

УДК 577.121

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА 1,3-БУТАНДИОЛА ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ ПУТИ β -ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМИ 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 03.11.2024 г.

После доработки 12.12.2024 г.

Принята к печати 10.01.2025 г.

В производных штамма *Escherichia coli* MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, лишенного путей смешанно-кислотного брожения, усилена экспрессия нативных генов L-1,2-пропандиол-оксидоредуктазы и НАДФН-зависимой альдегид-редуктазы, *fucO* и *yqhD*, и экспрессирован ген бутиральдегид-дегидрогеназы *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *bld*. Способность к биосинтезу 1,3-бутандиола из глюкозы, в результате функционального обращения β -окисления жирных кислот, придана рекомбинантам за счет повышенной экспрессии генов *atoB* и *fadB*, кодирующих ацетил-КоА С-ацетилтрансферазу и бифункциональную (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназу/еноил-КоА-гидратазу. Достигнута анаэробная конверсия субстрата в целевой продукт на уровне 0.2 моль/моль при накоплении ~4 мМ 1,3-бутандиола. При повышении внутриклеточной доступности НАДН эквивалентов, за счет конститутивной экспрессии генов пируватдегидрогеназного комплекса, *aceEF-lpdA*, конверсия глюкозы в 1,3-бутандиол возрастала до ~0.3 моль/моль при накоплении целевого продукта на уровне ~7 мМ. Усиление экспрессии генов мембранно-связанной трансгидрогеназы, *pntAB*, обеспечило синтез 9.5 мМ 1,3-бутандиола штаммом с повышенной экспрессией *yqhD* с коэффициентом конверсии 0.4 моль/моль.

Ключевые слова: 1,3-бутандиол, β -окисление жирных кислот, *Escherichia coli*, НАДН, НАДФН, метаболическая инженерия

DOI: 10.31857/S0555109925030046 **EDN:** FNQOJF

1,3-Бутандиол (1,3-БДО) — промышленно значимый химикат, обладающий высоким потенциалом для использования в качестве гибкого “строительного блока” для синтеза широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью. Непосредственно, 1,3-БДО используется, в первую очередь, как растворитель в лакокрасочной, пищевой и косметической промышленности [1, 2]. С точки зрения крупнотоннажной продукции его востребованных производных, 1,3-БДО является наиболее перспективным субстратом для получения 1,3-бутандиена [3], мировая потребность в котором составляет порядка 10 млн т в год. Вместе с тем, 1,3-БДО является хиральным соединением, и его (R)- и (S)-стереоизомеры могут служить удобными синтонами для получения различных видов макролидных и бета-лактамов антибиотиков,

феромонов, а также сельскохозяйственно-значимых пестицидов и инсектицидов [4]. Последнее значительно расширяет спектр потенциального практического применения соответствующего диола. При этом, в промышленных масштабах 1,3-БДО производится нефтехимическим синтезом, ведущим к формированию рацемической смеси стереоизомеров [5], тогда как разделение таких смесей, в общем случае, является довольно сложной и крайне затратной задачей. Энантиоселективное формирование стереоизомеров 1,3-БДО возможно в результате микробиологического синтеза.

1,3-БДО не является природным метаболитом известных микроорганизмов. Тем не менее, биосинтез как (R)-, так и (S)-стереоизомеров 1,3-БДО был продемонстрирован с использова-

МЕТОДИКА

нием направленно сконструированных штаммов *Escherichia coli* [6]. На сегодняшний день предложены и успешно реализованы три подхода к биосинтезу соответствующими штаммами 1,3-БДО из сахаров растительной биомассы. Первый предполагает формирование целевого продукта из пирувата, через промежуточное формирование ацетальдегида и 3-гидроксипропанола, под действием пируват декарбоксилазы (КФ 4.1.1.1), дезоксирибозо-5-фосфат альдолазы (КФ 4.1.2.4) и альдо-кето редуктазы (КФ 1.1.1.21), и ведет к формированию (*R*)-1,3-БДО [7, 8]. Второй и третий подходы предполагают образование целевого продукта из 3-гидроксипропирил-КоА под действием альдегид- и алкогольдегидрогеназ [2, 9, 10, 11]. 3-гидроксипропирил-КоА может быть сформирован из ацетил-КоА в результате последовательного формирования ацетоацетил-КоА и восстановления его β-кето-группы. Соответствующие реакции способны катализировать либо ферменты пути биосинтеза полигидроксипропаноатов, либо ферменты β-окисления жирных кислот (БОЖК), функционирующие в биосинтетическом направлении. Участие в катализе ферментов биосинтеза полигидроксипропаноатов приводит к итоговому формированию рекомбинантами (*R*)-1,3-БДО [2, 9, 10]. Вовлечение в данный процесс ферментов БОЖК приводит к формированию (*S*)-1,3-БДО [12]. Накопление целевого продукта и его выход из глюкозы, демонстрируемые штаммами продуцирующими (*R*)-1,3-БДО, достаточно велики и достигают ~250 мМ [9] и ~0.6 моль/моль [10]. Уровень продукции (*S*)-1,3-БДО, достигнутый на сегодняшний день, крайне мал и составляет лишь ~0.3 мМ [12].

Цель работы — оптимизация биосинтеза 1,3-БДО из глюкозы по обращенному пути β-окисления жирных кислот рекомбинатными штаммами *Escherichia coli*.

Реактивы. В работе использовали рестриктазы *Bgl*II и *Xba*I, 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 сконструированный штамм *E. coli* MG Δ4 [13], лишенный путей смешанно-кислотного брожения, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Бактерии культивировали, используя богатые среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [14], с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Целевые штаммы, производные штамма MG Δ4, с инактивированным геном *uciA* и природными регуляторными областями генов *aceEF-lpdA* оперона, *fucO* и *yqhD* замененными искусственными генетическими элементами, содержащими промотор P_L фага λмбда, были получены посредством P1-зависимых трансдукций [14] с использованием ранее полученных препаратов P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [11, 15]. Интеграцию гена *bld Clostridium saccharoperbutylacetonicum* в хромосому *E. coli* на место гена *ldhA* и замену природного промотора генов *pntAB* промотором P_L осуществляли

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P2	5'-agtaattctagaacggccaatgcttcgttc-3'
P3	5'-tatgaaactcgccgtttatagcacaacacagtagca-cgctcaagtagtatataaaaaagctgaac-3'
P4	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttatactaagttgg-3'
P5	5'-gacgtttctagagaaggagatatacatatgattaagacacgctagttctataac-3'
P6	5'-ttaaaccagttcggttcgggcagggttcgctttttcttaaccggcgagtagacacatcttc-3'
P7	5'-attcgcatgatattcccttcacgcggtttattgat-acggccaatgcttcgttc-3'
P8	5'-agcagctgtgtggctcctgacacaggcaaacatc-cgctcaagtagtatataaaaaagctgaac-3'
P9	5'-gtggcatgtttaaccgttcag-3'
P10	5'-gccatcagcaggccttagcg-3'
P11	5'-tcagtacgttataggcggttg-3'
P12	5'-gatctctgactgccagacgc-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
MG Δ4	MG1655 $\Delta ackA-ptd$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$	[13]
MG Δ5	MG1655 $\Delta ackA-ptd$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta yciA$	Данная работа
MG Δ5 P _L - <i>bld</i>	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$	Данная работа
BDO 1.0	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$, $P_L-SD_{\phi 10}-fucO$	Данная работа
BDO 2.0	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$, $P_L-SD_{\phi 10}-yqhD$	Данная работа
BDO 1.1	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$, $P_L-SD_{\phi 10}-fucO$, $P_L-SD_{aceF}-aceEF-lpdA$	Данная работа
BDO 2.1	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$, $P_L-SD_{\phi 10}-yqhD$, $P_L-SD_{aceF}-aceEF-lpdA$	Данная работа
BDO 1.2	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$, $P_L-SD_{\phi 10}-fucO$, $P_L-SD_{aceF}-aceEF-lpdA$, $P_L-pntAB$	Данная работа
BDO 2.2	MG Δ5 $ldhA::P_L-SD_{\phi 10}-bld^{Cs}$, $P_L-SD_{\phi 10}-yqhD$, $P_L-SD_{aceF}-aceEF-lpdA$, $P_L-pntAB$	Данная работа
Плазмида		
pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>attL-cat-attR</i>	[17]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , $P_{araB}-\lambda gam-bet-exo$	[16]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , $P_R-\lambda xis-int$, <i>cIts857</i>	[18]
pMW118m- <i>atoB-fadB</i>	pMW118, $P_{trc-ideal-2}-SD_{lacZ}-atoB-fadB-T_{rmB}$	[19]

с использованием Red-зависимой системы гомологичной рекомбинации фага лямбда по ранее описанному методу [16]. Конструирование линейного фрагмента для интеграции гена *bld* проводили в несколько стадий. Первоначально, с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий сайт *Bgl*II, промотор P_L и сайт *Xba*I. Использовали праймеры P1 и P2, и ДНК фага лямбда в качестве матрицы. Параллельно, с использованием праймеров P3 и P4, и плазмиды pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$) [17], был получен фрагмент ДНК, содержащий сайт *Bgl*II, ген *cat*, фланкированный аттачмент сайтами фага лямбда, и 36 нуклеотидов, гомологичных 5'-концевому участку кодирующей области гена *ldhA* *E. coli*. Также был получен фрагмент ДНК, содержащий сайт *Xba*I, сайт связывания рибосом SD гена $\phi 10$ из фага T7 и кодирующую область гена *bld* из *C. saccharoperbutylacetonicum*, а также 36 нуклеотидов, комплементарных 3'-концевой области гена *ldhA* *E. coli*. При ПЦР использовали геномную ДНК штамма *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 и праймеры P5 и P6. Полученные фрагменты ДНК были рестрицированы *Bgl*II и *Xba*I и лигиро-

ваны T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P3 и P6. Аналогичным образом был сконструирован фрагмент для замены природного промотора генов *pntAB*. Первоначально, посредством ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L и 36 нуклеотидов, комплементарных последовательности SD и 5'-концу кодирующей области гена *pntA*. Использовали геномную ДНК фага лямбда, в качестве матрицы, и праймеры P1 и P7. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, непосредственно предшествующему последовательности SD гена *pntA*, был получен ПЦР с использованием праймеров P4, P8 и плазмиды pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$) в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P7 и P8. Полученные ПЦР-продукты были интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655,

несущего плазмиду-помощник pKD46 [19]. Соответствие запланированных и экспериментально полученных структур хромосом подтверждали секвенированием с помощью пар праймеров P9, P10 и P11, P12. Соответствующие маркированные генетические модификации первоначально были получены в штамме MG1655 и затем перенесены в хромосомы целевых штаммов P1-зависимой трансдукцией.

Удаление из хромосом маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [18]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, в течение ночи при 37°C. 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 10 мкМ FeSO₄. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора P_{trc-ideal-2}, спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы, 10 мкМ FeSO₄ и 1 мМ ИПТГ. В дальнейшем культуры инкубировали анаэробно в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых заворачивающимися крышками, при 37°C на роторной качалке при 250 об./мин. Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз. Результаты экспериментов варьировались в диапазоне не превышающем 10%.

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 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.

Идентификацию и количественный анализ спиртов в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным и масс-селективным детектированием, как описано ранее [11, 13, 19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевым метаболитом-предшественником для реакций обращенного БОЖК служит ацетил-КоА. При этом, формирование 1,3-БДО по обращенному БОЖК с терминирующим действием альдегид- и алкогольдегидрогеназ является НАДН-зависимым. Таким образом, анаэробные условия являются предпочтительными для эффективного биосинтеза 1,3-БДО. Однако при анаэробнозе, за ацетил-КоА и восстановленные эквиваленты с биосинтезом 1,3-БДО будут конкурировать реакции смешанно-кислотного брожения. Поэтому, в качестве базового штамма в данной работе был использован штамм *E. coli* MG Δ4 [13], лишенный путей брожения за счет делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, кодирующих ферменты, ответственные за конверсию ацетил-КоА и его прямого гликолитического предшественника, пирувата, в уксусную кислоту, молочную кислоту и этанол. Помимо брожения, ацетил-КоА и КоА-интермедиаты обращенного БОЖК могут нецелевым образом расходоваться в реакциях, катализируемых клеточными тиюэстеразами. *E. coli* обладает как минимум восемью охарактеризованными тиюэстеразами, способными гидролизовать тиюэфирную связь КоА-производных с формированием соответствующих карбоновых кислот. Большинство из них являются довольно специфичными ферментами, тем не менее, такие белки, как YciA, YbgC и YdiI обладают широкой субстратной специфичностью в отношении ацил-производных кофермента А [20–22]. При этом YciA проявляет максимальную активность в отношении ацетил-КоА [20]. Соответственно, ген *yciA* был инактивирован в штамме MG Δ4, приводя к штамму MG Δ5.

Биосинтез 1,3-БДО с участием обращенного БОЖК предполагает первичное формирование 3-гидроксипропирил-КоА в результате однократного частичного обращения цикла с его последующим двухэтапным восстановлением под действием альдегид- и алкогольдегидрогеназ. Ранее была экспериментально подтверждена способность основной альдегид-/алкоголь дегидрогеназы *E. coli* AdhE (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3) [2, 11], альдегид дегидрогеназы *E. coli* MhpF (КФ 1.2.1.10) [11] и бутиральдегид дегидрогеназы *C. saccharoperbutylacetonicum* Bld (КФ 1.2.1.57) [2, 7, 9–10] обеспечивать синтез 1,3-БДО рекомбинантными штаммами *E. coli* за счет конверсии 3-гидроксипропирил-КоА в 3-гидроксипропириальдегид. Наилучшие показатели продукции целевого вещества были достигнуты при экспрессии в рекомбинантах гетерологичной

бутиральдегид дегидрогеназы. В данной связи, ген *bld C. saccharoperbutylacetonicum* был интегрирован в хромосому штамма MG Δ5 на место инактивированного гена *ldhA* под контролем искусственного регуляторного элемента $P_{L-SD_{\Phi 10}}$, содержащего сильный конститутивный промотор фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена 10 из фага T7. Таким образом, был получен штамм MG Δ5 P_{L-bld} . В случае алкоголь дегидрогеназ, принципиальная способность к конверсии 3-гидроксibuтиральдегида в 1,3-БДО была продемонстрирована для НАДН-зависимой альдегид-/алкоголь дегидрогеназы *E. coli* AdhE [2, 11], НАДН-зависимой L-1,2-пропандиол оксидоредуктазы FucO (КФ 1.1.1.77) [11] и НАДФН-зависимой альдегид редуктазы YqhD (КФ 1.1.1.2) [2, 7–10]. Максимальную продукцию 1,3-БДО рекомбинантами, экспрессирующими в качестве альдегид дегидрогеназы Bld *C. saccharoperbutylacetonicum*, обеспечивала НАДФН-зависимая альдегид редуктаза YqhD. Следует отметить, что способность НАДН-зависимой L-1,2-пропандиол оксидоредуктазы FucO поддерживать синтез 1,3-БДО оценивали при низкокэффективной конверсии 3-гидроксibuтирил-КоА в 3-гидроксibuтиральдегид под действием альдегид дегидрогеназы MhpF, но не Bld. Поэтому, в производных штамма MG Δ5 P_{L-bld} была усилена экспрессия как гена *yqhD* (BDO 2.0), так и гена *fucO* (BDO 1.0). Для придания штаммам BDO 1.0 и BDO 2.0 способности к биосинтезу 1,3-БДО из глюкозы по обращенному БОЖК, в рекомбинанты была введена плазмида pMW118m-*atoB-fadB*, несущая под контролем промотора $P_{trc-ideal-2}$ гены ацетил-КоА С-ацетилтрансферазы AtoB (КФ 2.3.1.16) и бифункциональной (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-гидратазы FadB (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17).

В ходе анаэробной утилизации глюкозы, базовые штаммы BDO 1.0 и BDO 2.0 не секретируют в среду детектируемых количеств 1,3-БДО (табл. 3). Действительно, в отсутствие в среде жирных кислот и двухуглеродных субстратов, экспрессия генов *fad*-регулона и *atoDAEB* оперона, кодирующих ферменты БОЖК, в *E. coli* репрессированна и клетка лишена активности соответствующих ферментов [23]. Соответственно, штаммы BDO 1.0 и BDO 2.0 были принципиально не способны к синтезу целевого продукта по обращенному БОЖК, несмотря на конститутивную экспрессию альдегид- и алкогольдегидрогеназ. Повышенная экспрессия последних, вместе с тем, приводила к тому, что основным восстановленным продуктом, секретированным штаммами, являлся этанол, анаэробно формируемый из глюкозы с выходом ~75% (табл. 3) при теоретическом максимуме 100%. Поскольку родительский штамм MG Δ4 не способен к анаэробной утилизации глюкозы, это свидетельствовало о том, что именно синтез этанола позволял штаммам анаэробно потреблять

углеводный субстрат при сохранении внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, и указывало на полную функциональность в рекомбинантах альдегид дегидрогеназы Bld и алкогольдегидрогеназ FucO и YqhD. При экспрессии, в составе плазмиды, генов ацетил-КоА С-ацетилтрансферазы и (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-гидратазы, штаммы BDO 1.0 (pMW118m-*atoB-fadB*) и BDO 2.0 (pMW118m-*atoB-fadB*) в аналогичных условиях накапливали в среде культивирования до 4.5 мМ и 3.7 мМ 1,3-БДО, соответственно (табл. 3). Эти показатели были на порядок выше ранее продемонстрированного, 0.3 мМ [12], и были обусловлены, очевидно, эффективным действием бутиральдегид дегидрогеназы в отношении 3-гидроксibuтирил-КоА. Вместе с тем, несмотря на то, что синтез штаммами 1,3-БДО сопровождался заметным снижением в формировании этанола (табл. 3), последний оставался основным восстановленным продуктом анаэробной утилизации глюкозы. С одной стороны, это являлось следствием известной способности Bld использовать ацетил-КоА в качестве субстрата. С другой стороны, это могло указывать на недостаток восстановленных эквивалентов в клетке для эффективного синтеза 1,3-БДО. Действительно, формирование одной молекулы этанола из ацетил-КоА требует расхода двух НАДН, в то время как для образования одной молекулы 1,3-БДО из двух молекул ацетил-КоА необходимы три восстановленных эквивалента. Гликолитическая утилизация глюкозы приводит к формированию двух молекул пирувата и сопровождается образованием двух НАДН. В зависимости от условий аэрации, дальнейшая конверсия пирувата в ацетил-КоА катализируется в *E. coli* либо пируватдегидрогеназой (КФ 1.2.4.1/2.3.1.12/1.8.1.4), либо пируват-формат-лиазой (КФ 2.3.1.54). Пируватдегидрогеназа окислительно декарбоксилирует пируват в ацетил-КоА с формированием НАДН, в то время как реакция, катализируемая пируват-формат-лиазой, не ведет к образованию восстановленных эквивалентов. Таким образом, при анаэробии гликолитическая утилизация одной молекулы глюкозы обеспечивает клетку количеством НАДН достаточным для формирования одной молекулы этанола, но не 1,3-БДО. В отсутствие аэрации экспрессия генов пируватдегидрогеназного комплекса (*aceEF-lpdA*) репрессирована [24]. Однако нативный регулируемый промотор оперона может быть заменен искусственным конститутивным промотором, что обеспечит клетку активностью пируватдегидрогеназы в условиях анаэробии. При равноценном вкладе пируват-формат-лиазы и пируватдегидрогеназы в конверсию пирувата в ацетил-КоА, формирование двух молекул последнего из глюкозы будет сопровождаться образованием трех НАДН, что, в совокупности, достаточно для биосинтеза 1,3-БДО по обращенному БОЖК. Следует отме-

Таблица 3. Концентрации и выходы основных метаболитов, а также 1,3-БДО, секретированных сконструированными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота,		Молочная кислота,		Янтарная кислота,		Этанол,		1,3-БДО,	
		мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %
BDO 1.0	21.0 ± 0.7	22.4 ± 1.8	106.7	0.8 ± 0.1	3.8	1.4 ± 0.1	6.7	16.3 ± 1.2	77.6	н.д.	—
BDO 2.0	18.3 ± 0.6	18.1 ± 1.6	98.9	1.6 ± 0.2	8.7	1.2 ± 0.1	6.6	13.4 ± 1.3	73.2	н.д.	—
BDO 1.0 (pMW118m-atoB-fadB)	22.8 ± 0.8	19.9 ± 1.7	87.3	1.0 ± 0.1	4.4	1.0 ± 0.1	4.4	11.6 ± 1.0	50.9	4.5 ± 0.3	19.7
BDO 2.0 (pMW118m-atoB-fadB)	20.4 ± 0.7	17.7 ± 1.6	86.8	0.9 ± 0.1	4.4	1.2 ± 0.1	5.9	10.0 ± 0.9	49.0	3.7 ± 0.4	18.1
BDO 1.1 (pMW118m-atoB-fadB)	23.0 ± 0.9	7.8 ± 0.6	33.9	0.5 ± 0.1	2.2	0.9 ± 0.1	3.9	18.2 ± 1.6	79.1	6.8 ± 0.6	29.6
BDO 2.1 (pMW118m-atoB-fadB)	24.0 ± 1.1	8.0 ± 0.6	33.3	0.7 ± 0.1	2.9	1.0 ± 0.1	4.2	17.7 ± 1.4	73.8	7.6 ± 0.7	31.7
BDO 1.2 (pMW118m-atoB-fadB)	23.2 ± 1.0	8.1 ± 0.7	34.9	0.4 ± 0.1	1.7	1.0 ± 0.1	4.3	18.0 ± 1.7	77.6	6.2 ± 0.6	26.7
BDO 2.2 (pMW118m-atoB-fadB)	23.6 ± 1.0	7.5 ± 0.6	31.9	0.6 ± 0.1	2.5	1.2 ± 0.1	5.1	13.2 ± 1.1	55.9	9.5 ± 0.8	40.3

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

тить, что инактивация пируват-формиат-лиазы при конститутивной экспрессии пируватдегидрогеназы приведет к анаэробной генерации НАДН избыточной для синтеза 1,3-БДО и будет способствовать формированию двух молекул этанола из одной молекулы глюкозы, вместо молекулы целевого диола. Принимая во внимание соответствующие соображения, нативный промотор *aceEF-lpdA* оперона в штаммах BDO 1.0 и BDO 2.0 был заменен сильным конститутивным промотором PL фага лямбда при сохранении интактной пируват-формиат-лиазы.

Модифицированные штаммы BDO 1.1 (pMW118m-*atoB-fadB*) и BDO 2.1 (pMW118m-*atoB-fadB*) при анаэробной утилизации глюкозы формировали сходные профили конечных продуктов, заметно отличающиеся от соответствующих профилей родительских штаммов (табл. 3). Конститутивная экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона привела, в первую очередь, к существенному повышению количества синтезируемого штаммами этанола, сопровождающемуся выраженным снижением секреции пировиноградной кислоты. Выход этанола, демонстрируемый рекомбинантами, несущими плазмиду pMW118m-*atoB-fadB*, возрастал в ~1.5 раза, до 73–79%, и достигал значений, характерных для безплазмидных вариантов родительских штаммов BDO 1.0 и BDO 2.0. Вместе с тем, штаммы BDO 1.1 (pMW118m-*atoB-fadB*) и BDO 2.1 (pMW118m-*atoB-fadB*) синтезировали значительные количества 1,3-БДО, и выход этого диола также увеличивался в ~1.5 раз по сравнению со штаммами предшественниками (~30–32% против ~18–20%). Таким образом, повышение анаэробного формирования восстановленных эквивалентов в равной степени способствовало формированию рекомбинантами спиртов, как основных восстановленных продуктов утилизации глюкозы. В случае экспрессии FucO, в качестве алкоголь дегидрогеназы, предпочтительное формирование этанола, по-видимому, было обусловлено субстратной специфичностью фермента. В случае YqhD дополнительным фактором, лимитирующим продукцию 1,3-БДО, мог являться недостаток НАДФН. *E. coli* обладает двумя трансгидрогеназами, ответственными за интерконверсию НАДФ⁺/НАДН и НАДФН/НАД⁺, растворимой SthA и мембранно-связанной PntAB. Физиологическая роль SthA заключается в реокислении НАДФН, тогда как PntAB служит основным источником НАДФН в клетке [25]. Соответственно, с целью проверки гипотезы об ограничении активности YqhD доступностью НАДФН, в штаммах была усилена экспрессия генов *pntAB*.

Соответствующие штаммы BDO 1.2 (pMW118m-*atoB-fadB*) и BDO 2.2 (pMW118m-*atoB-fadB*) анаэробно синтезировали этанол и 1,3-БДО в разных пропорциях (табл. 3). В то время как продукция спиртов штаммом BDO 1.2 (pMW118m-*atoB-fadB*),

экспрессирующим FucO в качестве алкоголь дегидрогеназы, была сравнима с показателями родительского штамма, продукция 1,3-БДО штаммом BDO 2.2 (pMW118m-*atoB-fadB*), экспрессирующим НАДФН-зависимую альдегид редуктазу YqhD, заметно возрастала, на фоне снижения секреции этанола. Выход 1,3-БДО, синтезированного штаммом BDO 2.2 (pMW118m-*atoB-fadB*) повышался в ~1.25 раза, до ~40%, и достигал 40% от теоретического максимума. При этом выход сформированного штаммом этанола снижался до с ~74 до ~56%, что соответствовало падению с 50 до 37% от теоретического максимума. Более того, несмотря на то, что 1,3-БДО не становился основным восстановленным продуктом анаэробной утилизации субстрата, вклад его биосинтеза в реокисление клеточных восстановленных эквивалентов превосходил таковой для этанола. Действительно, штамм синтезировал 9.5 мМ 1,3-БДО, что требовало расхода трехкратного числа восстановленных эквивалентов, 28.5 мМ, и 13.2 мМ этанола, что требовало расхода двухкратного числа эквивалентов, 26.2 мМ. Соответственно, повышение внутриклеточной доступности НАДФН резко улучшало характеристики штамма, экспрессирующего НАДФН-зависимую альдегид редуктазу YqhD в качестве алкоголь дегидрогеназы и однозначно свидетельствовало о предпочтительности использования данного фермента для биосинтеза целевого вещества. Потенциально, кофакторная специфичность YqhD позволяет перенаправить весь поток углерода через ацетил-КоА от этанола в сторону синтеза 1,3-БДО по обращенному БОЖК за счет прецизионной манипуляции внутриклеточным соотношением НАДФН/НАДН. Действительно, сохраняющийся синтез этанола штаммом BDO 2.2 (pMW118m-*atoB-fadB*) мог быть обусловлен как недостаточной активностью НАДФН-формирующей трансдегидрогеназы PntAB, так и интерферирующим действием НАДФН-окисляющей растворимой трансгидрогеназы SthA. Принципиально, действие SthA в клетке может быть исключено при делеции соответствующего гена. Однако при излишне активной PntAB, это может привести к резкому уменьшению эффективности синтеза 1,3-БДО в силу снижения доступности НАДН для реакций обращенного БОЖК. Достижение оптимального баланса между формированием и расходом НАДН/НАДФН в клетке в ходе анаэробного потребления углеводного субстрата, сопряженного с необходимостью поддержания окислительно-восстановительного баланса за счет синтеза 1,3-БДО по обращенному БОЖК, будет являться предметом дальнейших исследований.

Результатом данной работы явилась демонстрация принципиальной возможности эффективного синтеза 1,3-БДО из глюкозы по обращенному БОЖК рекомбинантными штаммами *E. coli*. Продукция целевого вещества *de novo* сконструиро-

рованным штаммом в 30 раз превосходила показатели достигнутые ранее. Ключевым моментом, обеспечившим достижение данного результата, явилось использование в качестве терминирующих ферментов, катализирующих конверсию сформированного в БОЖК 3-гидроксипутирил-КоА в 1,3-БДО, бутиральдегид дегидрогеназы Bld C. *saccharoperbutylacetonicum* и НАДФН-зависимой альдегид редуктазы YqhD *E. coli*.

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 заявляет, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matsuyama A., Yamamoto H., Kawada N., Kobayashi Y. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2001. V. 11. № 4–6. P. 513–521.
2. Kataoka N., Vangnai A.S., Tajima T., Nakashimada Y., Kato J. // J. Biosci. Bioeng. 2013. V. 115. № 5. P. 475–480.
3. Sun D., Li Y., Yang C., Su J., Yamada Y., Sato S. // Fuel. Process. Technol. 2020. V. 197. 106193. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106193>
4. Patel R.N. // Stereoselective Biocatalysis, N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 2000. 932 p.
5. Boaz N.W., Ponasiak J.A., Large S.E. // Tetrahedron Lett. 2006. V. 47. № 24. P. 4033–4035.
6. Yoo J.I., Sohn Y.J., Son J., Jo S.Y., Pyo J., Park S.K., et al. // Biotechnol. J. 2022. V. 17. № 3. e2000451. <https://doi.org/10.1002/biot.202000451>
7. Nemr K., Müller J.E.N., Joo J.C., Gawand P., Choudhary R., Mendonca B., et al. // Metab. Eng. 2018. V. 48. P. 13–24.
8. Kim T., Stogios P.J., Khusnutdinova A.N., Nemr K., Skarina T., Flick R. et al. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 2. P. 597–609.
9. Liu Y., Cen X., Liu D., Chen Z. // ACS Synth. Biol. 2021. V. 10. № 8. P. 1946–1955.
10. Islam T., Nguyen-Vo T.P., Gaur V.K., Lee J., Park S. // Bioresour. Technol. 2023. V. 76. 128911. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128911>
11. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 21–29.
12. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 5. С. 12–19.
13. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Моржакова А.А., Антонова С.В., Сухоженко А.В., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 383–388.
14. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
15. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
16. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
17. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г. и др. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
18. 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.
19. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 3. P. 463–469.
20. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
21. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E. et al. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
22. Chen M., Ma X., Chen X., Jiang M., Song H., Guo Z. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 12. P. 2768–2775.
23. Clark D.P., Cronan J.E. // EcoSal Plus. 2005. V. 1. № 2. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.4>
24. Soini J., Falschlehner C., Liedert C., Bernhardt J., Vuoristo J., Neubauer P. // Microb. Cell. Fact. 2008. V. 7. № 30. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-30>
25. Sauer U., Canonaco F., Heri S., Perrenoud A., Fischer E. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 8. P. 6613–6619.

Optimization of 1,3-Butanediol Biosynthesis from Glucose Through the Inverted Fatty Acid β -Oxidation Pathway 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.ru

In derivatives of *Escherichia coli* strain MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, devoid of mixed-acid fermentation pathways, the expression of native L-1, 2-propanediol oxidoreductase and NADPH-dependent aldehyde reductase genes, *fucO* and *yqhD*, was enhanced, and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* butyraldehyde dehydrogenase gene, *bld*, was expressed. The ability to biosynthesize 1,3-butanediol from glucose resulting from functional reversal of fatty acid β -oxidation was ensured in the recombinants due to the increased expression of the *atoB* and *fadB* genes encoding acetyl-CoA C-acetyltransferase and bifunctional (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase. Anaerobic substrate to target product conversion of 0.2 mol/mol was achieved with ~4 mM 1,3-butanediol accumulation. When the intracellular availability of NADH equivalents was increased due to constitutive expression of genes of pyruvate dehydrogenase complex, *aceEF-lpdA*, the conversion of glucose to 1,3-butanediol increased up to ~0.3 mol/mol with accumulation of the target product at the level of ~7 mM. Enhanced expression of the membrane-bound transhydrogenase genes, *pntAB*, led to the synthesis of 9.5 mM 1,3-butanediol by the *yqhD*-overexpressing strain with a yield of 0.4 mol/mol.

Keywords: *Escherichia coli*, 1,3-butanediol, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering, NADH, NADPH