в штамме Δpgi , где она повысила устойчивость клеток к сверхпродукции NADPH за счёт его потребления. Преимущества гетерологичной хоризмат-синтазы перед собственной хоризмат-синтазой в клетках *E. coli* Pgi^+ не были выявлены.

6. Конструирование модельного продуцента с метаболической регуляцией синтеза L-фенилаланина

6.1 Конкуренция между синтезом фенилаланина и накоплением биомассы

Фен синтезировался из E4P, интермидиата PPP, поток углерода в который был значительно ниже, чем в путь Эмдена-Мейергофа-Парнаса (EMP). В условиях роста на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода через PPP утилизировалось не более 20 % углерода в лабораторном штамме MG1655 (Таблица 14) (Киверо и др., 2008).

Таблица 14 – Коэффициенты метаболических потоков при росте на среде M9

Штамм	MG1655				продуцент Фен
	Доля от общ. пула, %	– Δedd - Δeda	Δedd - Δeda - Δzwf	Δedd - Δeda , Δpgi	
PEP из EMP	82	80	90	12*	70
PEP из PPP	18	20	10*	88	30
R5P из окс. PPP	21	14	0	56	19
R5P из E4P и F6F	22	20	26	10	23
R5P из G3P	57	66	74	34	58
Ser из Gly	20	32	34	19	61
Ser из GAP	80	68	66	81	39
OAA из PEP	62	51	59	44	60
OAA из TCA	38	49	41	56	40
OAA $\leftrightarrow$ Fum	75	60	44	46	84

* Эти значения получились вследствие обратимости реакций PPP и гликолиза.

При сравнении коэффициентов метаболических потоков в продуценте Фен, штамме MG1655, его производных с инактивацией различных ветвей гликолиза, оказалось, что продуцент Фен имеет наибольшее сходство с MG1655, но со следующими исключениями. В продуценте Фен был усилен PPP, о чём свидетельствовало увеличение доли PER, образующегося из PPP (на 10 %). Из-за ослабления потока углерода через путь EMP наблюдалось перераспределение потоков на Сер. Увеличилась конверсия ОАА в фумаровую кислоту (Fum), что могло свидетельствовать о дефиците аммония²⁶, который требовался для синтеза Фен.

Искусственное усиление PPP положительно сказывалось на продукции Фен. В модельном продуценте фенилаланина DV157 проводился тюнинг экспрессии гена *pgl*, который кодировал 6-фосфоглюконолактазу (6PGL) (ЕС 3.1.1.31), катализирующую вторую реакцию оксидативной части PPP. Замена природной регуляторной области гена *pgl* на конститутивные промоторы разной силы приводила к повышению активности 6PGL, что коррелировало с увеличением накопления Фен в культуральной жидкости в ферментации (Патент РФ 2288268). При этом наблюдалось подавление роста клеток, выражающееся в снижении оптической плотности (Таблица 15). Во время роста клеток накопление Фен являлось вторичным процессом и, действительно, в реальных процессах основное накопление Фен происходило после окончания роста, в стационарной фазе. Для поддержания стационарной фазы в промышленной ферментации использовался периодический процесс с подпиткой глюкозы. Поэтому использование регулируемого синтеза Фен в ферментации было актуальным.

Таблица 15 - Накопление фенилаланина в ферментации в пробирках

Штамм	OD ₅₄₀	Фен, г/л	6PGL, Ед/мин*
DV157	18,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	7 ± 2
DV157 P _{tac-900} - <i>pgl</i>	18 ± 2	0,9 ± 0,2	не опред.
DV157 P _{tac-3900} - <i>pgl</i>	13 ± 4	1,2 ± 0,2	26 ± 4

* Активность определялась в производных штамма BW25113, содержащих указанные модификации гена *pgl*.

6.2. Моделирование стационарной фазы в периодической ферментации с помощью Pi-лимитации

Для продления стационарной фазы в периодической ферментации проводились эксперименты по подбору концентраций Pi, которые лимитировали рост, но не продукцию Фен, что проиллюстрировано на примере модельного продуцента DV269 (Таблица 16) (Патент РФ 2405040). Так, для этого штамма при снижении концентрации KН₂РO₄ наблюдалось снижение биомассы и увеличение накопления Фен.

²⁶ Sauer U., Lasko D.R., Fiaux J. et al. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism // Journal of Bacteriology. – 1999. – V. 181. – №. 21. – P. 6679-6688.

Таблица 16 - Накопление Фен в ферментации в пробирках для штамма DV269 в зависимости от концентрации P_i

KH_2PO_4 , г/л	OD_{540}	Фен, г/л	Индукция P_{hoA}
1	24 ± 1	$3,9 \pm 0,2$	нет
0,6	23 ± 1	$5,0 \pm 0,2$	есть
0,4	22 ± 1	$5,5 \pm 0,1$	есть

При воспроизведении P_i -лимитации (KH_2PO_4 – 0,6 г/л) при культивировании в аппаратах было обнаружено, что после истощения P_i в среде во второй половине экспоненциальной фазы клетки продолжали ещё расти. (Рисунок 23А, Б). Клетки могли использовать внутренние запасы P_i , накопившиеся в виде полифосфатов во время роста при избытке P_i в среде.

6.3. Использование промоторов генов P_{ho} -регулона, $phoA$ и $pstS$, для контроля экспрессии гена $aroG4$

Поток углерода в общий ароматический путь контролировался активностью ДАНР-синтазы, которая могла быть узким местом при синтезе Фен в штамме DV269, т.к. она снижалась во второй половине ферментации (Рисунок 23В). Ещё значительнее снижалась активность ДАНР-синтазы, тестируемая в присутствии Фен. На основании измерений этой активности в присутствии каждой по отдельности АА был сделан вывод, что основной вклад в эту активность обеспечивает продукт гена $aroG4$. Этот ген, кодирующий устойчивый к Фен фермент, был интегрирован в хромосому штамма DV269. Известные промоторы P_{ho} -регулона P_{phoA} и P_{pstS} были интегрированы по отдельности перед кодирующей рамкой $aroG4$ (Doroshenko et al., 2010b). Если первый промотор узнавался РНК-полимеразой в комплексе с σ^{70} , то второй промотор – как с σ^{70} , так и с σ^S , что могло улучшить транскрипцию целевого гена в стационарной фазе. После замены нативного промотора P_{aroG} на P_{phoA} или P_{pstS} наблюдалось увеличение продукции Фен для вновь полученных штаммов DV271 и DV368 по сравнению с исходным DV269 (Таблица 16).

Таблица 16 - Продукция Фен в периодической ферментации из глюкозы

Штамм	Регуляция $aroG4$	OP_{540nm}	Фен, г/л
DV269	P_{aroG}	22,0	4,8
DV271	P_{phoA}	23,2	6,1
DV271 $\Delta rpoS$	P_{phoA}	21,4	7,2
DV368	P_{pstS}	24,2	6,7
DV368 $\Delta rpoS$	P_{pstS}	22,4	6,4

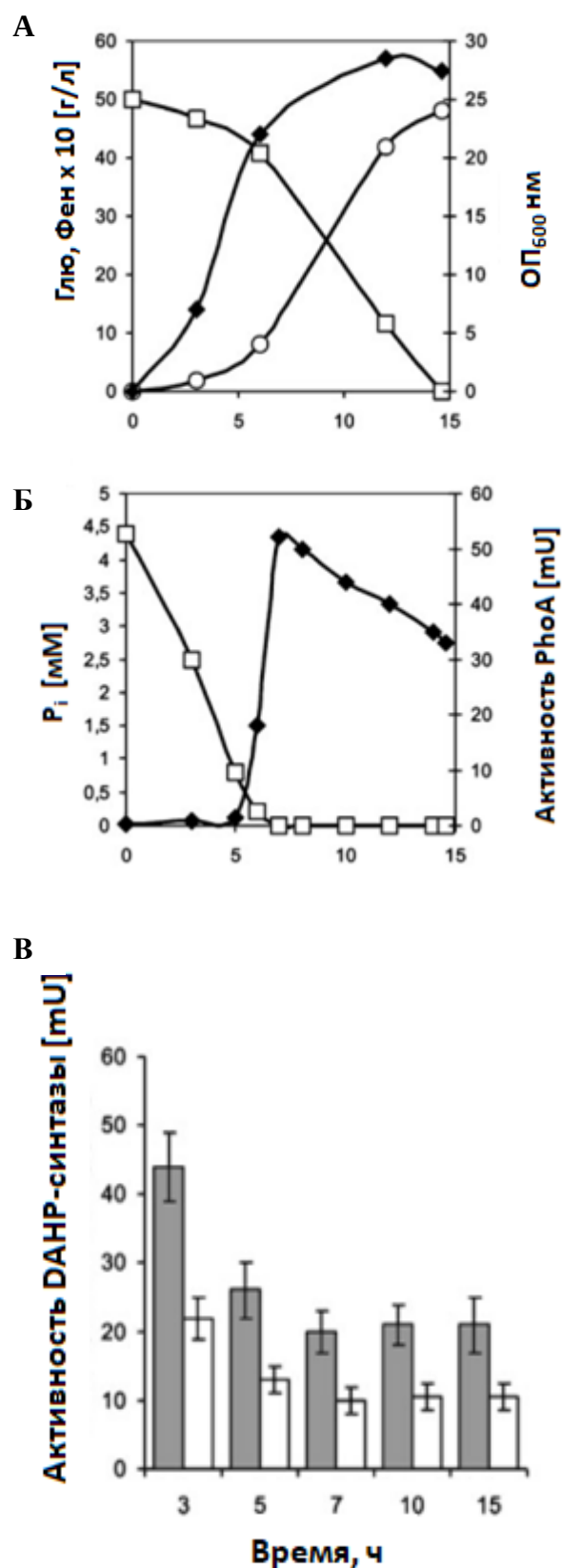


Рисунок 23 - Временные показатели штамма DV269 при периодическом культивировании в аппаратах BIOSTAT Q

А: Накопление биомассы (♦), Фен (○), потребление глюкозы (□).

Б: P_i (□) и активность щелочной фосфатазы (♦).

В: Активность DANP-синтазы в присутствии Фен (□) и без него (■).

В новых штаммах увеличение активности ДАНР-синтазы происходило во второй половине культивирования (Рисунок 24) поэтому не сказывалось отрицательно на накоплении биомассы (Таблица 16). Штамм DV368, содержащий P_{pstS} -*aroG4*, характеризовался более высокой активностью этого фермента и более высоким накоплением Фен, чем DV271 с P_{phoA} -*aroG4*. Инактивация σ^S немного снижала продукцию Фен в производном штамма DV368 (4%), но давала положительный эффект для производного DV271 (18%).

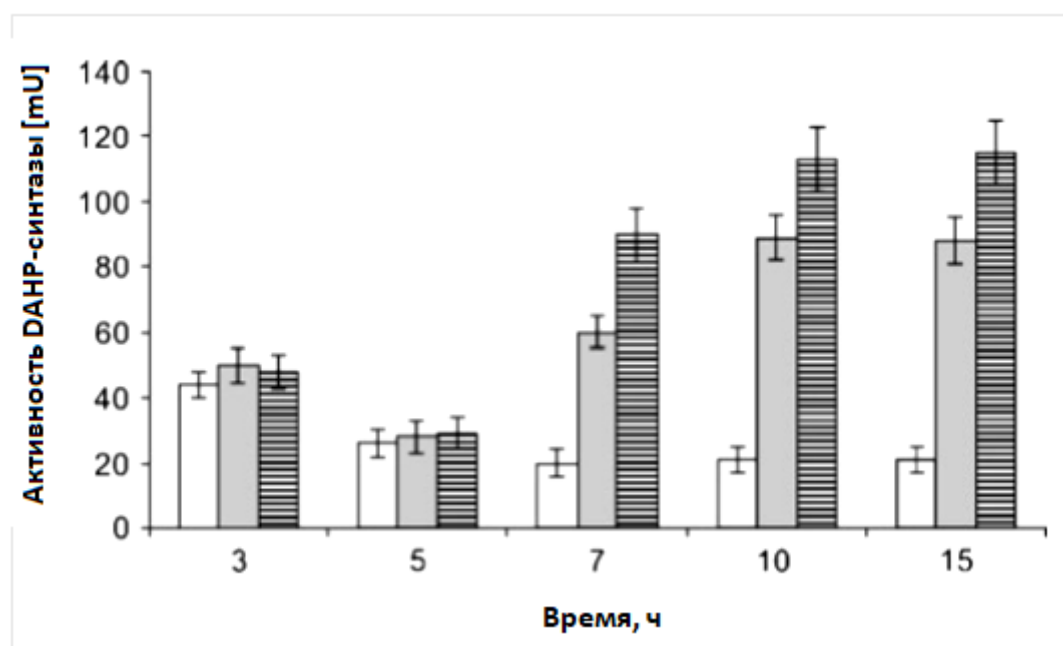


Рисунок 24 - Активность ДАНР-синтазы при периодическом культивировании в штаммах DV269 (□), DV271 (■), DV368 (▨)

Таким образом, было продемонстрировано использование промоторов *Pho*-регулона для регуляции синтеза Фен. Образование Фен может быть благоприятным при P_i -лимитации, т.к. при синтезе 1 М Фен в общем ароматическом пути выделяется 4 М P_i . *Pho*-регуляция синтеза вторичных метаболитов в актиномицетах обнаружена в природе²⁷.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены сахарозоположительные продуценты *E. coli*, содержащие в хромосоме гены *scr* с установленной первичной структурой, которые кодируют зависимую от PTS утилизацию сахарозы.
2. С помощью методов рекомбинационной инженерии осуществлено конструирование модельных штаммов-продуцентов некоторых аминокислот (Гис,

²⁷ Xu Y., You D., Yao L. et al. Phosphate regulator PhoP directly and indirectly controls transcription of the erythromycin biosynthesis genes in *Saccharopolyspora erythraea* // Microbial Cell Factories. – 2019. – V. 18. – №. 206. – <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1258-y>.

Фен, Три, Тир) с характеристиками, заранее предсказанными на основании дизайна их генетически-детерминированной структуры.

3. Показано, что ген *yddG* *E. coli*, кодирующий белок внутренней мембраны, в условиях искусственной его сверхэкспрессии способен увеличивать выход ароматических аминокислот из клеток их продуцирующих.

4. На основе использования С-концевого программируемого протеолиза для снижения уровня активности белка TyrA *in vivo* разработана стратегия конструирования прототрофного по тирозину штамма *E. coli* - продуцента фенилаланина, не накапливающего тирозин в качестве нежелательной примеси.

5. На основании сравнительного анализа бифункциональной хоризмат-синтазы дрожжей, способной восстанавливать флаavinмоноклеотид, и монофункционального фермента кишечной палочки сделан вывод о достаточности восстановленного флаavinмоноклеотида в продуцентах Фен *E. coli*.

6. Продемонстрирована эффективность использования промоторов Phо-регулона (P_{phoA} и P_{pstS}) для метаболически регулируемой транскрипции гена ДАНР-синтазы, *aroG4*, которая в условиях лимитации по растворимому неорганическому фосфату в среде перенаправляет поток углерода из центрального метаболизма на синтез фенилаланина.

По теме диссертации опубликованы:

Обзорные статьи

1. Машко С.В., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Мичурина Т.А., Гавриков А.В., Беневоленский М.С., Киверо А.Д., Каташкина Ж.И., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Дебабов В.Г. Использование метаболической регуляции для оптимизации генов в бактериальных клетках – новое направление биотехнологии XXI века // Биотехнология. – 2002. – № 4. – С. 3-14.
2. **Дорошенко В.Г.**, Лившиц В.А., Айрих Л.Г., Шмагина И.С., Саврасова Е.А., Овсиенко М. В., Машко С.В. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции фенилаланина и родственных соединений // Биотехнология. – 2014. – Т. 30. – № 4. – С. 8-27.

Экспериментальные работы

3. **Doroshenko V.G.**, Livshits V.A. Structure and mode of transposition of Tn2555 carrying surose utilization // FEMS Microbiology Letters. – 2004. – V. 233. – P.353-359.
4. Зименков Д.В., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Минаева Н.И., Саврасова Е.А., Бирюкова И.В., **Дорошенко В.Г.**, Ахвердян В.З., Машко С.В. Области хромосомы *E.coli*, предпочтительные для встраивания генов при использовании системы интеграции на основе фага-транспозона Mu // Биотехнология. – 2004. – Т. 6. – С. 3-18.
5. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Машко С.В. Направленное изменение

- уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме // Молекулярная Биология. – 2005. – Т.39. – № 5. – С. 823-831.
6. **Doroshenko V.**, Airich L., Vitushkina M., Kolokolova A., Livshits V., Mashko S. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids // FEMS Microbiology Letters. – 2007. – V. 275. – P. 312-318.
 7. Киверо А.Д., Бочаров Е.В., **Дорошенко В.Г.**, Соболев А.Г., Дубинный М.А., Арсеньев А.С. Изучение потоков углерода при утилизации глюкозы *Escherichia coli* MG1655 с помощью 2D (^1H , ^{13}C) ЯМР-спектроскопии // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2008. – Т.44. – С. 168-175.
 8. Цыренжапова И.С., **Дорошенко В.Г.**, Айрих Л.Г., Миронов А.С., Машко С.В. Ген *yddG* *Escherichia coli*, кодирующий потенциальный экспортер ароматических аминокислот: конститутивная транскрипция и зависимость уровня экспрессии от скорости роста клеток // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 5. – С.601-609.
 9. Airich L.G., Tsyrenzhapova I.S., Vorontsova O.V., Feofanov A.V., **Doroshenko V.G.**, Mashko S.V. Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* aromatic amino acid efflux protein YddG // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V.18. – P.189-197.
 10. **Doroshenko V.G.**, Shakulov R.S., Kazakova S.M., Kivero A.D., Yampolskaya T. A., Mashko S. V. Construction of an L-phenylalanine-producing tyrosine- prototrophic *Escherichia coli* strain using *tyrA* *ssrA*-like tagged alleles // Biotechnology Letters. – 2010a. – V.35. – P. 1117-1121.
 11. **Doroshenko V.G.**, Tsyrenzhapova I.S., Krylov A.A., Kiseleva E.M., Ermishev V.Y., Kazakova S.M., Biryukova I.V., Mashko S.V. Pho regulon promoter-mediated transcription of the key pathway gene *aroG* (*Fbr*) improves the performance of an L-phenylalanine-producing *Escherichia coli* strain // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010b. – V.88. – P. 1287-1295.
 12. **Дорошенко В.Г.**, Лобанов А.О., Федорина Е.А. Направленное изменение *Escherichia coli* MG1655 с целью получения мутантов, продуцирующих гистидин / Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2013. – Т. 49. – № 2. – С. 149-154.
 13. Слесарева А.Е., Кун Л.Г., **Дорошенко В.Г.** Сравнение моно- и бифункциональной хоризматсинтаз в клетках *Escherichia coli*, не продуцирующих и продуцирующих фенилаланин // Биотехнология. – 2017. – Т. 33. – № 2. – С. 48-55.

Патенты

14. Livshits V.A., **Doroshenko V.G.**, Mashko S.V., Akhverdian V.Z., Kozlov Yu.I. Amino acid producing strains belonging to the genus *Escherichia* and method for producing amino acid // European Patent EP 1149911 (03.04.2002). – 6 p.
15. Лившиц В.А., **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В., Ахвердян В.З., Козлов Ю.И. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* – продуцент аминокислоты (варианты) // Патент РФ RU 2212447 (20.09.2003). – 10 с.

16. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Машко С.В., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Беларёва А.В. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* – продуцент аминокислоты // Патент РФ 2222596 (27.01.2004). – 8 с.
17. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Гусятинер М.М., Зиятдинов М.Х., Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* // Патент РФ 2229513 (27.05.2004). – 9 с.
18. Каташкина Ж.И., Лунц М.Г., **Дорошенко В.Г.**, Фомина С.А., Скороходова А.Ю., Ивановская Л.В., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий с оптимизированным уровнем генной экспрессии // Патент РФ № 2268305 (20.01.2006). – 5 с.
19. Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Киверо А.Д., Бирюкова И.В., **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В. 6 – Фосфоглюконолактоназа из *Escherichia coli*, фрагмент ДНК, бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, – продуцент L-аминокислоты, и способ получения L-аминокислоты // Патент РФ № 2288268 (27.11.2006). – 25 с.
20. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., **Дорошенко В.Г.**, Скороходова А.Ю., Филиппов Д.В. Способ получения l-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован кластер генов *sfmacdfh-fimz* или ген *fimz* // Патент РФ № 2333953 (20.09.2008). – 24 с.
21. Шакулов Р.С., Клячко Е.В., **Дорошенко В.Г.**, Айрих Л.Г. Способ получения аминокислот с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia* // Патент РФ № 2264459 (10.08.2010). – 57 с.
22. Айрих Л.Г., **Дорошенко В.Г.**, Цыренжапова И.С., Имаизуми А. Способ получения L-аминокислоты // Патент РФ № 2405040 (27.11.2010). – 73 с.
23. Айрих Л.Г., **Дорошенко В.Г.**, Цыренжапова И.С. Мутантный белок, кодируемый геном *yddG*, и способ получения ароматических L-аминокислот с использованием бактерии рода *Escherichia* // Патент РФ № 2530171 (10.10.2014). – 23 с.

Материалы конференций и симпозиумов

1. **Doroshenko V.G.**, Livshits V.A. The mode of Tn2555 transposition // Keystone Symposium: Transposition and site-specific recombination. – Santa Fe, New Mexico, USA. – March 1-7, 1997. – P. 16.
2. Цыренжапова И.С., **Дорошенко В.Г.**, Айрих Л.Г., Миронов А.С., Машко С.В. Изучение регуляции гена *yddG* *Escherichia coli*, кодирующего потенциальный экспортёр ароматических аминокислот // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск. – 11-15 мая 2008 г. – С. 118.
3. Цыренжапова И.С., **Дорошенко В.Г.**, Айрих Л.Г., Казакова С.М., Машко С.В. Использование промоторов *Rho*-регулона для метаболически регулируемого биосинтеза L-фенилаланина (Phe) в *Escherichia coli* // Генетика микроорганизмов и биотехнология, Международная школа-конференция,

посвящённая 40-летию создания ГосНИИГенетика. – Москва-Пушино. – 21-24 октября 2008 г. – С. 90.

4. **Doroshenko V.G.**, Shakulov R.S., Kazakova S.M., Yampolskaya T. A., Mashko S. V. Prevention of L-tyrosine by-production and improved performance of an *Escherichia coli* L-phenylalanine-producing strain using *tyrA* *ssrA*-like tagged alleles // III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology “BioMicroWorld 2009” – Lisbon, Portugal. – December 2-4, 2009. – P. 802.
5. **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В. Резюме метаболической инженерии продуцента фенилаланина *Escherichia coli* // Биотехнология, спецвыпуск, 2018 Материалы Школы-конференции «генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике», посвященной 50-летию НИЦ «Курчатовский институт-ГосНИИГенетика». – С. 54.