

УДК 577.121

ЭФФЕКТ ИНАКТИВАЦИИ ГЛИОКСИЛАТНОГО ШУНТА НА БИОСИНТЕЗ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ШТАММАМИ *Escherichia coli* ПО ОБРАЩЕННОМУ β -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2023 г. А. Ю. Гулевич¹, *, А. Ю. Скороходова¹, В. Г. Дебабов¹¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

С использованием в качестве базового штамма *Escherichia coli* MG1655 *lacI^Q*, Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *fadE*, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{irc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA* получены штаммы-производные, способные к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути β -окисления жирных кислот. Биосинтез рекомбинантными штаммами целевого соединения обеспечен при первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА под действием 3-оксоацил-КоА-тиолазы PaaJ и катализе финальной реакции цикла ацил-КоА дегидрогеназами FadE и FabI. Делеция в штаммах генов *sucCD*, кодирующих компоненты сукцинил-КоА-синтазы, не повышала относительной внутриклеточной доступности сукцинил-КоА для целевых биосинтетических реакций и не приводила к росту накопления рекомбинантами адипиновой кислоты. Секретция янтарной и яблочной кислот штаммами с нарушенным циклом трикарбоновых кислот сохранялась практически неизменной, что указывало на активность в клетках реакций глиоксилатного шунта, конкурирующих с реакциями цикла за изоцитрат, необходимый для формирования сукцинил-КоА. При инактивации в штаммах изоцитратлиазы, малатсинтаз A и G, а также бифункциональной киназы/фосфатазы изоцитратдегидрогеназы, за счет делеции генов *aceBAK* оперона и *glcB*, синтез адипиновой кислоты рекомбинантами повышался в три раза и достигал 0.33 mM.

Ключевые слова: адипиновая кислота, β -окисление жирных кислот, глиоксилатный шунт, метаболическая инженерия, сукцинил-КоА, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S055510992303008X, EDN: BBSGQX

Адипиновая кислота является важным промышленно значимым соединением, способным служить удобным предшественником в последующем синтезе широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая lubricants, пластификаторы и фармацевтические субстанции. При этом, большая часть адипиновой кислоты, ежегодно производящейся в объемах превышающих 3.5 млн тонн, используется для получения нейлона-6,6 [1]. В настоящее время производство адипиновой кислоты основывается на нефтехимическом синтезе с использованием бензола в качестве предшественника [2]. В качестве экологически оправданной альтернативы рассматривался способ, предполагающий первичное биотехнологическое получение из возобновляемых источников углерода *cis,cis*-муконовой кислоты с ее последующей каталитической конверсией в адипиновую [3]. Действительно, возможность микробиологической конверсии глюкозы и глицерина в *cis,cis*-муконовую кислоту была проде-

монстрирована с использованием направленно сконструированных штаммов таких традиционных для промышленной биотехнологии микроорганизмов, как *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* [4–7]. Кроме того, был предложен потенциальный путь прямой биокаталитической конверсии субстрата в адипиновую кислоту через промежуточное формирование 2-оксоадипата, предполагающий первичную конденсацию ацетил-КоА с 2-оксоглутаратом [8]. Однако экспериментальная реализация соответствующей концепции на сегодняшний день не была продемонстрирована. Многообещающей альтернативой α -восстановлению 2-оксоадипата является образование адипиновой кислоты из адипил-КоА, сформированного в результате обращения биохимических реакций β -окисления, включающих, в том числе, обратные реакции деградации фенилацетата или деградации жирных кислот. Формирование соответствующего Ко-А-предшественника в последовательности таких реакций предполагает первичную

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P2	5'-atgtatatctccttcacggccaatgcttcgttc-3'
P3	5'-gcgtagcaattccgtcacacaataaaggcttcacgcatatgtatatctccttcacggccaatg-3'
P4	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagtgg-3'
P5	5'-caccgcatcgccggcaccattacagagaagcctgacgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-gcatcgccggcaccattacag-3'
P7	5'-gtagcgaccaattggcgtagc-3'
P8	5'-atgaacttacatgaatatcaggcaaaacaacttttcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P9	5'-ttatttcagaacagttttcagtgcttcaccgatatctgaagcctgctttttataactaagtgg-3'
P10	5'-ctacgggaccaccaatgtagg-3'
P11	5'-catacgatggccaacctatg-3'

конденсацию ацетил-КоА и сукцинил-КоА с последующим превращением 3-оксоадипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА, затем в 2,3-дидегидроадипил-КоА и, в итоге, в адипил-КоА. Гидролиз тиоэфирной связи, ведущий к получению целевого соединения, может катализироваться, в таком случае, тиюэстеразами, обладающими необходимой субстратной специфичностью. В последние годы в клетках *E. coli* был успешно продемонстрирован синтез адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути деградации фенилацетата при оверэкспрессии в базовых штаммах как нативных генов *paa*-оперона, так и вспомогательных генов других организмов [8–11]. В качестве таких вспомогательных генов в первую очередь использовались гены тиюэстераз из *Acinetobacter baylyi* [8] и *Mus musculus* [10, 11], а также гены ацил-КоА дегидрогеназ/еноил-КоА редуктаз из *Clostridium acetobutylicum* [10] и *Treponema denticola* [9, 11]. Вместе с тем, не было показано биосинтеза адипиновой кислоты клетками *E. coli* при катализе реакций формирования адипил-КоА ферментами β-окисления жирных кислот (**БОЖК**).

Поскольку от эффективности первичной стадии формирования 3-оксоадипил-КоА напрямую зависит эффективность протекания последующих реакций обращенного β-окисления, были предприняты попытки повышения в клетках соответствующих адипат-секретирующих рекомбинантов внутриклеточной доступности сукцинил-КоА. Этот метаболит является интермедиатом цикла трикарбоновых кислот и, в данной связи, подходы к повышению его внутриклеточной доступности для реакций обращенного β-окисления основывались, в первую очередь, на предотвращении утилизации сформированного сукцинил-КоА в последующих реакциях цикла за счет инактивации сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1) [9] или сукцинил-КоА синтетазы (КФ 6.2.1.5) [12]. При этом, известно, что активность 2-оксоглутарат

дегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), ответственной за формирование сукцинил-КоА, в клетках *E. coli* снижена при росте на средах содержащих глюкозу [13], и один из ключевых предшественников соответствующего тиоэфира, изоцитрат, может вовлекаться в реакции глиоксилатного шунта, активизирующиеся при интенсивном формировании в клетке ацетил-КоА [14].

Цель работы — конструирование штаммов *E. coli* способных к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы с участием ферментов β-окисления жирных кислот и оценка влияния инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез рекомбинантами целевого соединения.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазу *Bgl*II, ДНК-полимеразу Taq, T4 ДНК-лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), а также высокоточную ДНК-полимеразу Кара HiFi (“Roche”, Швейцария). ПЦР-продукты очищали проведением электрофореза в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Олигонуклеотиды (“Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированные штаммы *E. coli* BOX3.1 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* и BOX3.1 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* [15] с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β-окисления жирных кислот и тиюэстеразу II, а также лишённые путей смешанно-кислотного брожения и активности неспецифичной тиюэстеразы YscA, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Использованные в работе бактериальные штам-

мы и плазмиды представлены в табл. 2. Для культивирования бактерий применяли полноценные среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [16] с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Введение целевых модификаций в хромосому *E. coli* осуществляли с использованием методики, описанной ранее [17].

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *paaJ* искусственным генетическим элементом P_L -SD $_{\phi 10}$, содержащим промотор P_L фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена $\phi 10$ из фага T7, проводили в несколько стадий. На первой стадии, с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L , последовательность SD гена $\phi 10$ из фага T7 и 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *paaJ*.

Фрагмент получали в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда и праймеров P1 и P2 был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L и часть последовательности SD гена $\phi 10$ из фага T7. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующем раунде ПЦР с использованием праймеров P1 и P3. Праймер P3 содержал область комплементарную 3'-концу промотора P_L , последовательность SD гена $\phi 10$ из фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамки считывания гена *paaJ*. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагмента ДНК. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, непосредственно предшествующему кодирующей области гена *paaJ*, был получен ПЦР с использованием праймеров P4 и P5 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [18] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P3 и P5. Полученный ПЦР-продукт был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46 [17]. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *paaJ*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P6 и P7.

Линейный фрагмент ДНК для инактивации генов *sucCD*, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием праймеров P8 и P9 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) в качестве матрицы. Полученный фрагмент ДНК был интегри-

рован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт инактивации генов *sucCD* в хромосомах отобранных интегрантов подтверждали ПЦР-анализом с помощью локус-специфичных праймеров P10 и P11.

Соответствующие индивидуальные генетические модификации были введены в состав хромосом целевых рекомбинантных штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае инактивации генов *aceBAK* и *glcB* использовали ранее полученные препараты P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие целевые маркированные модификации [19]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, с использованием целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [20]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 2.5 г/л NaHCO₃. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Насыщение среды кислородом оценивали в контрольных колбах с соответствующими культурами при инкубации в присутствии резазурина. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора $P_{trc-ideal-4}$, спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ.

Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, в полученных супернатантах определяли концентрации секретируемых метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

Аналитические методы. Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75/25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Таблица 2. Штаммы и плазмиды, сконструированные и использованные в работе

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadE</i>	[15]
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i>	[15]
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i> P _L - <i>paaJ</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i>	Данная работа
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>paaJ</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i>	Данная работа
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i> P _L - <i>paaJ</i> Δ <i>sucCD</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>sucCD</i>	Данная работа
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>paaJ</i> Δ <i>sucCD</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>sucCD</i>	Данная работа
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i> P _L - <i>paaJ</i> Δ <i>aceBAK</i> Δ <i>glcB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i>	Данная работа
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>paaJ</i> Δ <i>aceBAK</i> Δ <i>glcB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i>	Данная работа
Плазмида		
pMW118-(<i>λattL</i> -Cm- <i>λattR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>λattL-cat-λattR</i>	[18]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - <i>λgam-bet-exo</i>	[17]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - <i>λxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[19]

Идентификацию и количественный анализ масляной и адипиновой кислот в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Пробоподготовка включала экстракцию целевых аналитов из культуральной жидкости, упаривание экстракта и дериватизацию с получением триметилсилильных производных. Жидко-жидкостная микроэкстракция этилацетатом была использована для экстракции целевых соединений. Перед экстракцией аликвоту образца смешивали с водными растворами внутренних стандартов (валериановой и пимелиновой кислот), 2 М раствором хлорида натрия и доводили до pH 1–2 с помощью 2 М соляной кислоты. Этилацетатный экстракт смешивали с сухим сульфатом натрия, центрифугировали и полученный супернатант упаривали в вакуумном испарителе до минимального объема при 30°C. Силилирование проводили инкубируя остаток после стадии упаривания с N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом, содержащим 1% триметилхлорсилана при 60°C в течение 15 мин.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N, укомплектованном автосамплером 7683B и масс-селективным детектором Agilent 5975 MSD ("Agilent", США). Система была оснащена капиллярной колонкой Agilent DB-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа носителя использовался гелий с постоянной скоростью потока 1.0 мл/мин. Проба объемом 1 мкл вводилась в испаритель в режиме деления потока 1 : 10. Температура испарителя составляла 230°C. Температурная программа термостата колонки: начальная изотерма 2 мин при 60°C с последующим линейным градиентом до 200°C со скоростью 5°C /мин, затем до 250°C со скоростью 15°C /мин, конечная изотерма 5 мин при 250°C. Для ионизации аналитов была использована ионизация электронами (70 eV). Температура ионного источника масс-спектрометра составляла 230°C. Температура интерфейса масс-спектрометра составляла 250°C. Масс-анализатор функционировал в режиме селективного детектирования (145 и 73 m/z для масляной кислоты, 275 и 172 m/z для адипиновой кислоты, 159 m/z для валериановой кислоты, 289 m/z для пимелиновой кислоты). Сбор и обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Agilent MSD Chem-Station. Аналитическая система была откалибрована в диапазоне 0.01–0.10 мг/мл для обоих аналитов с пределом детектирования 0.002 мг/мл. Для аппроксимации калибровочных данных использовали взвешенную линейную регрессию, был получен квадрат коэффициента корреляции $R^2 = 0.993$. Целевые аналиты идентифицировали, сравнивая полученные данные с характеристиками соответствующих стандартов (время удерживания и масс-спектр).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве базовых штаммов для конструирования производных, способных к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы с участием ферментов БОЖК и последующей оценки влияния инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез рекомбинантами целевого соединения, были использованы ранее сконструированные штаммы *E. coli* BOX3.3 $\Delta 4$ $P_{trc-id-4}$ -*fadE* и BOX3.3 $\Delta 4$ $P_{trc-id-4}$ -*fabI* (табл. 2) [15]. В данных штаммах пути смешанно-кислотного брожения, конкурирующие с реакциями обращенного БОЖК за ключевые метаболиты предшественники, пировиноградную кислоту и ацетил-КоА, были инактивированы за счет делеций генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*. Активность ферментов, способных катализировать реакции обращенного БОЖК была повышена в штаммах в результате замены нативных регуляторных областей соответствующих генов, *atoB*, *fadB*, *fadE* и *fabI*, эффективными искусственными регуляторными элементами $P_{trc-ideal-4}$ -SD_{φ10} и P_L -SD_{φ10}. Также, для обеспечения возможности конверсии терминальных КоА-продуктов обращенного БОЖК в соответствующие карбоновые кислоты, в штаммах была усилена экспрессия гена тиоэстеразы II, *tesB*, тогда как ген неспецифичной тиоэстеразы YciA был делетирован с целью предотвращения нежелательного гидролиза тиоэфирной связи интермедиатов обращенного цикла. В результате, при ферментации в пробирках штаммы были способны к синтезу из глюкозы до ~0.5 мМ масляной кислоты, в результате однократного функционального обращения БОЖК [15], и могли служить удобными предшественниками для конструирования на их основе модельных продуцентов адипиновой кислоты.

Стехиометрически сбалансированный биосинтез 2 молекул адипиновой кислоты из 3 молекул глюкозы по обращенному БОЖК предполагает расход 4 молекул НАДН. При этом, гликолитическая генерация необходимых предшественников обеспечивает формирование 6 соответствующих восстановленных эквивалентов, аэробная конверсия четырех молекул пировиноградной кислоты в ацетил-КоА — еще четырех, и последующее образование двух сукцинил-КоА в реакциях ЦТК также сопровождается формированием 4 дополнительных НАД(Р)Н. Однако при аэрации основная часть восстановленных эквивалентов, сформированных в ходе катаболизма субстрата, окисляется кислородом, выступающим в качестве финального акцептора электронов, в результате действия дыхательной цепи переноса электронов. С другой стороны, при анаэробии, несмотря на сниженное формирование восстановленных эквивалентов за счет конверсии пировиноградной кислоты в ацетил-КоА под действием пируват-формилазы (КФ 2.3.1.54), внутриклеточный окисли-

тельно-восстановительный статус будет препятствовать не только биосинтезу целевого соединения, но и эффективному потреблению субстрата, в силу ингибирования гликолиза избыточным внутриклеточным пулом НАДН [21]. Таким образом, ни полностью анаэробные, ни полностью аэробные условия не могли рассматриваться как оптимальные для биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК ранее сконструированными штаммами BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI*. В данной связи в настоящей работе биосинтетический потенциал штаммов оценивали при микроаэробном культивировании. С целью повышения интенсивности формирования в клетках шавелевоуксусной кислоты (ЩУК), необходимой для вовлечения ацетил-КоА в реакции ЦТК, ведущие к образованию сукцинил-КоА, в среды дополнительно вносили 2.5 г/л NaHCO₃.

В соответствующих условиях культивирования базовые штаммы не секретировали заметных количеств адипиновой кислоты, несмотря на присутствие источника CO₂ в среде (табл. 3). Это могло быть связано как с недостаточной активностью ЦТК, генерирующего сукцинил-КоА, так и с субстратной специфичностью 3-оксоацил-КоА-тиолазы AtoB (КФ 2.3.1.16), ответственной в штаммах за первичную конденсацию ацетил- и ацил-КоА. При этом, присутствие в средах культивирования штаммов значимых количеств янтарной кислоты (табл. 3) свидетельствовало, скорее, в пользу правомочности второго предположения. Действительно, в предшествующих работах [8–11] биосинтез адипиновой кислоты по обращенному β-окислению направленно сконструированными штаммами *E. coli* достигался при усилении в рекомбинантах экспрессии гена другой нативной тиолазы — PaaJ (КФ 2.3.1.174), обладающей подтвержденной способностью к образованию 3-оксоадипил-КоА. В данной связи, экспрессия гена *paaJ* была усилена в базовых штаммах BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* в результате замены его природной регуляторной области искусственным генетическим элементом P_L-SD_{φ10}, содержащим сильный конститутивный промотор фага ламбда и эффективный сайт связывания рибосом гена 10 из фага T7.

Соответствующие штаммы BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* P_L-*paaJ* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* P_L-*paaJ* в ходе микроаэробной утилизации глюкозы секретировали в среду около 100 мкМ адипиновой кислоты при пропорциональном снижении накопления масляной кислоты (табл. 3). При этом, как и в случае масляной кислоты, формирование 6-углеродной адипиновой кислоты штаммом BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* было несколько снижено по сравнению со штаммом BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE*. Это наблюдение противоречило ранее полученным данным о

предпочтительном формировании в результате функционального обращения БОЖК 6- и 8-углеродных карбоновых кислот штаммами экспрессирующими в качестве ацил-КоА-дегидрогеназы белок FabI [15]. Тем не менее, предшествующие результаты были получены в случае продукции рекомбинантами монокарбоновых кислот и могли не отражать специфичности конкретных ферментов к соответствующим КоА-производным, содержащим ω-карбоксильную группу.

В данной связи следует отметить, что формирование янтарной кислоты штаммами с усиленной экспрессией *paaJ* не снижалось, указывая либо на неспособность штаммов эффективно вовлекать в обращенные реакции БОЖК соответствующий ω-функционализированный тиоэфир, сукцинил-КоА, либо на его сниженную доступность в клетках рекомбинантов. Сукцинил-КоА формируется в ЦТК из 2-оксоглутарата в результате действия 2-оксоглутарат дегидрогеназы и, в дальнейшем, туннелируется в последующие реакции цикла сукцинил-КоА-синтетазой. Таким образом, инактивация последнего фермента потенциально могла повысить внутриклеточную доступность сукцинил-КоА для целевых реакций обращенного БОЖК.

При инактивации в клетках штаммов BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* P_L-*paaJ* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* P_L-*paaJ* генов *sucCD*, кодирующих компоненты сукцинил-КоА синтетазы, продукция целевого соединения рекомбинантами практически не изменилась, тогда как уровни накопления штаммами янтарной кислоты несколько снизились (табл. 3). Однако это снижение составляло лишь около 20%, указывая на незначительный вклад активности сукцинил-КоА синтетазы в формирование штаммами данного дикарбоксилата. Действительно, известно, что у клеток *E. coli* экспрессия генов *sucABCD* оперона, кодирующих компоненты 2-оксоглутарат дегидрогеназы и сукцинил-КоА синтетазы, резко снижена при росте в богатых и содержащих глюкозу средах [13]. Таким образом, за формирование штаммами BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* P_L-*paaJ* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* P_L-*paaJ* янтарной кислоты в первую очередь были ответственны, по-видимому, реакции глиоксилатного шунта. Секретция рекомбинантами заметных количеств яблочной кислоты подтверждала это предположение. Ключевые ферменты, катализирующие реакции глиоксилатного шунта, изоцитрат лиаза (КФ 4.1.3.1) и малат синтаза А (КФ 2.3.3.9), кодируются в клетках *E. coli* генами *aceA* и *aceB*, составляющими вместе с геном *aceK*, кодирующим бифункциональную киназу/фосфатазу изоцитрат дегидрогеназы, *aceBAK* оперон. Последний фермент регулирует активность изоцитрат дегидрогеназы, перераспределяя поток углерода между окислительным ЦТК и глиоксилатным шунтом [22]. Экспрессия генов *aceBAK* оперона подвержена

Таблица 3. Концентрации метаболитов, секретируемых сконструированными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота, мМ	Уксусная кислота, мМ	Яблочная кислота, мМ	Янтарная кислота, мМ	Масляная кислота, мкМ	Адипиновая кислота, мкМ
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i>	41.9 ± 2.4	20.5 ± 1.2	12.4 ± 0.8	0.9 ± 0.1	5.1 ± 0.3	512.1 ± 46.3	н.д.
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i>	42.3 ± 2.1	20.8 ± 1.1	12.6 ± 0.9	1.1 ± 0.1	5.0 ± 0.2	476.6 ± 42.0	н.д.
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i> P _L - <i>paal</i>	41.6 ± 2.0	20.9 ± 1.1	12.2 ± 0.7	0.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2	394.3 ± 36.5	108.3 ± 10.5
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>paal</i>	42.1 ± 2.3	21.1 ± 1.0	12.8 ± 0.8	1.0 ± 0.1	5.2 ± 0.3	362.7 ± 34.8	101.4 ± 10.2
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i> P _L - <i>paal</i> Δ <i>sucCD</i>	41.3 ± 2.1	21.2 ± 1.0	12.6 ± 0.8	1.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2	389.2 ± 35.6	112.1 ± 11.0
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>paal</i> Δ <i>sucCD</i>	41.8 ± 2.2	21.4 ± 1.2	12.7 ± 0.9	1.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	366.1 ± 36.4	103.7 ± 9.9
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fadE</i> P _L - <i>paal</i> Δ <i>aceBAK</i> Δ <i>glcB</i>	41.5 ± 2.1	21.7 ± 1.2	13.0 ± 1.1	н.д.	1.0 ± 0.1	175.0 ± 16.9	326.5 ± 30.6
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>paal</i> Δ <i>aceBAK</i> Δ <i>glcB</i>	42.1 ± 2.3	22.2 ± 1.1	13.3 ± 1.0	н.д.	0.9 ± 0.1	136.4 ± 12.5	332.8 ± 31.3

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов; н.д. — не детектировано.

комплексной транскрипционной регуляции, включающей действие таких белков как IclR, FadR, FruR, ArgAB и CRP-цАМФ [23, 24]. В условиях высокой доступности глюкозы, экспрессия генов *aceBAK* оперона репрессируется специфическим транскрипционным регулятором, белком IclR. При этом, в случае сниженной доступности глюкозы, экспрессия оперона активируется глобальным регулятором CRP-цАМФ [24]. Более того, повышенная интенсивность формирования в клетках ацетил-КоА также способствует активации транскрипции генов *aceBAK* оперона [23]. Следует отметить, что исследуемые штаммы синтезировали значительные количества уксусной кислоты (табл. 3), что предполагало высокий уровень накопления в клетках ацетил-КоА, который, в отсутствие у клеток фосфотрансацетилазы Pta, ацетат киназы AskA и неспецифичной тиоэстеразы YciA, конвертировался в соответствующее производное под действием других клеточных ферментов, способных проявлять тиоэстеразную активность, таких как белки YciA, YbgC и YdiI с широкой субстратной специфичностью в отношении ацил-производных кофермента А [25–27]. Таким образом, с учетом того, что реакции глиоксилатного шунта, ведущие к формированию янтарной и яблочной кислот, протекают без промежуточного формирования сукцинил-КоА, расходуя вместе с тем его предшественник, изоцитрат, гены *aceBAK* оперона были делетированы в штаммах BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* *P_L-paaJ* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* *P_L-paaJ*. Также в штаммах был делетирован ген *glcB*, кодирующий малат синтазу G.

В результате введения в штаммы соответствующих генетических модификаций, секреция яблочной кислоты полученными производными BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fadE* *P_L-paaJ* Δ*aceBAK* Δ*glcB* и BOX3.3 Δ4 *P_{trc-id-4}-fabI* *P_L-paaJ* Δ*aceBAK* Δ*glcB* прекращалась, а накопление янтарной кислоты падало в четыре раза (табл. 3). При этом, штаммы синтезировали адипиновую кислоту в количествах, возросших в три раза (до ~0.3 мМ) на фоне резкого снижения формирования рекомбинантами масляной кислоты. Таким образом, инактивация глиоксилатного шунта способствовала биосинтезу рекомбинантами целевого соединения за счет обеспечения в клетках предпочтительной возможности формирования сукцинил-КоА в реакциях оксидативного ЦТК при исключении вовлечения предшественника в реакции, не связанные с образованием соответствующего тиоэфира. Действительно, сохраняющаяся секреция янтарной кислоты штаммами, лишенными активности глиоксилатного шунта указывала на формирование данного дикарбоксилата в ЦТК из сукцинил-КоА, образованного в результате действия 2-оксоглутарат дегидрогеназы. Вместе с тем, наблюдаемое остаточное формирование сконструированными штаммами масляной кислоты указывало на не полное вовлечение сукцинил-КоА

в реакции обращенного БОЖК. Это могло объясняться как неоптимальной субстратной специфичностью ферментов, вовлеченных в формирование целевого соединения, так и недостаточными уровнями их активности в клетке. В рамках подходов рациональной метаболической инженерии соответствующие проблемы могут быть решены как тонкой оптимизацией экспрессии целевых генов, так и выбором альтернативных генов-мишеней для их экспрессии в перспективных рекомбинантах.

В результате проведенных исследований сконструированы штаммы *E. coli* способные к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути БОЖК. Показано позитивное влияние инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез целевого соединения полученными рекомбинантами. Выявлена значимость внутриклеточной доступности сукцинил-КоА, сформированного в реакциях ЦТК для эффективного биосинтеза конечного продукта по обращенному БОЖК. Достигнуты уровни синтеза адипиновой кислоты, превосходящие соответствующие уровни синтеза масляной кислоты, одновременно формируемой штаммами по обращенному β-окислению жирных кислот без участия сукцинил-КоА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22-14-00040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lang M., Li H. // ChemSusChem. 2022. V. 15. № 1. e202101531. <https://doi.org/10.1002/cssc.202101531>
2. Skoog E., Shin J.H., Saez-Jimenez V., Mapelli V., Olsson L. // Biotechnol. Adv. 2018. V. 36. № 8. P. 2248–2263.
3. Thomas J.M., Raja R., Johnson B.F., O'Connell T.J., Sankar G., Khimyak T. // Chem. Commun. 2003. V. 21 № 10. P. 1126–1127.
4. Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y. // Metab. Eng. 2014. V. 23. P. 62–69.
5. Zhang H., Li Z., Pereira B., Stephanopoulos G. // Microb. Cell. Factories. 2015. V. 14. № 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0319-0>
6. Weber C., Brueckner C., Weinreb S., Lehr C., Essl C., Boles E. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 8421–8430.
7. Curran K.A., Leavitt J.M., Karim A.S., Alper H.S. // Metab. Eng. 2013. V. 15. P. 55–66.
8. Kallscheuer T., Gätgens J., Lübcke M., Pietruszka J., Bott M., Polen T. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. № 6. P. 2371–2382.
9. Yu J.L., Xia X.X., Zhong J.J., Qian Z.G. // Biotechnol. Bioeng. 2014. V. 111. № 12. P. 2580–2586.
10. Babu T., Yun E.J., Kim S., Kim D.H., Liu K.H., Kim S.R., Kim K.H. // Proc. Bioch. 2015. V. 50. № 12. P. 2066–2071.

11. Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R. // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 5. P. 556–561.
12. Zhao M., Huang D., Zhang X., Koffas M.A.G., Zhou J., Deng Y. // Metab. Eng. 2018. V. 47. P. 254–262.
13. Park S.J., Chao G., Gunsalus R.P. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 4138–4142.
14. Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Morzhakova A.A., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2013. V. 35. № 4. P. 577–583.
15. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 4. С. 330–337.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
18. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
19. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
20. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
21. Vemuri G.N., Altman E., Sangurdekar D.P., Khodursky A.B., Eiteman M.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 3653–3661.
22. Laporte D.C., Stueland C.S., Ikeda T.P. // Biochimie. 1989. V. 71. № 9–10. P. 1051–1057.
23. Cronan J.E., Laporte D. // Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass, in: Neidhardt F. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Washington: ASM Press, 1996. P. 206–216.
24. Waegeman H., Beauprez J., Moens H., Maertens J., De Mey M., Foulquié-Moreno M.R., Heijnen J.J., Charlier D., Soetaert W. // BMC Microbiol. 2011. V. 11. № 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-70>
25. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
26. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
27. Chen M., Ma X., Chen X., Jiang M., Song H., Guo Z. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 12. P. 2768–2775.

Effect of the Glyoxylate Shunt Inactivation on Biosynthesis of Adipic Acid Through the Inverted Fatty Acid β -oxidation by *Escherichia coli* Strains

A. Yu. Gulevich^{a,*}, A. Yu. Skorokhodova^a, and V. G. Debabov^a

^a Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

Using *Escherichia coli* MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *fadE*, P_L-SD₁₀-*atoB*, P_{irc-ideal-4}-SD₁₀-*fadB*, P_L-SD₁₀-*tesB*, Δ *yciA* as a core strain, the derivatives capable of synthesizing adipic acid from glucose through the inverted fatty acid β -oxidation pathway were obtained. Biosynthesis of the target compound by recombinants was ensured upon the primary condensation of acetyl-CoA and succinyl-CoA by 3-oxoacyl-CoA thiolase PaaJ and the catalysis of the final reaction of the cycle by acyl-CoA dehydrogenases FadE and FabI. Deletion in the strains of *sucCD* genes encoding components of succinyl-CoA synthase did not increase the relative intracellular availability of succinyl-CoA for target biosynthetic reactions and did not lead to an increase in adipic acid accumulation by the recombinants. The secretion of succinic and malic acids by the strains with an impaired tricarboxylic acid cycle remained almost unchanged, indicating the activity in the cells of glyoxylate shunt reactions that compete with the cycle reactions for isocitrate, required for succinyl-CoA formation. When isocitrate lyase, malate synthases A and G, and bifunctional kinase/phosphatase isocitrate dehydrogenase were inactivated in strains due to deletion of the *aceBAK* operon genes and *glcB*, adipic acid synthesis by recombinants increased threefold and reached 0.33 mM.

Keywords: adipic acid, *Escherichia coli*, fatty acid β -oxidation, glyoxylate shunt, metabolic engineering, succinyl-CoA