

УДК 577.121

БИОСИНТЕЗ СУБЕРИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ β -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli*

© 2025 г. А. Ю. Гулевич^{1,*}, А. Ю. Скороходова¹, В. Г. Дебабов¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

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

Поступила в редакцию 15.10.2024 г.

После доработки 07.11.2024 г.

Принята к публикации 12.11.2024 г.

С использованием направленно сконструированных производных ранее полученных адипат-продуцирующих штаммов *Escherichia coli* MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, Δ *fadE*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fabI*, P_L-SD_{φ10}-*paaJ*, Δ *aceBAK*, Δ *glcB* и MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadE*, P_L-SD_{φ10}-*paaJ*, Δ *aceBAK*, Δ *glcB* продемонстрирована принципиальная возможность биосинтеза этой бактерией субериновой кислоты из глюкозы в результате обращения природного пути β -окисления жирных кислот. Конденсация ацетил-КоА с сукцинил-КоА и адипил-КоА обеспечивалась в рекомбинантах 3-оксоадипил-КоА тиолазой PaaJ, тогда как предполагаемая ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза YqeF была неспособна к катализу соответствующих реакций. Биосинтез субериновой кислоты на уровне ~60 мкМ был достигнут при значительном усилении в штаммах экспрессии гена бифункциональной (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-редуктазы, *fadB*. Последующая инактивация в штаммах сукцинатдегидрогеназы повышала внутриклеточную доступность сукцинил-КоА для инициации первого раунда обращения цикла и способствовала росту накопления рекомбинантами целевого соединения до ~75 мкМ. Полученные результаты создают основу для разработки высокоэффективных штаммов-продуцентов для биотехнологического производства субериновой кислоты из возобновляемого сырья.

Ключевые слова: β -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, субериновая кислота, тиолаза, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109925020031 EDN: ENTNEQ

Обращенное β -окисление жирных кислот (БОЖК) представляет собой гибкую биохимическую платформу для получения с помощью микробиологического синтеза широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью из возобновляемого растительного сырья [1]. При функционировании в биосинтетическом направлении, реакции соответствующего консервативного для множества организмов и исходно деградационного пути протекают через последовательное формирование 3-кетосукцил-КоА, 3-гидроксиацил-КоА, еноил-КоА и ацил-КоА, катализируемое ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазой (КФ 2.3.1.9/16), бифункциональной (S)-3-гидроксиа-

цил-КоА-дегидрогеназой/еноил-КоА-редуктазой (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17) и ацил-КоА дегидрогеназой (КФ 1.3.8.-) [2, 3]. Таким образом, при гидролизе или же восстановлении тиоэфирной связи соответствующих КоА-интермедиатов пути, под действием тех или иных тиоэстераз, или акоголь-/альдегид дегидрогеназ, конечными продуктами биосинтеза могут являться карбоновые кислоты, их кето- и гидрокси-производные, одно- и двухатомные спирты. При этом итеративная природа цикла позволяет получать в качестве целевых производных соединения с варьирующейся длиной углеродной цепи. Действительно, в последние годы, с использованием

принципа функционального обращения БОЖК, были сконструированы штаммы промышленно значимых микроорганизмов, в первую очередь *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*, способные к биосинтезу из глюкозы или глицерина алифатических спиртов, в диапазоне от н-бутанола [4, 5] до н-деканола [6, 7], C6–C10 насыщенных [8], C6–C10 ненасыщенных [9] и C4–C8 3-гидрокси-функционализированных карбоновых кислот [10]. Вместе с тем, первичная недекарбоксилирующая Кляйзеновская конденсация, инициирующая обращенный цикл, потенциально может вовлекать в качестве затравочных молекул не только ацетил-КоА, но и иные КоА-производные обладающие схожей структурой, такие как гликолил-КоА, пропионил-КоА, сукцинил-КоА и другие [11]. В результате спектр потенциальных продуктов платформенного пути может быть кратно расширен. В частности, при вовлечении сукцинил-КоА в первичную конденсацию с ацетил-КоА, терминальным продуктом однократного обращения цикла, и последующего гидролиза, будет служить адипиновая кислота. При этом, адипиновая кислота, обладающая рынком по объему превышающим 3.5 млн т/год [12], является продуктом однократного обращения цикла, тогда как последующим производным, формирующимся при повторном обращении цикла в результате конденсации адипил-КоА и ацетил-КоА, является субериновая кислота. С практической точки зрения, субериновая кислота представляет собой важный увлажняющий компонент косметических композиций и смазочный агент моторных масел [13]. Таким образом, возможность биосинтетического получения субериновой кислоты из простых сахаров растительной биомассы представляет несомненный практический интерес. Ранее, принципиальная возможность синтеза детектируемых количеств субериновой кислоты из глицерина клетками направленно сконструированного штамма *E. coli* была продемонстрирована при оверэкспрессии в рекомбинанте генов пути деградации дикарбоновых кислот из *Acinetobacter* sp. ADP1 [11]. Вместе с тем, нами была выявлена способность клеток *E. coli* к синтезу предшествующего компонента, адипиновой кислоты, по обращенному БОЖК при усилении экспрессии в целевом штамме только нативных генов [14].

Цель работы — оценка способности направленно сконструированных штаммов *E. coli* к биосинтезу субериновой кислоты из глюкозы по обращенному природному пути β-окисления жирных кислот.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазу BglII, 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 производства “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* AdiBOX1.0, AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* [15], и BOX3.3 Δ4 P_{trc-id-4}-*fadE* P_L-*paal* Δ*aceBAK* Δ*glcB* [14], обозначенный как AdiBOX1.1, с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β-окисления жирных кислот, еноил-ацилпереноса белок (АПБ)-редуктазу, 3-оксоадипил-КоА-тиолазу и тиоэстеразу II, а также лишенные путей смешанно-кислотного брожения, глиоксилатного шунта и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов.

Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. 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. Целевые штаммы, производные штаммов AdiBOX1.0, AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* и AdiBOX1.1, с инактивированными генами *sdhAB*, природной регуляторной областью гена *fadB* замененной искусственным генетическим элементом P_L-SD_{φ10} и геном *pusA* *B. subtilis*, инте-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgcc-3'
P2	5'-atgtatatctccttcacggccaatgcttcgttc-3'
P3	5'-tgccgtaacgccccgacaacacgtctttcat-atgtatatctccttc-acggccaatg-3'
P4	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttatactaagttgg-3'
P5	5'-atttactattgcactgttaattggtgcgaggttg-3'-cgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-tggttgcaaaccttacgtgcc-3'
P7	5'-accaagttccacggcggaatg-3'

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
AdiBOX 1.0	<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>	[15]
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pycA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs}	[15]
AdiBOX 1.1	<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>	[14]
AdiBOX 1.1 P _L - <i>pycA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs}	Данная работа
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pycA</i> P _L - <i>yqeF</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs} , P _L -SD _{φ10} - <i>yqeF</i>	Данная работа
AdiBOX 1.1 P _L - <i>pycA</i> P _L - <i>yqeF</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs} , P _L -SD _{φ10} - <i>yqeF</i>	Данная работа
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pycA</i> P _L - <i>fadB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _L -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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs}	Данная работа
AdiBOX 1.1 P _L - <i>pycA</i> P _L - <i>fadB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _L -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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs}	Данная работа
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pycA</i> P _L - <i>fadB</i> Δ <i>sdhAB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _L -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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs} , Δ <i>sdhAB</i>	Данная работа
AdiBOX 1.1 P _L - <i>pycA</i> P _L - <i>fadB</i> Δ <i>sdhAB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _L -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> , <i>poxB</i> ::P _L - <i>pycA</i> ^{Bs} , Δ <i>sdhAB</i>	Данная работа
Плазмида		
pMW118-(<i>λattL</i> -Cm- <i>λattR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>λattL-cat-λattR</i>	[20]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - <i>λgam-bet-exo</i>	[19]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - <i>λxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[21]

грированным на место гена *roxB* под контролем промотора P_L фага лямбда, были получены посредством P1-зависимых трансдукций [16] с использованием ранее полученных препаратов P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [10, 17, 18]. Замену в хромосоме *E. coli* нативной регуляторной области гена *yqeF* искусственным генетическим элементом P_L -SD_{φ10} осуществляли с использованием Red-зависимой системы гомологичной рекомбинации фага лямбда по методу, описанному ранее [19]. Конструирование необходимого линейного фрагмента ДНК, содержащего промотор P_L фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, проводили в несколько стадий. На первой стадии, посредством ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L , последовательность SD гена φ10 из фага T7 и 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *yqeF*. 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 φ10 из фага T7. Соответствующий 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 φ10 из фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамки считывания гена *yqeF*. 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 *yqeF*, был получен ПЦР с использованием праймеров P4 и P5 и плазмиды pMW118-(*λattL*-*Stm-λattR*) [20] 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 [19]. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *yqeF*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P6 и P7. Соответствующая маркированная генетическая модификация первоначально была получена в штамме MG1655 и затем перенесена в хромосомы целевых штаммов посредством P1-зависимой трансдукции.

Удаление из хромосом маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано

ранее [21]. 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. Экспрессию генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора $P_{trc-ideal-4}$, индуцировали спустя 3 ч от начала инкубации, добавляя в среды культивирования изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 mM.

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.

Аналитические методы. Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ. Использовали систему "Waters" HPLC system (США), укомплектованную ион-эксклюзионной колонкой Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США). Детекцию осуществляли при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 mM) 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.

Идентификацию и количественный анализ масляной, адипиновой и субериновой 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 M раствором хлорида натрия и доводили до pH 1–2 с помощью 2 M соляной кислоты. Этилацетатный экстракт смешивали с сухим сульфатом натрия, центрифугировали и полученный суперна-

тант 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 анализов 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 m/z и 73 m/z для масляной кислоты, 275 m/z и 172 m/z для адипиновой кислоты, 303 m/z и 187 m/z для субериновой кислоты, 159 m/z для валериановой кислоты, 289 m/z для пимелиновой кислоты). Сбор и обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Agilent MSD ChemStation. Аналитическая система была откалибрована в диапазоне 0.01–0.10 мг/мл для всех анализов с пределом детектирования 0.002 мг/мл. Для аппроксимации калибровочных данных использовали взвешенную линейную регрессию, и был получен квадрат коэффициента корреляции $R^2 = 0.991$. Целевые аналиты идентифицировали, сравнивая полученные данные с характеристиками соответствующих стандартов (время удерживания и масс-спектр).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевым моментом, обуславливающим принципиальную возможность биосинтеза субериновой кислоты по обращенному БОЖК, является способность клетки к формированию 3-оксоадипил-КоА и 3-оксосуберил-КоА с участием ацетил-КоА. *E. coli* природно обладает пятью тиолазами, потенциально способными катализировать конденсацию ацетил-КоА и структурно родственных КоА-производных. Это ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9) AtoB, предполагаемая ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза YqeF, 3-оксоадипил-КоА тиолаза (КФ 2.3.1.174) PaaJ, и 3-ок-

соацил-КоА тиолазы (КФ 2.3.1.16) FadA и FadI. При этом, FadA и FadI являются ферментами специфичными к длинноцепочечным субстратам [22, 23], AtoB [8, 22] предпочтительно узнает двух- и четырехуглеродные КоА-производные, ключевой реакцией для PaaJ является формирование 3-оксоадипил-КоА из сукцинил-КоА и ацетил-КоА, а субстратная специфичность YqeF практически не изучена. Вместе с тем, PaaJ дополнительно обладает активностью 3-оксо-5,6-дегидросуберил-КоА тиолазы (КФ 2.3.1.223) [24] и имеет наиболее высокую гомологию среди всех тиолаз *E. coli* с тиолазой DcaF *Acinetobacter* sp. ADP1. Поэтому, в качестве перспективных кандидатов для обеспечения в клетках *E. coli* последовательного формирования 3-оксоадипил-КоА и 3-оксосуберил-КоА, при конденсации ацетил-КоА с необходимыми иницирующими молекулами, рассматривались PaaJ и YqeF. Ранее нами были сконструированы штаммы *E. coli* MG1655 *lacI^Q*, *ΔackA-pta*, *ΔpoxB*, *ΔldhA*, *ΔadhE*, $P_{L-SD_{\phi 10}}-atoB$, $P_{L-trc-ideal-4}-SD_{\phi 10}-fadB$, $\Delta fadE$, $P_{L-SD_{\phi 10}}-tesB$, $\Delta yciA$, $P_{L-trc-ideal-4}-SD_{\phi 10}-fabI$, $P_{L-SD_{\phi 10}}-paaJ$, *ΔaceBAK*, *ΔglcB* (AdiBOX 1.0) и MG1655 *lacI^Q*, *ΔackA-pta*, *ΔpoxB*, *ΔldhA*, *ΔadhE*, $P_{L-SD_{\phi 10}}-atoB$, $P_{L-trc-ideal-4}-SD_{\phi 10}-fadB$, $P_{L-SD_{\phi 10}}-tesB$, $\Delta yciA$, $P_{L-trc-ideal-4}-SD_{\phi 10}-fadE$, $P_{L-SD_{\phi 10}}-paaJ$, *ΔaceBAK*, *ΔglcB* (AdiBOX1.1) [14, 15], с усиленной экспрессией гена *paaJ*, способные к биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК при катализе терминальной реакции цикла под действием как НАДН-зависимой еноил-АПБ редуктазы/ацил-КоА дегидрогеназы FabI (AdiBOX 1.0) так и FADH₂-зависимой ацил-КоА дегидрогеназы FadE (AdiBOX 1.1). При этом, в случае штамма AdiBOX 1.0, был показан ярко выраженный положительный эффект на биосинтез целевого соединения интенсификации в клетках цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), при обеспечении в рекомбинанте анаплеротического формирования щавелевоуксусной кислоты из гликолитического пирувата, за счет экспрессии гена пируваткарбоксилазы, *pycA*, *Bacillus subtilis*. Таким образом, поскольку специфичность соответствующих ацил-КоА дегидрогеназ (FabI и FadE) в отношении формирования суберил-КоА оставалась невыясненной, ген *pycA* *B. subtilis* был оверэкспрессирован в штамме AdiBOX 1.1 с целью создания изогенных базовых штаммов для дальнейшей оценки возможности синтеза рекомбинантами субериновой кислоты по обращенному БОЖК.

При микроаэробной утилизации глюкозы, штаммы AdiBOX 1.0 P_{L-pycA} и AdiBOX 1.1 P_{L-pycA} не синтезировали детектируемых количеств субериновой кислоты, формируя, в качестве продуктов обращенного БОЖК адипиновую и масляную кислоты на уровнях, составляющих в среднем около 150 мкМ и 475 мкМ соответственно (табл. 3). Синтез адипиновой кислоты рекомбинантами являлся следствием усиления экспрессии в них гена

144

ГУЛЕВИЧ и др.

Таблица 3. Концентрации и выходы основных метаболитов, а также концентрации производных обращенного β-окисления жирных кислот, секретированных сконструированными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	Глюкоза мМ	Пировиноградная кислота		Уксусная кислота		Янтарная кислота		Масляная кислота мкМ	Адипиновая кислота мкМ	Сибири- новая кислота мкМ
		мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %			
AdiBOX 1.0 P _L -pucA	41.7 ± 2.0	7.3 ± 0.4	17.5	12.8 ± 0.8	30.7	2.0 ± 0.2	4.8	132.1 ± 11.6	496.1 ± 47.6	—
AdiBOX 1.1 P _L -pucA	41.4 ± 2.2	6.9 ± 0.5	16.6	13.1 ± 1.0	31.6	1.8 ± 0.2	4.5	164.6 ± 15.2	452.4 ± 43.8	—
AdiBOX 1.0 P _L -pucA P _L -yqeF	42.0 ± 1.9	7.1 ± 0.5	16.9	12.5 ± 0.7	29.8	2.1 ± 0.2	5.0	138.4 ± 12.0	492.2 ± 49.3	—
AdiBOX 1.1 P _L -pucA P _L -yqeF	41.7 ± 2.0	7.0 ± 0.4	16.8	13.0 ± 1.1	31.2	1.8 ± 0.2	4.3	169.9 ± 16.3	450.7 ± 44.1	—
AdiBOX 1.0 P _L -pucA P _L -fadB	42.3 ± 2.1	0.8 ± 0.1	1.9	5.6 ± 0.4	13.2	2.2 ± 0.2	5.2	180.5 ± 17.1	630.8±62.4	67.0 ± 5.9
AdiBOX 1.1 P _L -pucA P _L -fadB	42.1 ± 1.8	0.8 ± 0.1	1.9	6.0 ± 0.5	14.2	2.1 ± 0.2	4.9	214.7 ± 19.4	596.0 ± 58.2	62.6 ± 6.1
AdiBOX 1.0 P _L -pucA P _L -fadB ΔsdhAB	41.5 ± 2.3	0.7 ± 0.1	1.7	5.3 ± 0.4	12.8	5.6 ± 0.4	13.5	184.2 ± 17.7	691.3 ± 64.6	74.5 ± 7.0
AdiBOX 1.1 P _L -pucA P _L -fadB ΔsdhAB	41.8 ± 2.2	0.8 ± 0.1	1.9	5.5 ± 0.5	13.1	6.0 ± 0.5	14.3	225.2 ± 21.6	655.2 ± 62.6	70.8 ± 6.3

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

3-оксоадипил-КоА тиолазы PaaJ и повышения внутриклеточной доступности сукцинил-КоА для реакций обращенного БОЖК в результате инактивации глиоксилатного шунта и интенсификации ЦТК. Остаточный синтез штаммами масляной кислоты был обусловлен сохраняющейся в клетках активностью ацетил-КоА С-ацетилтрансферазы AtoB, способствующей первичной конденсации в реакциях обращенного БОЖК двух молекул ацетил-КоА с формированием 3-оксобутирил-КоА. Таким образом, можно было предположить, что субстратная специфичность как AtoB, так и PaaJ не обеспечивала клетки модельных продуцентов с полноценно функционирующим обращенным БОЖК способностью к формированию 3-оксобутирил-КоА. В данной связи, в штаммах AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* и AdiBOX 1.1 P_L-*pusA* была усилена экспрессия гена кандидатной тиолазы YqeF и охарактеризована их способность к биосинтезу целевого соединения.

Штаммы AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* P_L-*yqeF* и AdiBOX 1.1 P_L-*pusA* P_L-*yqeF*, как и предшественники, не синтезировали субериновой кислоты из глюкозы в условиях микроаэрофилии (табл. 3). При этом с учетом требований окислительно-восстановительного баланса, необходимых для эффективного биосинтеза субериновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК, ни полностью аэробные, ни полностью анаэробные условия культивирования не могли рассматриваться в качестве оптимальных для формирования штаммами соответствующего продукта. Более того, спектры метаболитов, сформированные штаммами AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* P_L-*yqeF* и AdiBOX 1.1 P_L-*pusA* P_L-*yqeF*, практически не отличались от таковых, формируемых родительскими штаммами AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* и AdiBOX 1.1 P_L-*pusA*. Это указывало на крайне малый или даже отсутствующий вклад предполагаемой тиолазы YqeF в формирование рекомбинантами продуктов обращенного БОЖК. Возможно, тиолазная активность является побочной для этого фермента, либо он обладает необычной субстратной специфичностью. Действительно, на сегодняшний день было представлено лишь одно экспериментальное свидетельство способности YqeF инициировать функциональное обращение БОЖК [4].

С другой стороны, причиной отсутствия субериновой кислоты среди продуктов обращенного БОЖК, формируемых штаммами, мог быть сниженный поток углерода через реакции цикла, следующие за инициирующей. Первоначальный дизайн модельных штаммов AdiBOX 1.0 и AdiBOX 1.1 предполагал повышение эффективности инициации обращения БОЖК, а также образования целевого продукта за счет относительно меньшей интенсивности протекания промежуточных реакций пути. Соответственно гены тиолаз и терминирующей тиоэстеразы TesB были экспрессированы в штаммах под контролем промотора P_L фага лямб-

да, являющихся одним из наиболее сильных для *E. coli*, тогда как гены *fadB* и *fadE/fabI*, кодирующие ферменты, ответственные за формирование 3-гидроксацил-КоА, еноил-КоА и ацил-КоА, были экспрессированы в рекомбинантах под контролем промотора P_{trc-ideal-4}*, обладающего силой в три раза сниженной по сравнению с P_L [25]. Было показано [10], что усиление в подобных штаммах экспрессии гена *fadB*, кодирующего (S)-3-гидроксацил-КоА-дегидрогеназу/еноил-КоА-редуктазу, ведет к выраженной интенсификации потока углерода через обращенное БОЖК и способствует ~2.5 кратному приросту в синтезе рекомбинантами C4-C8 3-гидрокси-функционализированных карбоновых кислот и ~1.2 кратному росту синтеза соответствующих насыщенных алифатических производных. Поэтому экспрессия гена *fadB* в штаммах была дополнительно усилена в результате замены исходного регуляторного элемента P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10} на P_L-SD_{φ10}*, содержащий сильный конститутивный промотор фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена 10 из фага T7.

В результате внесения данной модификации, штаммы AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* P_L-*fadB* и AdiBOX 1.1 P_L-*pusA* P_L-*fadB* в ходе микроаэробной утилизации глюкозы секретируют в среду около 60 мкМ субериновой кислоты (табл. 3) в качестве одного из продуктов обращенного БОЖК. Таким образом, синтез целевого вещества не зависел от природы ацил-КоА дегидрогеназы, принимающей участие в обращении цикла. Одновременно, синтез рекомбинантами адипиновой и масляной кислот возрастал приблизительно в 1.3 раза (до ~615 мкМ и ~200 мкМ) при падении побочного накопления ими пировиноградной кислоты практически на порядок, а уксусной — в 2.3 раза (табл. 3). Резкое снижение формирования штаммами данных побочных продуктов указывало на значительную интенсификацию в клетках туннелирования терминального продукта гликолиза, пирувата, и производного от него ацетил-КоА, в реакции обращенного БОЖК и/или ЦТК. Следует отметить, что убыль углерода в побочных продуктах, формируемых штаммами, не компенсировалась его приростом в синтезированных ими производных обращенного БОЖК. Демонстрируемые штаммами AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* P_L-*fadB* и AdiBOX 1.1 P_L-*pusA* P_L-*fadB* значения углеродного баланса, рассчитанного как отношение общего количества молей углерода в детектированных продуктах к количеству молей углерода потребленной глюкозы, падали по сравнению с родительскими штаммами с ~0.23 до ~0.11. Можно было предположить, что при усилении экспрессии *fadB*, возросшее потребление гликолитического НАДН, в результате интенсификации реакции катализируемой (S)-3-гидроксацил-КоА-дегидрогеназой, способствовало предпочтительному вовлечению в микроаэробных условиях общих для обращенного БОЖК и ЦТК

метаболитов-предшественников в реакции НАДН-генерирующего ЦТК. Последнее, в свою очередь, возможно обуславливало значительные потери углерода в виде CO_2 при множественных обращениях цикла. С целью проверки этой гипотезы, в штаммах *AdiBOX 1.0 P_L-pucA P_L-fadB* и *AdiBOX 1.1 P_L-pucA P_L-fadB* были делетированы гены *sdhAB*, кодирующие компоненты сукцинатдегидрогеназного ферментативного комплекса.

Инактивация сукцинатдегидрогеназы привела к заметному увеличению секреции янтарной кислоты полученными штаммами *AdiBOX 1.0 P_L-pucA P_L-fadB ΔsdhAB* и *AdiBOX 1.1 P_L-pucA P_L-fadB ΔsdhAB* (табл. 3). В результате, значения углеродного баланса, демонстрируемые соответствующими рекомбинантами при формировании продуктов микроаэробной утилизации глюкозы, возрастали до ~0.16, тем не менее, не достигая уровней, характерных для штаммов *AdiBOX 1.0 P_L-pucA* и *AdiBOX 1.1 P_L-pucA* (~0.23). Это позволило заключить, что вклад оксидативного ЦТК в потребление внутриклеточно формируемых пирувата и ацетил-КоА у штаммов *AdiBOX 1.0 P_L-pucA P_L-fadB ΔsdhAB*, *AdiBOX 1.1 P_L-pucA P_L-fadB ΔsdhAB* и их предшественников был не слишком значимым.

Вместе с тем, количества синтезированной штаммами субериновой кислоты изменились незначительно (с ~67 до ~75 мкМ для штамма производного *AdiBOX 1.0* и с ~63 до ~71 мкМ для штамма производного *AdiBOX 1.1*), продукция адипиновой кислоты несколько возросла (на 10%), а накопление рекомбинантами масляной кислоты сохранилось на уровне родительских штаммов (табл. 3). Это могло указывать как на сниженную эффективность реинициации в штаммах обращенного БОЖК, так и на неоптимальную функциональность реакций цикла, следующих за катализируемой 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой конверсией 3-оксоацил-КоА в 3-гидроксиацил-КоА, что, по-видимому, в совокупности приводило к накоплению рекомбинантами, в качестве недетектированных производных целевого пути, 3-гидроксикарбоновых кислот, в первую очередь — 3-гидроксимасляной [10].

Действительно, с одной стороны, ранее было показано, что возможность многократного эффективного обращения БОЖК, для формирования C4+ производных, определяется скорее субстратной специфичностью тиолазы, нежели уровнем внутриклеточной активности ацил-КоА дегидрогеназы [8, 10]. С другой стороны, эффективность протекания полного каскада реакций обращенного БОЖК, в том числе реакции катализируемой ацил-КоА дегидрогеназой, зависит от внутриклеточной доступности НАДН. При этом, оптимальный внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс, максимально способствующий эффективному биосинтезу

целевого продукта из того или иного источника углерода, разнится для каждого конкретного производного обращенного БОЖК. Так, биосинтез масляной кислоты из двух молекул ацетил-КоА по обращенному БОЖК расходует два НАДН и может быть эффективно реализован в рекомбинантных штаммах *E. coli* при утилизации глюкозы в анаэробных условиях с формированием ацетил-КоА под действием пируват-формиат-лиазы (КФ 2.3.1.54). Биосинтез двух молекул адипиновой кислоты из трех молекул глюкозы по обращенному БОЖК требует расхода 4 молекул НАДН. При этом, гликолитическая утилизация субстрата дает 6 соответствующих восстановленных эквивалентов, а формирование необходимых метаболитов-предшественников, ацетил-КоА и сукцинил-КоА, в зависимости от условий аэрации, обеспечивает дополнительное формирование от 4 до 8 молекул НАДН. В результате, эффективный биосинтез адипиновой кислоты из глюкозы невозможен ни в полностью аэробных, ни в полностью анаэробных условиях и требует соблюдения условий микроаэрофилии [14]. Аналогично, биосинтез одной молекулы субериновой кислоты из двух молекул глюкозы по обращенному БОЖК также требует расхода 4 молекул НАДН, тогда как утилизация субстрата и формирование предшественников приводят к образованию от 6 до 9 восстановленных эквивалентов. Очевидно, что достижение внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, оптимального для биосинтеза адипиновой и субериновой кислот, осложнено при осуществлении микроаэробного культивирования в колбах, т.е. в условиях, исключающих возможность поддержания постоянного уровня насыщения среды кислородом. Вместе с тем, окислительно-восстановительный статус клетки, зависящий от степени аэрации, может быть подвержен тонкой регуляции при культивировании рекомбинантов в контролируемых условиях в биореакторах.

Таким образом, в результате данного “подтверждающего концепцию” исследования была экспериментально продемонстрирована принципиальная возможность биосинтеза субериновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК в клетках *E. coli* с участием только природных ферментов данной бактерии, обеспечивающих функционирование пути. Полученные данные предполагают возможность дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик модельных продуцентов и оптимизации процесса микробиологического синтеза целевого вещества в контролируемых условиях аэрации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tarasava K., Lee S.H., Chen J., Köpke M., Jewett M.C., Gonzalez R.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 49. № 2. kuac003. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac003>
2. *Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K.* // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 4. P. 829–839.
3. *Kim S., Cheong S., Chou A., Gonzalez R.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2016. V. 42. P. 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.07.004>
4. *Dellomonaco C., Clomburg J.M., Miller E.N., Gonzalez R.* // Nature. 2011. V. 476. P. 355–359. <https://doi.org/10.1038/nature10333>
5. *Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G.* // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 463–469. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0797-z>
6. *Mehrer C.R., Incha M.R., Politz M.C., Pfleger B.F.* // Metab. Eng. 2018. V. 48. P. 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.011>
7. *Chen J., Gonzalez R.* // Metab. Eng. 2023. V. 79. P. 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2023.07.006>
8. *Kim S., Clomburg J.M., Gonzalez R.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 42. P. 465–75. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1589-6>
9. *Kim S., Cheong S., Gonzalez R.* // Metab. Eng. 2016. V. 36. P. 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.03.005>
10. *Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Debabov V.G.* // Biomolecules. 2024. V. 14. 449. <http://doi.org/10.3390/biom14040449>
11. *Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R.* // Nat. Biotechnol. V. 34. № 5. P. 556–561. <https://doi.org/10.1038/nbt.3505>
12. *Lang M., Li H.* // ChemSusChem. 2022. V. 15. № 1. e202101531. <https://doi.org/10.1002/cssc.202101531>
13. *Liao Z., Yeoh Y.K., Parumasivam T., Koh W.Y., Alrosan M., Alu'datt M.H., Tan T.C.* // RSC Adv. 2024. V. 14. № 24. P. 17008–17021. <https://doi.org/10.1039/d4ra02598a>
14. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 3. С. 235–243.
15. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 60. № 3. С. 28–35.
16. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. *Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
18. *Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. e00703. <http://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00703>
19. *Datsenko K.A., Wanner B.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
20. *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.
21. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М. и др.* // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
22. *Clark D.P., Cronan J.E.* // EcoSal Plus. 2005. V. 1. 10.1128/ecosalplus.3.4.4. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.4>
23. *Binstock J.F., Schulz H.* // Methods. Enzymol. 1981. V. 71. P. 403–411. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)71051-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)71051-6)
24. *Teufel R., Mascaraque V., Ismail W., Voss M., Perera J., Eisenreich W., Haehnel W., Fuchs G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 32. P. 14390–14395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005399107>
25. *Deuschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H.* // EMBO J. 1986. V. 5. P. 2987–2994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04596.x>

Biosynthesis of Suberic Acid from Glucose Through the Inverted Fatty Acid β -Oxidation by Recombinant *Escherichia coli* Strains

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

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

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

Using directly engineered derivatives of previously constructed adipate-producing *Escherichia coli* strains MG1655 *lacI*⁰, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD _{ϕ 10}-*atoB*, P_{*trc*-ideal-4}-SD _{ϕ 10}-*fadB*, Δ *fadE*, P_L-SD _{ϕ 10}-*tesB*, Δ *yciA*, P_{*trc*-ideal-4}-SD _{ϕ 10}-*fabI*, P_L-SD _{ϕ 10}-*paaJ*, Δ *aceBAK*, Δ *glcB* и MG1655 *lacI*⁰, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD _{ϕ 10}-*atoB*, P_{*trc*-ideal-4}-SD _{ϕ 10}-*fadB*, P_L-SD _{ϕ 10}-*tesB*, Δ *yciA*, P_{*trc*-ideal-4}-SD _{ϕ 10}-*fadE*, P_L-SD _{ϕ 10}-*paaJ*, Δ *aceBAK*, Δ *glcB* the feasibility of suberic acid biosynthesis from glucose by this bacterium resulting from the reversal of the native fatty acid β -oxidation pathway was demonstrated. The condensation of acetyl-CoA with succinyl-CoA and adipyl-CoA was ensured in recombinants by 3-oxoadipyl-CoA thiolase PaaJ, whereas the putative acetyl-CoA C-acetyltransferase YqeF was unable to catalyse the respective reactions. The biosynthesis of ~60 μ M suberic acid was achieved upon significant enhancement in the strains of the expression of the bifunctional (S)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA reductase gene, *fadB*. Subsequent inactivation of succinate dehydrogenase in the strains increased the intracellular availability of succinyl-CoA for the initiation of the first round of cycle reversal and favored an increase in the accumulation of the target compound by the recombinants to ~75 μ M. The results provide a framework for the development of highly efficient producing strains for bio-based production of suberic acid from renewable raw materials.

Keywords: *Escherichia coli*, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering, suberic acid, thiolase