

УДК 577.121

ОПТИМИЗАЦИЯ АЭРОБНОГО СИНТЕЗА ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli* ПО ВАРИАНТУ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ОПОСРЕДОВАННОМУ ДЕЙСТВИЕМ 2-КЕТОГЛУТАРАТ-ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

© 2023 г. А. Ю. Скороходова¹*, А. Ю. Гулевич¹, В. Г. Дебабов¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”

Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Оптимизирован биосинтез янтарной кислоты из глюкозы ранее сконструированным штаммом *E. coli* SUC1.0 (pMW119-*kgd*) (MG1655 Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *ptsG*, P_{Lglk} , $P_{tacgalP}$, Δ *aceBAK*, Δ *glcB*, Δ *sdhAB*, pMW119-*kgd*). Выход целевого вещества повышен при активации в штамме варианта цикла трикарбонных кислот, опосредованного действием гетерологичной 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, за счет интенсификации анаплеротического формирования щавелевоуксусной кислоты. Инактивация в штамме неспецифичной тиоэстеразы *YciA* не оказывала значимого влияния на биосинтетические характеристики продуцента. Повышение экспрессии нативной фосфоенолпируваткарбоксилазы обеспечивало рост выхода целевого соединения рекомбинантом, синтезирующим янтарную кислоту в реакциях природного цикла трикарбонных кислот, с 25 до 42%, и с 67 до 75% при индуцированной экспрессии 2-кетоглутарат-декарбоксилазы *Mycobacterium tuberculosis*. Экспрессия в штамме гена пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis* приводила к росту выхода янтарной кислоты до 84%. Функционируя в режиме полноклеточного биокатализатора, сконструированный штамм SUC1.0 P_{L-pucA} (pMW119-*kgd*) демонстрировал коэффициент конверсии субстрата в целевой продукт, достигающий 93%, приближающийся к теоретическому максимуму.

Ключевые слова: 2-кетоглутарат декарбоксилаза, анаплеротические пути, оксидативная ветвь ЦТК, полуальдегид янтарной кислоты, янтарная кислота, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109923060168, **EDN:** CXMYQU

Янтарная кислота является перспективным “строительным блоком” для получения таких промышленно значимых химикатов как 1,4-бутандиол, малеиновый ангидрид, сукцинимид, 2-пирролидон и тетрагидрофуран [1]. В свою очередь, эти соединения служат удобными предшественниками для крупнотоннажного синтеза целого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая растворители, полимеры, в том числе биodeградируемые пластики, пластификаторы и фармацевтические субстанции [2].

В настоящее время янтарная кислота производится, в основном, нефтехимическим синтезом. Тем не менее, являясь интермедиатом центрального метаболизма множества живых организмов, янтарная кислота может быть получена в результате микробиологического синтеза из возобновляемого сырья. В частности, с использованием

такого доступного и широко распространенного субстрата, как сахара растительной биомассы.

Природными продуцентами янтарной кислоты являются облигатно или же факультативно анаэробные бактерии *Actinobacillus succinogenes* [3], *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [4] и *Mannheimia succiniciproducens* [5], способные эффективно превращать глюкозу в янтарную кислоту в отсутствие аэрации. Однако культивирование и выращивание этих бактерий требует использования дорогостоящих комплексных питательных сред, что резко ограничивает возможность экономически оправданного применения природных продуцентов в промышленном производстве янтарной кислоты. Вместе с тем, в последние годы значительный прогресс был достигнут в создании эффективных рекомбинантных продуцентов янтарной кислоты на основе таких традиционных для промышленной биотехнологии микроорганизмов,

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P2	5'-atgtatatctccttcacggccaatgcttcgttc-3'
P3	5'-gacattactacgcaatgcggaatattgttcgtcat-atgtatatctccttc-acggccaatg-3'
P4	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P5	5'-ggctatcaaacgataagatgggggtgtctggggaatcgctcaagttagataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-gacgtcaccgcttttacgtg-3'
P7	5'-gcgttcaagaatgtgtctc-3'

как *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli* [6]. С учетом развитости доступного генно-инженерного инструментария, нетребовательности к компонентам питательных сред и глубокой изученности метаболизма, клетки *E. coli* представляются наиболее перспективным объектом для создания высокоэффективных рекомбинантных продуцентов соответствующего дикарбоксилата.

В отличие от бактерий рубца, *E. coli* способна синтезировать янтарную кислоту в качестве основного продукта утилизации углеродного субстрата как в анаэробных, так и в аэробных условиях [7]. Основными путями биосинтеза янтарной кислоты в клетках *E. coli* служат реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и глиокислотного шунта (ГШ). При анаэробии максимальные уровни конверсии субстрата в целевой продукт достигаются в результате совместного действия восстановительной ветви ЦТК и ГШ [8], тогда как в присутствии кислорода эффективный синтез целевого продукта достигается при его предпочтительном формировании через ГШ, а не по оксидативной ветви ЦТК [9]. В первую очередь, это связано с ограниченным потоком углерода через 2-кетоглутарат к сукцинил-КоА и янтарной кислоте в силу сниженной активности 2-кетоглутарат-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.105) *E. coli* при выращивании клеток в богатых и содержащих глюкозу средах [10].

Ранее было показано, что эффективное аэробное формирование таких интермедиатов ЦТК, как янтарная [11], фумаровая [12] и яблочная [13] кислоты без участия ГШ возможно при обеспечении в клетках *E. coli* функционирования варианта оксидативного ЦТК, обнаруженного у мико- [14] и цианобактерий [15]. Функциональность данного варианта ЦТК опосредована действием отсутствующей у *E. coli* 2-кетоглутарат-декарбоксилазы (КФ 4.1.1.71) и предполагает обход реакции, катализируемой 2-кетоглутарат-дегидрогеназой, которая, в свою очередь, отсутствует или же неактивна у мико- и цианобактерий, в результате шунтирования 2-кетоглутарата к янтарной кислоте через промежуточное формирование сукцинат по-

луальдегида. В случае фумаровой и яблочной кислот, выходы этих дикарбоксилатов из глюкозы, приближенные к теоретическим максимумам (0.86 моль/моль и 0.94 моль/моль, соответственно), были достигнуты в результате дерепрессии цепи переноса электронов и ассоциированной сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1). Соответствующий ферментативный комплекс был инактивирован в штамме-продуcente янтарной кислоты и достигнутый относительно невысокий выход целевого вещества (0.67 моль/моль), сопряженный с заметной секрецией побочных продуктов, был, по-видимому, обусловлен дисбалансом в формировании ключевых предшественников ЦТК, щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) и ацетил-КоА.

Цель работы — оптимизация биосинтеза янтарной кислоты из глюкозы рекомбинантным штаммом *E. coli*, способным к формированию целевого соединения по варианту цикла трикарбоновых кислот, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы.

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 электрофорезом 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. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655 Δ ackA-pta, Δ poxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_{glk}, P_{lac}galP, Δ aceBAK, Δ glcB, Δ sdhAB [11], обозначенный как SUC1.0, обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы и лишенный путей смешанно-кислотного брожения, глиоксилатно-

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
SUC1.0	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$	[11]
SUC1.0 $\Delta yciA$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$, $\Delta yciA$	Данная работа
SUC1.0 P_L -ppc	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$, P_L -SD _{φ10} -ppc	Данная работа
SUC1.0 P_L -pusA	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$, $poxB::P_L$ -pusA ^{Bs}	Данная работа
Плазмида		
pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , $\lambda attL$ -cat- $\lambda attR$	[18]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P_{araB} - λgam -bet-exo	[17]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P_R - λxis -int, cIts857	[20]
pMW119-kgd	pMW119 с клонированным геном 2-кетоглутарат декрабоксилазы (<i>kgd</i>) <i>M. tuberculosis</i>	[21]

го шунта и возможности аэробной конверсии янтарной кислоты в фумаровую, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Бактерии культивировали, используя богатые 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 *ppc* искусственным генетическим элементом P_L -SD_{φ10}, 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 *ppc*.

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 *ppc*. 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 *ppc*, был получен ПЦР с использованием праймеров P4 и P5 и плазмиды pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$) [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 *ppc*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P6 и P7.

Индивидуальные генетические модификации вводили в состав хромосом целевых рекомбинантных штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае инактивации гена *yciA* и интеграции на место гена *poxB* гена *pusA* *B. subtilis* под контролем промотора P_L фага лямбда, использовали ранее полученные препараты P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [19, 12]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с ис-

пользованием 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. Полученные ночные культуры (5 мл) разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 9 г/л (50 мМ) глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 2.5 г/л NaHCO₃. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Индукцию экспрессии гена *kgd*, находящегося под контролем LacI-зависимого промотора, осуществляли добавлением изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ через 2.5 ч после начала инкубации.

Двухстадийное культивирование осуществляли следующим образом. Для первоначального накопления биомассы клетки выращивали, как описано выше, и собирали центрифугированием в течение 15 мин при 2000 g и 4°C. Осадок ресуспендировали в 50 мл модифицированной среды M9, лишенной ионов аммония, содержащей 10 г/л глюкозы, 2.5 г/л NaHCO₃ и, при необходимости, 1 мМ ИПТГ. В дальнейшем культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками, на роторной качалке при 250 об./мин и 37°C в течение 19 ч. Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин и в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз. Для сохранения в штаммах плазмиды pMW119-*kgd* [21] все среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина (“Синтез”, Россия).

Аналитические методы. Концентрации органических кислот и глюкозы в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ, как описано ранее [13]. Использовали систему “Waters” HPLC system (США), укомплектованную УФ-или рефрактивным детектором, а также ион-эксклюзионной колонкой Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (“Phenomenex”, США) или обращенно-фазовой колонкой Spherisorb-NH2 (“Waters”, США) соответственно. В качестве подвижных фаз использовали 2.5 мМ водный раствор серной кислоты или смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75:25 об./об. Углеродный баланс рассчитан как выраженное в % отношение общего количества молей углерода в сформированных продуктах (с учетом потерь CO₂ в ЦТК) к количеству молей углерода потребленной глюкозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее сконструированный штамм *E. coli* SUC1.0 (pMW119-*kgd*) (табл. 1) был способен к аэробному синтезу янтарной кислоты из глюкозы как в результате действия оксидативной ветви природного ЦТК, так и при активации в клетках, в результате индукции экспрессии гена *kgd M. tuberculosis*, модифицированного варианта цикла. При этом, биосинтез янтарной кислоты по нативному ЦТК обеспечивал конверсию субстрата в целевой продукт на уровне ~25% и сопровождался секрецией значительных количеств пировиноградной кислоты, тогда как функционирование варианта ЦТК опосредованного действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы обеспечивало выход янтарной кислоты, достигающий 67%, с формированием уксусной кислоты в качестве основного побочного продукта утилизации глюкозы (табл. 3, рис. 1). С учетом инактивации в штамме основных ферментов, ответственных за конверсию в уксусную кислоту пировиноградной кислоты и ацетил-КоА, пируватоксидазы (КФ 1.2.3.3.), фосфотрансацилазы (КФ 2.3.1.8) и ацетаткиназы (КФ 2.7.2.1), последнее могло быть обусловлено действием неспецифичных тиоэстераз при избыточном формировании в клетках ацетил-КоА. Клетки *E. coli* природно обладают как минимум восемью тиоэстеразами, способными гидролизовать тиоэфирную связь молекул ацил-КоА с образованием соответствующих карбоновых кислот. Среди них, неспецифичная тиоэстераза YciA проявляла максимальную активность в отношении ацетил-КоА [22].

Инактивация в штамме SUC1.0 (pMW119-*kgd*) гена *yciA* не оказывала выраженного влияния на синтез производным штаммом SUC1.0 Δ*yciA* (pMW119-*kgd*) янтарной кислоты ни по нативному, ни по модифицированному ЦТК. Выходы целевого соединения, демонстрируемые штаммом, повышались лишь до ~26 и ~69%, соответственно, при сравнимом снижении уровня синтеза уксусной кислоты (табл. 3, рис. 1).

Ацетил-КоА вовлекается в реакции ЦТК при конденсации с ЩУК. Таким образом, избыточное формирование ацетил-КоА, ведущее к секреции штаммом уксусной кислоты, могло свидетельствовать о недостаточном уровне синтеза в клетках ЩУК. Основным анаплеротическим ферментом *E. coli*, ответственным за формирование ЩУК является фосфоенопируваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31), превращающая в соответствующее вещество фосфоенолпируват (ФЕП). Для интенсификации синтеза ЩУК в штамме SUC1.0 (pMW119-*kgd*) экспрессия гена *pps*, кодирующего фосфоенолпируваткарбоксилазу, была усилена за счет замены его природной регуляторной области искусственным генетическим элементом, содержащим сильный конститутивный промотор P_L фага лямбда и эф-

Таблица 3. Молярные выходы метаболитов, секретированных исследованными штаммами при аэробной утилизации глюкозы*

Штамм	ИПТГ	Выход метаболитов, моль/моль, %			Углеродный баланс, %
		пировиноградная кислота	уксусная кислота	янтарная кислота	
SUC1.0	—	78.9 ± 0.9	14.1 ± 0.5	24.9 ± 0.6	69
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	20.6 ± 0.9	67.2 ± 0.9	74
SUC1.0 <i>ΔycaA</i>	—	76.0 ± 1.2	11.8 ± 0.4	26.2 ± 0.5	68
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	17.5 ± 0.6	69.4 ± 1.1	75
SUC1.0 P _L - <i>ppc</i>	—	29.2 ± 0.4	15.0 ± 0.7	42.4 ± 0.8	62
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	3.9 ± 0.3	75.6 ± 1.2	77
SUC1.0 P _L - <i>pusA</i>	—	22.3 ± 0.5	14.6 ± 0.6	49.0 ± 0.8	65
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	3.0 ± 0.2	83.8 ± 1.6	85
SUC1.0 P _L - <i>pusA</i>	—	17.8 ± 0.6	11.4 ± 0.5	52.9 ± 1.0	66
(pMW119- <i>kgd</i>) **	+	4.4 ± 0.2	—	92.8 ± 1.9	95

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. ** При функционировании штамма в режиме полноклеточного биокатализатора.

фективный сайт связывания рибосом гена *φ10* из фага T7.

Выход янтарной кислоты, синтезированной соответствующим производным штаммом SUC1.0 P_L-*ppc* (pMW119-*kgd*) из глюкозы по оксидативной ветви нативного ЦТК, повышался с 26 до ~42%, в первую очередь за счет выраженного снижения секреции рекомбинантом пировиноградной кислоты (табл. 3, рис. 1). При этом конверсия штаммом субстрата в целевой продукт с участием модифицированного варианта цикла возрастала не столь значительно (с 69 до 75%), но это сопровождалось резким падением формирования штаммом уксусной кислоты (табл. 3, рис. 1).

Таким образом, интенсификация анаэробного формирования ЩУК оказывала позитивный эффект на формирование штаммом янтарной кислоты как по оксидативной ветви нативного ЦТК, так и по варианту цикла, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы. Тем не менее, значимая остаточная секреция пировиноградной кислоты штаммом SUC1.0 P_L-*ppc* (pMW119-*kgd*) в отсутствие индукции экспрессии гена *kgd*, указывала на возможность дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик штамма за счет оптимизации распределения потоков углерода в метаболическом узле ЩУК — ФЕП — пировиноградная кислота — ацетил-КоА.

В клетках *E. coli* фосфоенолпируваткарбоксилаза конкурирует за общий метаболит-предшественник ФЕП с гликолитическими пируваткиназами PycA и PycF (КФ 2.7.1.40), синтезирующими пировиноградную кислоту, необходимую для дальнейшего образования ацетил-КоА. Следовательно, несмотря на то, что внутриклеточная

доступность ФЕП для биосинтеза ЩУК под действием фосфоенолпируваткарбоксилазы была повышена в штамме SUC1.0 (pMW119-*kgd*) в результате обеспечения ФЕП-независимого транспорта и фосфорилирования глюкозы [11], наблюдаемая в определенных условиях секреция базовым штаммом и его производными пировиноградной кислоты указывала на высокую активность в рекомбинантах пируваткиназы.

У многих организмов анаэробное формирование ЩУК возможно в результате прямого карбоксилирования пировиноградной кислоты [23]. Однако у *E. coli* активность соответствующего фермента, пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1), отсутствует. Вместе с тем было показано, что экспрессия гетерологичной пируваткарбоксилазы в рекомбинантных штаммах *E. coli* способствовала как анаэробному, так и аэробному синтезу ими четырехуглеродных дикарбоновых кислот — интермедиатов ЦТК в результате эффективного туннелирования в реакции цикла гликолитически сформированной пировиноградной кислоты [12, 13, 24]. Соответственно, ген *pusA* *B. subtilis*, кодирующий пируваткарбоксилазу, был интегрирован в хромосому штамма SUC1.0 (pMW119-*kgd*) под контролем промотора P_L фага лямбда на место ранее инактивированного гена *roxB*.

Штамм SUC1.0 P_L-*pusA* (pMW119-*kgd*) конвертировал глюкозу в янтарную кислоту в реакциях нативного или же модифицированного ЦТК с выходами, возросшими до 49 и ~84% соответственно (табл. 3, рис. 1). Наряду с этим, снижение уровня накопления штаммом пировиноградной и уксусной кислот было несколько более выраженным по сравнению со штаммом SUC1.0 P_L-*ppc* (pMW119-*kgd*). По-видимому, это являлось след-

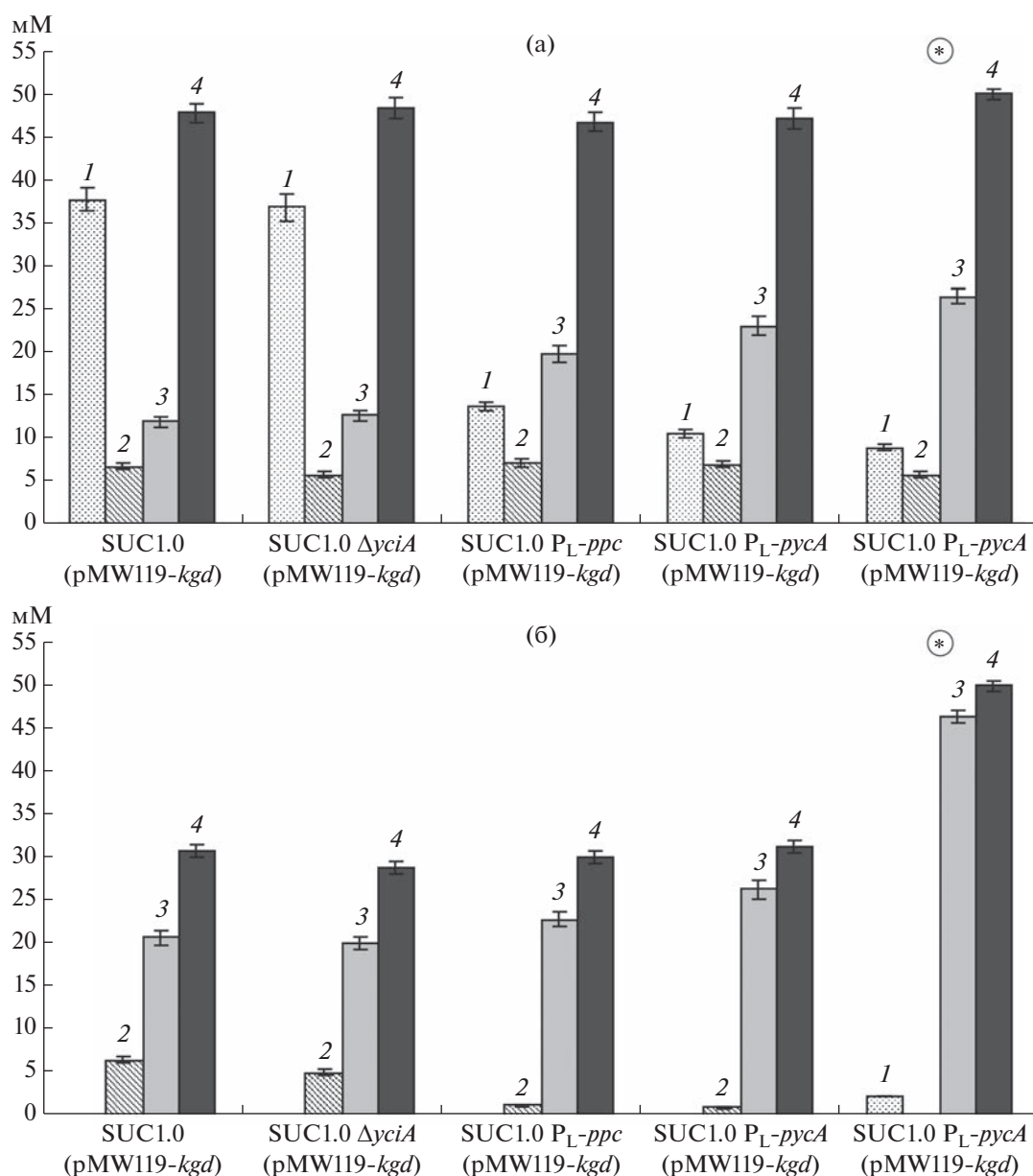


Рис. 1 Концентрации метаболитов и потребленной сконструированными штаммами глюкозы (мМ) в отсутствие (а) и присутствии (б) в среде ИПТГ: 1 – пируват, 2 – ацетат, 3 – сукцинат, 4 – глюкоза. *При функционировании штамма SUC1.0 P_L-psyA (pMW119-kgd) в режиме полноклеточного биокатализатора.

ствием возникновения в штамме прямой конкуренции за общий предшественник, пировиноградную кислоту, между пируваткарбоксилазой, формирующей ЦУК, и пируватдегидрогеназой, ответственной за образование ацетил-КоА.

При этом, значение углеродного баланса, демонстрируемого штаммом SUC1.0 P_L-psyA (pMW119-kgd) в ходе синтеза янтарной кислоты из глюкозы по варианту ЦТК, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, возросло до 85% (табл. 3). Это указывало на интенсификацию цикла в клетках рекомбинанта и на усиление по-

тока углерода через 2-кетоглутарат к янтарной кислоте через сукцинат полуальдегид.

Следует отметить, что значения углеродного баланса, демонстрируемые всеми сконструированными штаммами, не достигали 100% в результате эффекта избыточного метаболизма глутаминовой кислоты ("glutamate overflow") [25, 26]. Этот эффект проявляется в *E. coli*, когда поток углерода через ЦТК превосходит каталитические возможности экспрессированной клеткой 2-кетоглутарат-дегидрогеназы, приводя к формированию из избыточных количеств 2-кетоглутарата

глутаминовой кислоты вместо сукцинил-КоА. Как упоминалось выше, известно, что при росте в средах содержащих глюкозу, экспрессия генов *sucAB*, кодирующих компоненты 2-кетоглутарат-дегидрогеназного ферментативного комплекса, в клетках *E. coli* резко снижена [10]. Соответственно, эффект был более выраженным в случае синтеза штаммами янтарной кислоты по оксидативной ветви нативного ЦТК, обуславливая меньшие значения углеродного баланса. Так как концентрации секретированной штаммами глутаминовой кислоты не определялись в данном исследовании, повышенные показатели углеродного баланса, демонстрируемые рекомбинантами, экспрессирующими гетерологичную 2-кетоглутарат-декарбоксилазу, очевидно были обусловлены ростом вклада в расчетные значения детектированных продуктов утилизации глюкозы, в первую очередь янтарной кислоты.

В этой связи, важным представлялось то, что клетки *E. coli* способны использовать 2-кетоглутарат и, в некоторых случаях, глутаминовую кислоту в качестве единственных источников углерода. Таким образом, соответствующие соединения, секретированные штаммом SUC1.0 *P_L-pusA* (pMW119-*kgd*) в ходе биосинтеза янтарной кислоты, потенциально могли бы быть реассимилированы им после истощения в среде предпочтительного источника углерода — глюкозы. Подобной реассимиляции могли бы способствовать как продление времени культивирования, так и реализация процесса двухстадийной ферментации. Соответствующий процесс предполагает накопление биомассы штамма-продуцента на первой стадии с последующей биосинтетической стадией, в которой штамм функционирует в режиме полноклеточного биокатализатора, эффективно конвертируя субстрат в целевой продукт в отсутствие роста. При этом, проведение двухстадийной ферментации представлялось более предпочтительным вариантом, так как вторая биосинтетическая стадия могла быть реализована в среде лишенной ионов аммония, что исключало бы синтез штаммом глутаминовой кислоты, способствуя, напротив, накоплению легкоусвояемого *E. coli* [27] 2-кетоглутарата.

При функционировании в режиме полноклеточного биокатализатора, биосинтетические характеристики штамма SUC1.0 *P_L-pusA* (pMW119-*kgd*), формирующего янтарную кислоту по оксидативной ветви нативного ЦТК, значимо не отличались от таковых, продемонстрированных при синтезе целевого вещества сопряженном с ростом (табл. 3, рис. 1). Значение углеродного баланса оставалось практически неизменным, указывая на невозможность эффективной реассимиляции штаммом 2-кетоглутарата с направлением его к янтарной кислоте под действием 2-кетоглутарат-дегидрогеназы и сукцинил-КоА синтазы. Вместе с тем, в случае функционирования в штамме варианта

ЦТК, опосредованного действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, выход целевого вещества, сформированного штаммом из глюкозы, повышался до ~93%. Рекомбинант потреблял всю доступную глюкозу и, при этом, значение рассчитанного углеродного баланса возрастало до 95%, указывая на фактически исчерпывающую конверсию углеродного субстрата в секретированные продукты. Также, соответствующее изменение значений углеродного баланса и выхода янтарной кислоты свидетельствовало об эффективном потреблении штаммом секретированного в ходе утилизации глюкозы 2-кетоглутарата с его последующим превращением в целевое соединение.

В результате проведенного исследования был оптимизирован биосинтез янтарной кислоты из глюкозы ранее сконструированным рекомбинантным штаммом *E. coli*, способным к формированию целевого соединения по варианту ЦТК, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы. Улучшению биосинтетических характеристик рекомбинанта в первую очередь поспособствовала интенсификация в клетках анаэробного формирования ЦУК из пирувиноградной кислоты под действием гетерологичной пируваткарбоксилазы. Сконструированный штамм SUC1.0 *P_L-pusA* (pMW119-*kgd*) был способен к аэробной конверсии глюкозы в янтарную кислоту с выходом, составляющим ~93% и практически достигающим теоретического максимума. Полученный рекомбинант может служить в качестве эффективного полноклеточного биокатализатора для получения янтарной кислоты из возобновляемого растительного сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazzoli R. // Fermentation. 2021 V. 7. № 4. 248. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040248>
2. Escanciano I.A., Wojtusik M., Esteban J., Ladero M., Santos V.E. // Fermentation. 2022. V. 8. № 8. 368. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080368>
3. Guettler M.V., Rumler D., Jain M.K. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 207–216.
4. Nghiem N.P., Davison B.H., Suttle B.E., Richardson G.R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1997. V. 63–65. P. 565–576.
5. Lee P.C., Lee S.Y., Hong S.H., Chang H.N. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 5. P. 663–668.
6. Liu X., Zhao G., Sun S., Fan C., Feng X.m., Xiong P. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V. 10. 843887. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.843887>
7. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2012. № 2. С. 8–20.
8. Skorokhodova A.Y., Morzhakova A.A., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // J. Biotechnol. 2015. V. 214. P. 33–42.
9. Lin H., Bennett G.N., San K.Y. // Metab. Eng. 2005. V. 7. № 2. P. 116–127.

10. Park S.J., Chao G., Gunsalus R.P. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 13. P. 4138–4142.
11. Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
12. Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. e00703. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00703>
13. Skorokhodova A.Y., Stasenko A.A., Krasilnikova N.V., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // Fermentation. 2022. V. 8. № 12. 738. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120738>
14. Tian J., Bryk R., Itoh M., Suematsu M., Nathan C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 30. P. 10670–10675.
15. Zhang S., Bryant D.A. // Science. 2011. V. 334. № 6062. P. 1551–1553.
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. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
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. Гулевич А.Ю., Сконечный М.С., Сухоженко А.В., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2015. № 2. С. 46–54.
22. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moya M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
23. Jitrapakdee S., St. Maurice M., Rayment I., Cleland W.W., Wallace J.C., Attwood P.V. // Biochem. J. 2008. V. 413. № 3. P. 369–387.
24. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2018. Т. 34. № 2. С. 18–25.
25. Chang D.E., Shin S., Rhee J.S., Pan J.G. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 21. P. 6656–6663.
26. Burgard A., Burk M.J., Osterhout R., Van Dien S., Yim H. // Curr. Opin. Biotechnol. 2016. V. 42. P. 118–125.
27. Seol W., Shatkin A.J. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 9. P. 6409–6413.

Optimization of Aerobic Synthesis of Succinic Acid from Glucose by Recombinant *Escherichia coli* Strains Through the Variant Tricarboxylic Acid Cycle Mediated by the Action of 2-ketoglutarate-decarboxylase

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

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

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

The biosynthesis of succinic acid from glucose by the previously engineered *E. coli* strain SUC1.0 (pMW119-*kgd*) (MG1655 Δ ackA-pta, Δ poxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_Lglk, P_{tac}galP, Δ aceBAK, Δ glcB, Δ sdhAB, pMW119-*kgd*) was optimized. The yield of the target substance was increased, upon the activation in the strain of the variant tricarboxylic acid cycle, mediated by the action of heterologous 2-ketoglutarate decarboxylase, due to the intensification of the anaplerotic formation of oxaloacetic acid. Inactivation of the nonspecific thioesterase YciA in the strain did not considerably change the biosynthetic characteristics of the producer. The enhancement of the expression of native phosphoenolpyruvate carboxylase led to an increase in the yield of the target compound by the recombinant synthesizing succinic acid via the reactions of the native tricarboxylic acid cycle from 25 to 42%, and from 67 to 75% upon the induced expression of *Mycobacterium tuberculosis* 2-ketoglutarate decarboxylase. Expression in the strain of pyruvate carboxylase gene from *Bacillus subtilis* resulted in an increase in the yield of succinic acid up to 84%. Functioning in whole-cell biocatalyst mode, the engineered strain SUC1.0 P_L-*pycA* (pMW119-*kgd*) demonstrated a substrate to target product conversion ratio reaching 93%, approaching the corresponding theoretical maximum.

Keywords: 2-ketoglutarate decarboxylase, anaplerotic pathways, oxidative branch of the TCA cycle, succinate semialdehyde, succinic acid, *Escherichia coli*