ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ /
APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY. 2026. Т. 62. № 5. С. 787–796

DOI: 10.7868/S3034574X26050094 Оригинальная статья

УДК 577.121

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА *Escherichia coli* ДЛЯ РЕСПИРАТОРНОГО ФОРМИРОВАНИЯ D-АЛАНИНА ИЗ ГЛЮКОЗЫ В УСЛОВИЯХ АНАЭРОБИОЗА

А.Ю. Скороходова[1], А.А. Стасенко[1], А.Ю. Гулевич[1*]

[1]Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

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

Аннотация. С использованием направленно сконструированных производных штамма *Escherichia coli* PA4FPS (MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*) с нарушенной способностью к брожению, продемонстрирован биосинтетический потенциал этой бактерии для эффективного респираторного формирования D-аланина из глюкозы в анаэробных условиях. Стереоселективный биосинтез D-аланина с энантиомерным избытком 99% и коэффициентом конверсии субстрата в целевой продукт составляющим 0.46 моль/моль был обеспечен за счет восстановительного аминирования пирувата респираторной дегидрогеназой D-аминокислот DadA при инактивации в штамме аланинрацемаз DadX и Alr. Секреция штаммом молочной кислоты была предотвращена в результате последовательной инактивации респираторных лактатдегидрогеназ LldD и Dld и вела к росту выхода целевого вещества до 0.62 моль/моль. Усиление экспрессии гена дегидрогеназы D-аминокислот DadA привело к росту выхода D-аланина из глюкозы штаммом, респираторно синтезирующим целевой продукт в бескислородных условиях, до 1.07 моль/моль.

Ключевые слова: *D-аланин*, *аланинрацемаза*, *дегидрогеназа D-аминокислот*, *дыхание*, *метаболическая инженерия*, *Escherichia coli*

Финансирование. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета учреждения.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка цитирования: Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю. Исследование биосинтетического потенциала Escherichia coli для респираторного формирования D-аланина из глюкозы в условиях анаэробиоза. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology.* 2026. Т. 62. № 5. С. 787–796. https://doi.org/10.7868/S3034574X26050094

© А.Ю. Скороходова, А.А. Стасенко, А.Ю. Гулевич, 2026

PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA /
APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY, 2026, vol. 62, no. 5, pp. 787–796

DOI: 10.7868/S3034574X26050094 Original Article

EVALUATION OF THE BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF *Escherichia coli* FOR THE RESPIRATORY FORMATION OF D-ALANINE FROM GLUCOSE UNDER ANAEROBIC CONDITIONS

A. Yu. Skorokhodova[1], A.A. Stasenko[1], A. Yu. Gulevich[1]*

[1]*Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

Abstract. Using directly engineered derivatives of *Escherichia coli* strain *coli* PA4FPS (MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*) with impaired fermentation ability the biosynthetic potential of this bacterium for the efficient respiratory formation of D-alanine from glucose under anaerobic conditions was demonstrated. Stereoselective biosynthesis of D-alanine with a 99% enantiomeric excess and a substrate-to-product conversion ratio of 0.46 mol/ mol was achieved due to the reductive amination of pyruvate by the respiratory D-amino acid dehydrogenase DadA upon inactivation of the alanine racemases DadX and Alr in the strain. Lactic acid secretion by the strain was prevented by the sequential inactivation of the respiratory lactate dehydrogenases LldD and Dld, resulting in an increase in the yield of the target compound to 0.62 mol/mol. Enhancement of the D-amino acid dehydrogenase DadA gene expression led to an increase in the yield of D-alanine from glucose by the strain respiratory synthesizing the target product under anaerobic conditions up to 1.07 mol/mol.

Keywords: D-alanine, alanine racemase, D-amino acid dehydrogenase, metabolic engineering, Escherichia coli, respiration

Funding. This work was supported by ongoing institutional funding. No additional grants to carry out or direct this particular research were obtained.

Ethics declarations. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Authors contribution. All the authors contributed equally to the conceptualization of the study, conducting the research and manuscript preparation.

For Citation: Skorokhodova A.Yu., Stasenko A.A., Gulevich A.Yu. Evaluation of the Biosynthetic Potential of Escherichia coli for the Respiratory Formation of D-Alanine from Glucose Under Anaerobic Conditions. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology.* 2026;62(5):787–796. (In Russ.) https://doi.org/10.7868/S3034574X26050094

© A. Yu. Skorokhodova, A.A. Stasenko, A. Yu. Gulevich, 2026

ВВЕДЕНИЕ

D-аланин, непротеиногенный стереоизомер 2-аминопропановой кислоты, обладает широким спектром применения в медицине и различных отраслях промышленности, включая пищевую, косметическую и фармацевтическую. Являясь коагонистом рецепторов N-метил-D-аспартата (**NMDAR**) в центральной нервной системе, D-аланин, в составе комбинированной терапии, проявляет выраженный позитивный эффект при лечении ряда неврологических и психиатрических нарушений, в том числе шизофрении, депрессии, болезни Альцгеймера и расстройств аутистического спектра [11, 16]. Обладая собственным сладким вкусом, наиболее выраженным среди аминокислот, D-аланин используется в качестве функционального подсластителя как непосредственно, так и в составе дипептида с L-аспарагиновой кислотой (Алитам), обладающего сладостью в 10 раз превосходящей сладость аспартама и в 6 раз сахарина [2]. Как компонент натурального увлажняющего фактора, D-аланин входит в состав множества косметических композиций, предназначенных для поддержания адекватного уровня гидратации stratum corneum [1]. Меченые производные D-аланина применяют при разработке новых антибиотиков для оценки и визуализации их воздействия на формирование клеточной стенки [6, 13].

В настоящее время эта аминокислота и ее предшественники производятся химическим синтезом с последующим разделением рацемических смесей либо химическими, либо ферментативными методами. Также, в промышленном производстве D-аланина применяется ферментативный гидролиз D/L-аланинамида D-аминопептидазами и асимметричное аминирование пировиноградной кислоты с использованием дегидрогеназ D-аминокислот или трансаминаз [14, 23].

Вместе с тем, D-аланин является значимым компонентом пептидогликана и синтезируется бактериями для построения клеточной стенки [22]. Таким образом, эффективная продукция D-аланина может потенциально быть обеспечена посредством микробиологического синтеза с использованием в качестве субстратов дешевых и доступных сахаров растительной биомассы. Действительно, известно, что отдельные представители *Corynebacterium* и *Bacillus* природно способны к секреции заметных количеств D-аланина [12, 24]. Более того, недавно был продемонстрирован эффективный стереоселективный аэробный биосинтез D-аланина из глюкозы штаммами *C. glutamicum*, подвергнутыми направленной метаболической инженерии, включающей инактивацию аланинрацемазы (Alr, КФ 5.1.1.1), обеих ответственных за биосинтез L-аланина аминотрансфераз (глутамт-зависимой AlaT, КФ 2.6.1.2, и валин-зависимой AvtA, КФ 2.6.1.66) и экспрессию гетерологичной *мезо*-диаминопимелат дегидрогеназы (КФ 1.4.1.16) [19]. Однако анаэробные процессы являются более предпочтительными для промышленного получения продуктов микробного синтеза, в силу меньших капитальных затрат, операционных издержек и проблем связанных с массообменном и контаминацией [3].

Ранее было показано, что штаммы *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению при потреблении глюкозы в бескислородных условиях поддерживают внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс за счет респираторного формирования из пирувата D/L-лактата и D/L-аланина [18].

Целью данной работы являлась оценка биосинтетического потенциала *Escherichia coli* для стереоселективного респираторного формирования D-аланина из глюкозы в условиях анаэробиоза.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали рестриктазу *Bgl*II, ДНК-полимеразу Taq, T4 ДНК-лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), а также высокоточную ДНК-полимеразу Kapa 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

Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ B-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* PA4FPS (MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*) [18], обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы, делетированной пируват-формиат-лиазой, и лишенный путей смешанно-кислотного брожения, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Бактерии культивировали, используя богатые среды LB, SOB, SOC и минимальную солевую среду M9 [15], с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Целевые штаммы, производные штамма PA4FPS, с инактивированными генами *lldD* и *dld*, были получены посредством P1-зависимых трансдукций [15] с использованием ранее полученных препаратов P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [17]. Делеции в хромосоме *E. coli* генов *dadX* и *alr*, а также замену нативной регуляторной области гена *dadA* искусственным генетическим элементом P_L-$SD_{\phi 10}$ осуществляли с использованием Red-зависимой системы гомологичной рекомбинации фага лямбда по методу описанному ранее [4].

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Table 1. Oligonucleotide primers used in this work

№	Последовательность
P1	5’-gatgacccgtccgatacaggccagcctcgatctgca-cgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3’
P2	5’-ttacaccgtcacaaccgggacgcgtagcgccagcgc-tgaagcctgctttttatactaagttgg-3’
P3	5’-cagcgatcccatatgaggatc-3’
P4	5’-catgggcaatggctctgtcac-3’
P5	5’-aatgcaagcggcaactgttgtgattaaccgccgcgc-cgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3’
P6	5’-ttaatccacgtatttcatcgcgacccttgaagtcag-tgaagcctgctttttatactaagttgg-3’
P7	5’-gtcaatggtcgcgcttcgac-3’
P8	5’-gtggatgttcaggagcgaac-3’
P9	5’-tgcgac-agatct-ctcacctaccaaacaatgccc-3’
P10	5’-atgtatatctccttc-acggccaatgcttcgtttc-3’
P11	5’- gcctaccacaccacttcccagtatgacaactcgcat-atgtatatctccttc-acggccaatg-3’
P12	5’- ctagta-agatct-tgaagcctgctttttatactaagttgg-3’
P13	5’- tattcttttactgtatctaccgttatcggagtggct-cgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3’
P14	5’-gagatgtgagccagctcacc-3’
P15	5’-gacggtgacctcatgtcctg-3’

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

Table 2. Strains and plasmids constructed and used in the study

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм *E. coli* дикого типа (ВКПМ B-6195)	ВКПМ
PA4FPS	*E. coli* MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*	[18]
DALA0.1	*E. coli* MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*, Δ*dadX*	Данная работа
DALA1.0	*E. coli* MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*, Δ*dadX*, Δ*alr*	Данная работа
DALA2.0	*E. coli* MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*, Δ*dadX*, Δ*alr*, Δ*lldD*	Данная работа
DALA3.0	*E. coli* MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*, Δ*dadX*, Δ*alr*, Δ*lldD*, Δ*dld*	Данная работа
DALA4.0	*E. coli* MG1655 Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*ptsG*, P_L*glk*, P_{tac}-*galP*, Δ*frdAB*, Δ*pflB*, Δ*sdhAB*, Δ*dadX*, Δ*alr*, Δ*lldD*, Δ*dld*, P_L-$SD_{\varphi 10}$-*dadA*	Данная работа
Плазмида		
pMW118-(λ*attL*-Cm-λ*attR*)	pSC101, *bla*, *cat*, λ*attL-cat-*λ*attR*	[10]
pKD46	pINT-ts, *bla*, P_{araB}-λ*gam-bet-exo*	[4]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, *bla*, P_R-λ*xis-int*, c*I*ts857	[7]

Конструирование штаммов

Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *dadX* и *alr*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1 и P2, P5 и P6, и плазмиды pMW118-(λ*attL*-Cm-λ*attR*) [10] в качестве матрицы.

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *dadA* искусственным генетическим элементом P_L-$SD_{ф10}$, содержащим промотор P_L фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена ф10 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 ф10 из фага T7 и 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *dadA*. Фрагмент получал в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда и праймеров P9 и P10 был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L и часть последовательности SD гена ф10 из фага T7. Соответствующий ПЦР-продукт служил матрицей в следующем раунде ПЦР с использованием праймеров P9 и P11. Праймер P11 содержал область комплементарную 3'-концу промотора P_L, последовательность SD гена ф10 из фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамки считывания гена *dadA*. 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 *dadA*, был получен ПЦР с использованием праймеров P12 и P13 и плазмиды pMW118-(λ*attL*-Cm-λ*attR*) в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P11 и P13. Полученные ПЦР-продукты были интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46 [4]. Факт инактивации генов *dadX* и *alr* в хромосомах отобранных интегрантов подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P3 и P4, P7 и P8. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *dadA*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P14 и P15. Соответствующие маркированные генетические модификации первоначально были получены в штамме MG1655 и затем перенесены 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 [7]. 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. По 5 мл ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 *g* при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл модифицированной среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 2 г/л NH_4Cl. В дальнейшем культуры инкубировали в течение 24 ч. в пробирках объемом 15 мл, закрытых завинчивающимися крышками, при 37°C на роторной качалке при 250 об./мин. 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 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.

Концентрации этанола в культуральных жидкостях определяли методом газовой хроматографии на колонке OmegaWax (30 м, 0.25 мм внутренний диаметр, 0.25 мкм толщина пленки, "Supelco", США). Использовали хроматограф GC-17A ("Shimadzu", Япония), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и автосамплером AOC-20i.

Энантиомерный состав секретированного штаммами аланина определяли методом хиральной лигандообменной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, как описано ранее [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве базового, для оценки биосинтетического потенциала *E. coli* для респираторного формирования D-аланина из глюкозы в анаэробных условиях, использовали штамм *E. coli* PA4FPS (табл. 2). Было показано, что данный штамм, с инактивированными путями смешанно-кислотного брожения, способен к анаэробной утилизации глюкозы за счет восстановительного формирования из пирувата лактата и аланина, обеспечивающего поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса. Секретированные штаммом в среду лактат и аланин были представлены смесями соответствующих D- и L-стереоизомеров, что указывало на вовлеченность в данный процесс респираторных L- и D-лактатдегидрогеназ, LldD (КФ 1.1.5.-) и Dld (КФ 1.1.5.12), соответственно, а также респираторной дегидрогеназы D-аминокислот DadA (КФ 1.4.5.1) и аланинрацемазы DadX (КФ 5.1.1.1). В норме, соответствующие ферменты катализируют аэробную хинон-зависимую конверсию L-молочной кислоты, D-молочной кислоты и D-аланина в пировиноградную кислоту [5, 8, 20–21]. Однако в штамме PA4FPS с нарушенной способностью к брожению, анаэробному реокислению восстановительных эквивалентов, сформированных в ходе гликолиза, способствовало их обращенное хинол-зависимое действие.

При анаэробной утилизации глюкозы штамм PA4FPS секретировал ~6.7 мМ D/L-аланина с выходом 0.44 моль/моль и соотношением D- и L-стереоизомеров, составляющим приблизительно 30/70 (рис. 1, табл. 3).

Таким образом, для предотвращения конверсии сформированного дегидрогеназой D-аминокислот D-аланина в соответствующий L-стреоизомер, ген *dadX*, кодирующий аланинрацемазу, был инактивирован в штамме PA4FPS.

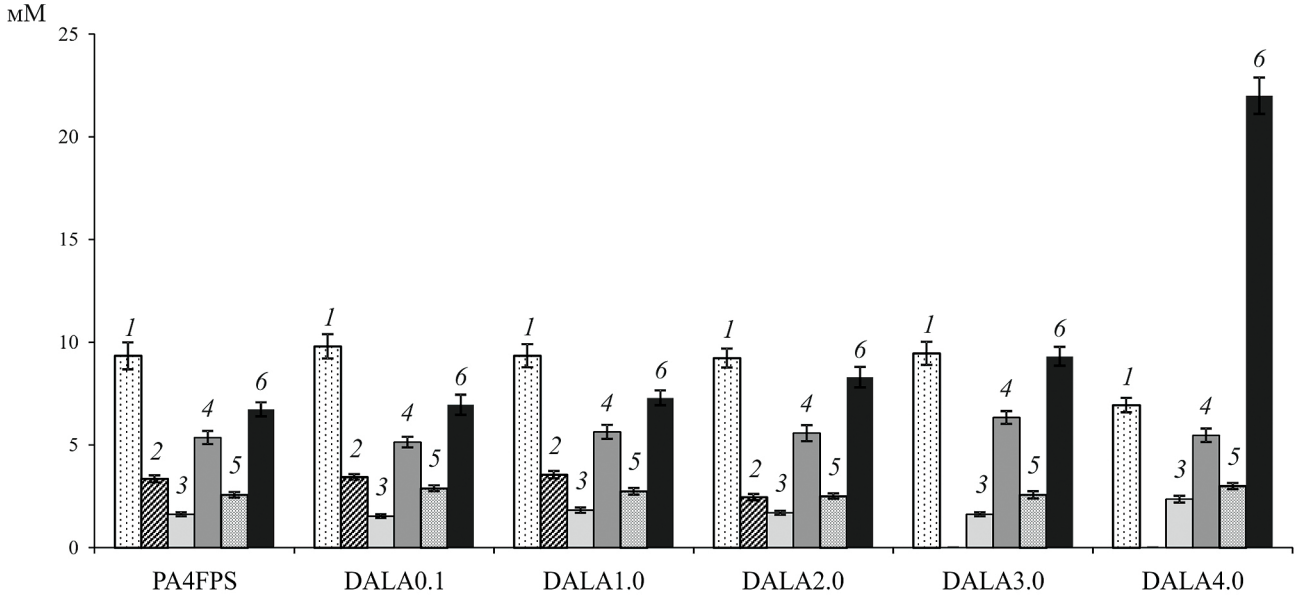

Рис. 1. Концентрации метаболитов, секретированных сконструированными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы: *1* – пируват, *2* – лактат, *3* – ацетат, *4* – этанол, *5* – сукцинат, *6* – аланин
Fig. 1. Concentrations of metabolites secreted by the engineered strains during anaerobic glucose utilization: *1* – pyruvate, *2* – lactate, *3* – acetate, *4* – ethanol, *5* – succinate, *6* – alanine

Потребление глюкозы и продукция метаболитов соответствующим производным штаммом DALA0.1 практически не отличались от таковых, характерных для родительского штамма (рис. 1, табл. 3). Доля D-стереоизомера среди энантиомеров сформированного штаммом аланина возросла до ~86%. При этом, остаточная секреция штаммом L-аланина указывала на участие в формировании этого стереоизомера иных ферментов помимо DadX. Действительно, *E. coli* обладает двумя аланинрацемазами, основной DadX и минорной пиридоксаль-5'-фосфат-зависимой Alr. Таким образом, несмотря невысокую активность Alr, обеспечение стереоселективного биосинтеза штаммами D-аланина требовало дополнительной к DadX инактивации данного фермента. Соответственно, ген *alr* был делетирован в штамме DALA0.1 с получением штамма DALA1.0.

Таблица 3. Характеристики анаэробного потребления глюкозы и продукции метаболитов сконструированными штаммами *

Table 3. Characteristics of anaerobic glucose utilization and metabolite production by the engineered strains *

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Выход метаболитов, моль/моль						Соотношение D-Ala/L-Ala	Углеродный баланс, %
		пируват	лактат	ацетат	этанол	сукцинат	аланин		
PA4FPS	15.3±0.3	0.61±0.02	0.22±0.01	0.11±0.01	0.35±0.02	0.17±0.01	0.44±0.02	28.2/71.8	90
DALA0.1	16.2±0.4	0.60±0.03	0.21±0.01	0.09±0.01	0.32±0.01	0.18±0.01	0.43±0.02	86.4/13.6	88
DALA1.0	15.7±0.4	0.59±0.02	0.23±0.02	0.12±0.01	0.36±0.02	0.17±0.01	0.46±0.02	99.5/0.5	92
DALA2.0	15.3±0.3	0.60±0.02	0.16±0.01	0.11±0.01	0.36±0.02	0.16±0.01	0.54±0.03	99.5/0.5	92
DALA3.0	15.0±0.3	0.63±0.02	–	0.11±0.01	0.42±0.03	0.17±0.01	0.62±0.03	99.5/0.5	92
DALA4.0	20.5±0.6	0.34±0.1	–	0.12±0.01	0.27±0.01	0.15±0.01	1.07±0.04	99.5/0.5	93

*Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. Углеродный баланс рассчитан как выраженное в процентах отношение общего количества молей углерода в секретированных продуктах к количеству молей углерода потребленной глюкозы.

*Standard deviations for three independent experiments are given. Carbon recovery was calculated as the ratio of total moles of carbon in the end-products per moles of carbon in total glucose consumed and expressed on a percentage basis

Инактивация обеих аланинрацемаз не оказывала выраженного влияния на формирование метаболитов и потребление глюкозы штаммом DALA1.0, но кардинально изменяла соотношение синтезированных штаммом стереоизомеров аланина (рис. 1, табл. 3). Штамм DALA1.0 формировал D-аланин с энантиомерным избытком, достигающим 99%, тогда как доля L-стереоизомера составляла, соответственно, лишь 0.5%. Образование следовых количеств L-аланина, в данном случае, было, по-видимому, обусловлено действием мультифункционального белка MetC, обладающего, в первую очередь, активностью цистатионин β-лиазы (КФ 4.4.1.13) и L-цистеин десульфгидразы (КФ 4.4.1.28), но способного, при оверэксрпессии, супрессировать потерю клетками аланинрацемаз [9]. Вместе с тем, выход синтезированного штаммом аланина сохранялся на уровене 0.46 моль/моль, а его доля среди восстановленных продуктов утилизации глюкозы составляла ~36%. Помимо аланина, штамм синтезировал, в качестве таких продуктов, лактат, этанол и сукцинат. С учетом инактивации в штамме пируват-формиат-лиазы (КФ 2.3.1.54), фумаратредуктазы (КФ 1.3.5.4), сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1) и основной алкоголь/альдегиддегидрогеназы AdhE (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3), формирование рекомбинантом сукцината и этанола являлось следствием сохраняющейся в клетках базальной активности ацетил-КоА генерирующего пируватдегидрогеназного ферментативного комплекса (КФ 1.2.4.1/2.3.1.12/1.8.1.4), действием глиоксилатного шунта и фоновой активностью множественных клеточных алкголь- и альдегиддегидрогеназ [18]. При этом, конверсия пирувата в лактат в штамме катализировалась респираторными лактатдегидрогеназами LldD и Dld и их хинол-зависимое действие являлось прямо конкурентным по отношению к активности респираторной дегидрогеназы D-аминокислот DadA. Соответственно, для повышения выхода D-аланина и его доли среди восстановленных продуктов, респираторные лактатдегидрогеназы были последовательно инактивированы в штамме DALA1.0 за счет делеции генов *lldD* и *dld*.

Штамм DALA2.0 с инактивированной L-лактатдегидрогеназой LldD анаэробно конвертировал глюкозу в D-аланин с выходом, возросшим до 0.54 моль/моль, при этом выход лактата снижался на ~30%, а формирование штаммом других метаболитов не претерпевало заметных изменений (табл. 3). Таким образом, можно было заключить, что D-лактатдегидрогеназа Dld служила основным ферментом, вносящим вклад в образование молочной кислоты полученным рекомбинантом. Действительно, секреция лактата производным штаммом DALA3.0, лишенным активности обеих респираторных лактатдегидрогеназ, LldD и Dld, прекращалась (рис. 1, табл. 3). Выход D-аланина повышался до 0.62 моль/моль, а его доля среди

восстановленных продуктов утилизации глюкозы, секретированных штаммом DALA3.0, достигала ~51%, превосходя таковую, демонстрируемую родительским штаммом DALA2.0 (~40%). Отсутствие лактата в средах культивирования штамма DALA3.0 дополнительно свидетельствовало о респираторном формировании данного вещества в клетках штаммов предшественников и базового штамма P4FPS. Действительно, потенциально, в отсутствие ферментативной лактатдегидрогеназы LdhA (КФ 1.1.1.28), клетки *E. coli* способны формировать D- и L-лактат в ходе деградации метилглиоксаля. В этом случае, гликолитически сформированный дигидроксиацетон-фосфат первично конвертируется в метилглиоксаль метилглиоксаль синтазой (MgsA, КФ 4.2.3.3). В дальнейшем, метилглиоксаль может конвертироваться в D-лактат либо в результате прямого действия гидроксиацилглутатион гидролазы (GloC, КФ 3.1.2.6), либо в результате последовательного действия лактоилглутатион лиазы (GloA, КФ 4.4.1.5) и гидроксиацилглутатион гидролазы (GloB, КФ 3.1.2.6). Альтернативно, метилглиоксаль может подвергаться восстановлению НАДФН-зависимой метилглиоксаль редуктазой (КФ 1.1.1.283) с последующим окислением интермедиата, L-лактальдегида, в L-лактат под действием $НАД^+$- или $НАДФ^+$-зависимых альдегид дегидрогеназ AldA (КФ 1.2.1.22) и AldB (КФ 1.2.1.4) [25]. Однако соответствующие превращения, в отличие от катализируемых лактатдегидрогеназами, в сумме являются окислительно-восстановительно нейтральными и не могут обеспечить анаэробное потребление глюкозы штаммами с нарушенной способностью к брожению.

Следует отметить, что при прекращении формировании лактата штаммом DALA3.0, выход D-аланина не повышался пропорционально, а возрастал совместно с увеличением выхода этанола (табл. 3). Принципиально, конверсия ацетил-КоА в этанол расходует в два раза больше восстановленных эквивалентов, нежели превращения пирувата в D-аланин. И таким образом, должна в большей степени способствовать поддержанию внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в дефицитнах по брожению рекомбинантах при анаэробном потреблении ими глюкозы. Этим мог бы объясняться несколько возросший выход этанола, демонстрируемый штаммом DALA3.0. Однако в исследуемых штаммах формирование ацетил-КоА из пирувата происходит под действием НАДН-генерирующей пируватдегидрогеназы, что сводит на нет преимущество ферментативной конверсии соответствующего предшественника в этанол в сравнении с его респираторным восстановительным аминированием в D-аланин. Таким образом, можно было предположить, что эффективность конверсии пирувата в D-аланин в штамме DALA3.0 лимитировалась активностью дегидрогеназы D-аминокислот DadA.

В *E. coli* экспрессия гена *dadA* регулируется CRP-цАМФ [26] и, следовательно, возрастает в штаммах с измененной функциональностью фосфоенолпируват-зависимой системы транспорта и фосфорилирования глюкозы. Тем не менее, CRP-цАМФ-опосредованной активации экспрессии *dadA* в *pts*$^-$ штамме PA4FPS и его производных было не достаточно для обеспечения клеток активностью дегидрогеназы D-аминокислот способствующей эффективному синтезу целевого вещества при исключении конкурентного действия респираторных лактатдегидрогеназ. Поэтому экспрессия гена *dadA* в штамме DALA3.0 была усилена за счет введения сильного конститутивного промотора P_L фага лямбда и высокоэффективного сайта связывания рибосом гена ф10 фага T7 непосредственно перед кодирующей областью целевого гена. Соответствующий производный штамм был обозначен как DALA4.0.

При анаэробном потреблении глюкозы, штамм DALA4.0 синтезировал ~22 мМ D-аланина с выходом, возросшим до 1.07 моль/моль и энантиомерным избытком соответствующего стереоизомера, сохраняющимся на уровне 99% (рис.1, табл. 3). При этом доля D-аланина среди восстановленных продуктов, сформированных штаммом, достигала 72%. В первую очередь, это происходило за счет заметного снижения выхода секретированного штаммом этанола (в 1.5 раз). Более того, D-аланин становился основным продуктом анаэробного потребления штаммом глюкозы и его выход превосходил выход прямого предшественника, пирувата (0.34 моль/моль), секретируемого в среду в качестве основного метаболита штаммами-предшественниками (табл. 3). Интересно отметить, что потребление глюкозы штаммом DALA3.0 возрастало на ~25% по сравнению с родительскими штаммами. Это указывало на то, что респираторное формирование D-аланина в результате восстановительного аминирования обладает высоким потенциалом для эффективного обеспечения у рекомбинантов с нарушенной способностью к брожению внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, способствующего полноценному анаэробному потреблению ими гликолитических субстратов. Обеспечение прямой зависимости возможности потребления клеткой углеродного субстрата от необходимости синтеза целевого продукта является одним из мощнейших подходов рациональной метаболической инженерии, направленной на создания высокоэффективных специализированных промышленных продуцентов полезных метаболитов. В данной связи, полученные и охарактеризованных в работе штаммы могут служить удобной и перспективной базой для дальнейшей оптимизации и разработки на их основе процессов микробиологического синтеза D-аланина из сахаров растительной биомассы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного "подтверждающего концепцию" исследования демонстрируют принципиальную возможность эффективного и стереоселективного респираторного формирования D-аланина из глюкозы в условиях анаэробиоза направленно сконструированными штаммами *E. coli*. Несмотря на то, что максимальный выход целевого вещества, достигнутый в настоящей работе, составлял лишь ~50% от теоретического максимума, полученные данные предполагают возможность дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик модельных продуцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Baldwin H., Del Rosso J. Going beyond ceramides in moisturizers: role of natural moisturizing factors. *J. Drugs. Dermatol.*, 2024, vol. 23, no. 6, pp. 466–471. https://doi.org/10.36849/JDD.8358
2. Chattopadhyay S., Raychaudhuri U., Chakraborty R. Artificial sweeteners – a review. *J. Food. Sci. Technol.*, 2014, vol. 51, no. 4, pp. 611–621. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0571-1
3. Chen G.Q. New challenges and opportunities for industrial biotechnology. *Microb. Cell. Fact.*, 2012. vol. 11, no. 111. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-111
4. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645. https://doi.org/10.1073/pnas.120163297
5. Dong J.M., Taylor J.S., Latour D.J., Iuchi S., Lin E.C. Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1993, vol. 75, no. 20. pp. 6671–6678. https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6671-6678.1993
6. Gao J., Guo J., Chen J. et al. D-Amino Acid-Based Metabolic Labeling Enables a Fast Antibiotic Susceptibility Test of Both Isolated Bacteria and Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Adv. Health. Mater.*, 2022, vol. 11. no. 6, e2101736. https://doi.org/10.1002/adhm.202101736.
7. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Ermishev V.Y. et al. A new method for the construction of translationally coupled operons in a bacterial chromosome. *Mol. Biol.*, 2009, vol. 43, no. 3, pp. 505–514. https://doi.org/10.1134/S0026893309030194
8. Jones H., Venables W.A. Effects of solubilisation on some properties of the membrane-bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli*. FEBS Lett., 1983, vol. 151. no. 2, pp. 189–192. https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80066-0
9. Kang L., Shaw A.C., Xu D. et al. Upregulation of MetC Is Essential for D-Alanine-Independent Growth of an *alr*/*dadX*-Deficient *Escherichia coli* Strain J. Bacteriol., 2011, vol. 193, no. 5. pp. 1098–1106. https://doi.org/10.1128/JB.01027-10
10. Katashkina J.I., Skorokhodova A.Y., Zimenkov D.V. et al. Tuning the Expression Level of a Gene Located on a Bacterial Chromosome. *Mol. Biol.*, 2005, vol. 39, no. 5, pp. 719–726. https://doi.org/10.1007/s11008-005-0087-8
11. Lee C.J., Qiu T.A., Sweedler J.V. D-Alanine: Distribution, origin, physiological relevance, and implications in disease. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins. Proteom.*, 2020, vol. 1868, no. 11, 140482. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140482
12. Lee C.J., Qiu T.A., Hong Z. et al. Profiling of d-alanine production by the microbial isolates of rat gut microbiota. *FASEB J.*, 2022, vol. 36, no. 8, e22446. https://doi.org/10.1096/fj.202101595R
13. Mota F., Jain S.K. Flagging Bacteria with Radiolabeled d-Amino Acids. ACS Cent. Sci., 2020, vol. 6, no. 2. pp. 97–99. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00096
14. Pollegioni L., Rosini E., Molla G. Advances in Enzymatic Synthesis of D-Amino Acid. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 9, 3206. https://doi.org/10.3390/ijms21093206
15. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2 nd Ed.* N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989, 1659 p.
16. Shi Y., Hussain Z., Zhao Y. Promising Application of D-Amino Acids toward Clinical Therapys. Int. J. Mol. Sci., 2022, vol. 23, no. 18. 10794. https://doi.org/10.3390/ijms231810794
17. Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G. Optimization of the Anaerobic Production of Pyruvic Acid from Glucose by Recombinant *Escherichia coli* strains with Impaired Fermentation Ability via Enforced ATP Hydrolysis. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2021, vol., 57, no. 4, pp. 434–442. https://doi.org/10.1134/S0003683821040153
18. Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Gulevich, A.Y., Debabov V.G. Activation of Alternative Respiration with Internal Electron Acceptor during Anaerobic Glucose Utilization in *Escherichia coli* Strains with

Impaired Fermentation Ability. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2019, vol., 55, no. 9, pp. 870–876. https://doi.org/10.1134/S0003683819090072

19. Tian S., Zhao G., Lv G., et al. Efficient Fermentative Production of d-Alanine and Other d-Amino Acids by Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum*. *J. Agric. Food. Chem.*, 2024, vol. 72, no. 14. pp. 8039–8051. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c00914
20. Unden G., Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, vol. 1320, no. 3, pp. 217–234. https://doi.org/ 10.1016/s0005-2728(97)00034-0
21. Wallace B.J., Young I.G. Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in Escherichia coli. Studies with a *ubiA*$^-$ *menA*$^-$ double quinone mutant. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1977, vol. 461, no. 1, pp. 84–100. https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90071-8
22. Walsh C.T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, no 5. pp. 2393–2396. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81624-1
23. Yagasaki M., Ozaki M. Industrial biotransformations for the production of d-amino acids. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.*, 1998, vol. 4, no. 1–2, pp. 1–11. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(97)00011-8.
24. Yamada S., Maeshima H., Wada M., Chibata I. Production of D-alanine by *Corynebacterium fascians*. *Appl. Microbiol.*, 1973, vol. 25, no. 4. pp. 636–40. https://doi.org/10.1128/am.25.4.636-640.1973
25. Zhang X., Jantama K., Moore J.C., Shanmugam K.T., Ingram L.O. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 77, no. 2, pp. 355–366. https://doi.org/ 10.1007/s00253-007-1170-y
26. Zhi J., Mathew E., Freundlich M. In vitro and in vivo characterization of three major *dadAX* promoters in *Escherichia coli* that are regulated by cyclic AMP-CRP and Lrp. *Mol. Gen. Genet.*, 1998, vol. 258, no. 4, pp. 442–447. https://doi.org/10.1007/s004380050754

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Скороходова Александра Юрьевна – к.б.н., с.н.с. группы метаболической инженерии бактерий Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

Стасенко Анастасия Александровна – инженер группы метаболической инженерии бактерий Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: nastena2205@mail.ru

Гулевич Андрей Юрьевич – к.х.н, с.н.с., руководитель группы метаболической инженерии бактерий Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
E-mail: andrey.gulevich@gmail.com

AUTHOR INFORMATION

Skorokhodova, Alexandra Yu. – Ph.D. in Biology, Senior Researcher, Group of metabolic engineering of bacteria, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

Stasenko, Anastasia A. – engineer, Group of metabolic engineering of bacteria, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: nastena2205@mail.ru

Gulevich, Andrey Yu. – Ph.D. in Chemistry, Senior Researcher, Head of the Group of metabolic engineering of bacteria, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2026
После доработки 02.06.2026
Принята к публикации 11.07.2026

Received April 26, 2026
Revised June 02, 2026
Accepted July 11, 2026