

УДК 577.121

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ β -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli*

© 2024 г. А. Ю. Гулевич¹,*, А. Ю. Скороходова¹, В. Г. Дебабов¹¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

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

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Оптимизирован биосинтез масляной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* по обращенному β -окислению жирных кислот. Повышенный выход целевого соединения достигнут при экспрессии генов *atoB*, *fadB* и *fadE/fabI* в базовом штамме MG4 P_L-*tesB* *DuciA* (MG1655 *DackA-pta*, *DroxB*, *Δ ldhA*, *Δ adhE*, P_L-SD_{q10}-*tesB*, *DuciA*) в составе плазмид. Продемонстрировано положительное влияние форсированного гидролиза АТФ на микроаэробную конверсию рекомбинантами углеводного субстрата в конечный продукт. Активация в клетках футильного цикла пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота, за счет усиления экспрессии гена *ppsA*, обеспечивала выраженный рост потребления рекомбинантами глюкозы и приводила к росту молярного выхода масляной кислоты до 39.5%. При разобнении компонентов H⁺-АТФ синтазного комплекса, вследствие делеции генов *atpFH*, молярный выход масляной кислоты из глюкозы, продемонстрированный штаммом, формирующим бутирил-КоА под действием еноил-АЦП редуктазы *FabI*, достигал 46%.

Ключевые слова: АТФ, масляная кислота, β -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, бутирил-КоА, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109924040021 EDN: SBJIMZ

Масляная кислота это четырехуглеродная монокарбоновая кислота, имеющая широкое применение в различных отраслях промышленности, в том числе лакокрасочной, химической, фармацевтической и пищевой [1]. Эфиры масляной кислоты, в первую очередь этиловый и бутиловый, помимо традиционного использования в косметических композициях, могут служить компонентами биотоплив [2], а продукт восстановления масляной кислоты – бутанол – в качестве прямой замены бензина [3]. В настоящее время масляную кислоту получают нефтехимическим синтезом при окислении производного от пропилена масляного альдегида [4]. Однако масляная кислота также может быть получена из возобновляемого растительного сырья посредством микробиологического синтеза. Природными продуцентами масляной кислоты являются строгие анаэробы, принадлежащие к родам *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* *Megasphera* и *Sarcina* [5]. Наибольшей продуктивностью среди них отличаются штаммы *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. tyobutyricum* [4]. Тем не менее, биосинтетические

характеристики как природных продуцентов, так и их оптимизированных производных не позволяют в настоящее время реализовать экономически оправданное биотехнологическое производство масляной кислоты [6]. Это обусловило интерес к созданию неприродных продуцентов масляной кислоты с использованием традиционных для промышленной биотехнологии и удобных для направленной инженерии микроорганизмов, в первую очередь *Escherichia coli* [7]. В норме, *E. coli* не обладает способностью к синтезу масляной кислоты при утилизации стандартных источников углерода. В данной связи, для обеспечения биосинтеза целевого соединения в клетках этой бактерии экспрессировали те или иные наборы чужеродных генов, включающие гены 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназы (КФ 1.1.1.157), *hbd*, 3-гидроксибутирил-КоА дегидратазы (КФ 4.2.1.55), *crt*, клостридий, транс-еноил-КоА редуктазы (КФ 1.3.1.44) *Treponema denticola*, ацетил-КоА ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.9), *phaA*, и ацетоацетил-КоА редуктазы (КФ 1.1.1.36), *phaB*, *Cupriavidus necator* [8–10]. Однако, было показано, что в результате изменения

регуляции экспрессии отдельных генов *ato*-оперона и *fad*-регулона, *E. coli* способна продуцировать масляную кислоту в результате функционального обращения природного пути β -окисления жирных кислот (БОЖК) [11]. Тем не менее, уровни синтеза масляной кислоты соответствующими мутантами и направленно сконструированными штаммами были крайне невысоки [11, 12].

Цель работы – оптимизация биосинтеза масляной кислоты из глюкозы по обращенному пути β -окисления жирных кислот рекомбинатными штаммами *Escherichia coli*.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазы, ДНК полимеразу Taq, T4 ДНК лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), высокоточную ДНК полимеразу Q5 (“New England Biolabs”, США) и набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (“Agilent Technologies”, США). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). 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), ранее сконструированный штамм *E. coli* MG $\Delta 4$ P_L-*tesB* *DyciA* [13], лишенный путей смешанно-кислотного брожения и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, с усиленной экспрессией гена тиоэстеразы П, а также штамм VOX3.3 $\Delta 4$ P_{trc-id-4}-*fabI* [12], с дополнительно измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β -окисления жирных кислот и еноил-АПБ-редуктазу, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Для культивирования бактерий применяли богатую среду LB и минимальную среду M9 [14], с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов и плазмид. Целевые штаммы, производные штаммов MG $\Delta 4$ P_L-*tesB* *DyciA* и VOX3.3 $\Delta 4$ P_{trc-id-4}-*fabI*, с инактивированными генами *atpFH* и природной регуляторной областью гена *ppsA* замененной искусственным генетическим элементом P_L-SD_{φ10}, были получены с помощью P1-зависимых трансдукций [14] с использованием ранее полученных препаратов трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [15, 16].

Таблица 1. 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 $\Delta 4$ P _L - <i>tesB</i> <i>DyciA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , <i>DyciA</i>	[13]
VOX3.3 $\Delta 4$ P _{trc-id-4} - <i>fabI</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , <i>DyciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i>	[12]
MG $\Delta 4$ P _L - <i>tesB</i> <i>DyciA</i> P _L - <i>ppsA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , <i>DyciA</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>ppsA</i>	Данная работа
MG $\Delta 4$ P _L - <i>tesB</i> <i>DyciA</i> Δ <i>atpFH</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , <i>DyciA</i> , Δ <i>atpFH</i>	Данная работа
VOX3.3 $\Delta 4$ P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> P _L - <i>ppsA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , <i>DyciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>ppsA</i>	Данная работа
VOX3.3 $\Delta 4$ P _{trc-id-4} - <i>fabI</i> Δ <i>atpFH</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , <i>DyciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , Δ <i>atpFH</i>	Данная работа
Плаزمида: pMW118m- <i>atoB-fadB</i>	pMW118, P _{trc-ideal-2} -SD _{lacZ} - <i>atoB-fadB</i> -T _{rrmB}	[13]
pVOX1	pMW118, P _{trc-ideal-2} -SD _{lacZ} - <i>atoB-fadB-fadE</i> -T _{rrmB}	Данная работа
pVOX2	pMW118, P _{trc-ideal-2} -SD _{lacZ} - <i>atoB-fadB-fabI</i> -T _{rrmB}	Данная работа

Плазмиды рMW118m-*atoB-fadB-fadE* и рMW118m-*atoB-fadB-fabI*, содержащие под контролем промотора $P_{irc-ideal-2}$ гены ферментов, способных катализировать полный каскад реакций обращенного БОЖК, и обозначенные как рВОХ1 и рВОХ2, были сконструированы на основе плазмиды рMW118m-*atoB-fadB* по ранее описанной схеме [13]. Гены *fadE* и *fabI*, кодирующие ацил-КоА дегидрогеназу и еноил-АСР редуктазу, способные катализировать финальные реакции целевого биохимического пути, первоначально были клонированы в составе вектора рUC18. С этой целью кодирующие области соответствующих генов были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием пар специфических праймеров и хромосомной ДНК штамма *E. coli* MG1655 в качестве матрицы. Дизайн праймеров предполагал, что в результате подобной амплификации кодирующие области генов будут дополнительно содержать на флангах сайты узнавания *Bgl*II и *Bam*HI, расположенные, соответственно, непосредственно после старт- и непосредственно перед стоп- кодоном, а также сайты узнавания *Sal*I, расположенные на 5'-концах и сайты узнавания *Xho*I и *Kpn*I, расположенные на 3'-концах ампликонов. Полученные фрагменты ДНК были, впоследствии, клонированы в составе вектора рUC18 по сайтам *Sal*I и *Kpn*I и секвенированы. Природные сайты узнавания *Bam*HI и *Aat*II, расположенные в кодирующей области гена *fadE* были далее элиминированы в результате трехстадийного сайт-направленного мутагенеза с использованием QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit ("Agilent Technologies", США). С использованием соответствующих рUC-производных плазмид, содержащих корректные последовательности генов *fadE* и *fabI*, и рестрикционных сайтов *Aat*II, *Sal*I и *Xho*I были получены целевые плазмиды рВОХ1 и рВОХ2, производные рMW118m-*atoB-fadB*, в которых исходная бицистронная конструкция *atoB-fadB* была трансляционно сопряжена с генами *fadE* или *fabI* соответственно. Трансформацию рекомбинантных штаммов плазмидами рВОХ1 и рВОХ2 осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде М9, 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 М9, содержащей 15 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 12 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-зависимых промоторов $P_{irc-ideal-4}$ и $P_{irc-ideal-2}$, индуцировали спустя 3 ч от начала инкубации, добавляя в среды

культивирования изопропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ.

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 с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали 2.5 мМ водный раствор серной кислоты 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.

Количественный анализ содержания масляной кислоты в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Использовали газовый хроматограф GC-2010 Plus ("Shimadzu", Япония), укомплектованный капиллярной колонкой Stabilwax-DA ("Restek", США) длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. Газом-носителем служил гелий при постоянной объемной скорости 1.2 мл/мин. Пробы, объемом 0.5 мкл, вводили в испаритель в режиме деления потока 1 : 20. Температура испарителя и пламенно-ионизационного детектора составляла 150°C и 250°C соответственно. Термостат колонки был запрограммирован следующим образом: начальная изотерма – 2 мин при 90°C с последующим линейным градиентом до 200°C со скоростью 10°C/мин и конечной изотермой – 2 мин при 200°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные реакции обращенного БОЖК включают в себя иницирующую конденсацию двух молекул ацетил-КоА, с формированием ацетоацетил-КоА, последующее восстановление кето-интермедиата в 3-гидроксibuтирил-КоА, его дегидрирование до кротонил-КоА и последующее восстановление ненасыщенной связи, ведущее к бутирил-КоА. Таким образом, при гидролизе тиоэфирной связи бутирил-КоА под действием тиоэстеразы, конечным продуктом однократного обращения БОЖК будет являться масляная кислота. В норме, в клетках *E. coli* реакции БОЖК катализируются ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазой (КФ 2.3.1.9/16), бифункциональной (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой/

еноил-КоА-редуктазой (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17) и ацил-КоА дегидрогеназой (КФ 1.3.8.-) [17]. Однако, было показано, что в определенных условиях еноил-АЦП редуктаза *FabI* (КФ 1.3.1.9), принимающая участия в биосинтезе липидов, может также проявлять ацил-КоА дегидрогеназную активность, обеспечивая эффективное функциональное обращение БОЖК [18]. Так, ранее сконструированные штаммы $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$ и $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$ с измененной регуляцией экспрессии гена тиоэстеразы II и генов, кодирующих ферменты способные к катализу реакций обращенного БОЖК, синтезировали масляную кислоту из глюкозы при формировании бутирил-КоА под действием как ацил-КоА дегидрогеназы *FadE*, так и еноил-АЦП редуктазы *FabI* [12]. Вместе с тем, количества целевого продукта, анаэробно синтезированные рекомбинантами, были невысоки и составляли лишь ~511 мкМ и ~471 мкМ соответственно. В первую очередь это было связано, по-видимому, с низкой активностью ацил-КоА дегидрогеназ при хромосомной экспрессии в клетках единичных копий соответствующих генов. При этом, поскольку штаммы $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$ и $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$ были лишены путей смешанно-кислотного брожения, невозможность эффективного реокисления гликолитически сформированного НАДН в реакциях обращенного БОЖК ограничивала, в свою очередь, потребление рекомбинантами глюкозы в отсутствие аэрации. В настоящем исследовании, для обеспечения возможности эффективного протекания в клетках реакций обращенного БОЖК, гены ключевых ферментов пути и еноил-АЦП редуктазы были экспрессированы в базовых штаммах в составе плазмид. В качестве базового использовался штамм $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$, также как и штаммы $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$ и $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$ лишенный путей смешанно-кислотного брожения, активности неспецифичной тиоэстеразы *YciA* и экспрессирующий ген тиоэстеразы II под контролем сильного конститутивного промотора.

При экспрессии в штамме $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ целевых генов в составе плазмид, соответствующие рекомбинанты, $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX1) и $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX2), синтезировали при микроаэробной утилизации глюкозы ~4.0 мМ и ~12.9 мМ масляной кислоты соответственно, с молярными выходами, составляющими 9.3% и 30.7% (табл. 2). Таким образом, продукция целевого вещества штаммом, формирующим бутирил-КоА под действием еноил-АЦП редуктазы *FabI*, в три раза превосходила соответствующие показатели, демонстрируемые штаммом, образующим данный тиоэфир под действием ацил-КоА дегидрогеназы *FadE*. Это, по-видимому, могло являться следствием разной кофакторной специфичности указанных ферментов. В то время как еноил-АЦП редуктаза *FabI* является НАДН-зависимой, ацил-КоА дегидрогеназа *FadE* использует в качестве кофактора

FADH_2 и др. Соответственно, при утилизации глюкозы еноил-АЦП редуктаза может использовать в качестве восстановленных эквивалентов гликолитически сформированный НАДН непосредственно, тогда как формирование FADH_2 требует вспомогательного действия флаavin редуктазы (КФ 1.5.1.37). Таким образом, как в анаэробных, так и в микроаэробных условиях внутриклеточная активность ацил-КоА дегидрогеназы могла зависеть не только от количества соответствующих белковых молекул и доступности восстановленных эквивалентов, но и лимитироваться неоптимальным действием флаavin редуктазы. Тем не менее, уровни синтеза масляной кислоты штаммами $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX1) и $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX2) значительно превосходили таковые, продемонстрированные ранее их аналогами, штаммами $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fadE$ и $\text{VOX3.3 } \Delta 4 P_{\text{irc-id-4}}\text{-}fabI$, экспрессирующими гены *atoB*, *fadB* и *fadE/fabI* в составе хромосомы. Это подтверждало предположение о необходимости обеспечения высоких уровней экспрессии целевых генов для эффективного функционирования обращенного БОЖК в клетках рекомбинантных штаммов. Интересно отметить, что штамм $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pMW118m-*atoB-fadB*), экспрессирующий в составе плазмиды лишь гены ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазы и 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-редуктазы, синтезировал в результате частичного однократного обращения БОЖК 3-гидроксимасляную кислоту из глюкозы с молярным выходом 38% [13]. 3-гидроксибутирил-КоА, из которого формировалась 3-гидроксимасляная кислота является не только субстратом для тиоэстеразы, но и интермедиатом БОЖК – предшественником бутирил-КоА. Таким образом, дополнительная экспрессия в составе плазмиды гена еноил-АЦП редуктазы *FabI*, приводящая к синтезу штаммом $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX2) масляной кислоты с выходом ~31%, обеспечивала в рекомбинанте эффективную конкуренцию между гидролизом 3-гидроксибутирил-КоА и его восстановлением в последующих реакциях БОЖК, способствуя практически количественному туннелированию соответствующего интермедиата пути в сторону формирования бутирил-КоА. Соответственно, если в штамме $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX1) продукция масляной кислоты лимитировалась, по-видимому, недостаточной активностью ацил-КоА дегидрогеназы или флаavin редуктазы, то в случае штамма $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX2) данная лимитация была обусловлена другими причинами.

При микроаэробной утилизации глюкозы, штаммы $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX1) и $\text{MG}\Delta 4 P_{\text{L}}\text{-}tesB \Delta yciA$ (pVOX2) потребляли не весь доступный субстрат, секретировав в качестве основного продукта пировиноградную кислоту с выходами, составляющими практически 50% (табл. 2). Можно было предположить, что секреция пировиноградной кислоты, как и основное потребление глюкозы штаммами,

Таблица 2. Концентрации потребленного субстрата и метаболитов, секретированных исследованными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота		Уксусная кислота		Янтарная кислота		Масляная кислота	
		мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %
MG44 P _L - <i>tesB ΔyciA</i> (pBOX1)	42.5 ± 2.3	21.1 ± 1.0	49.7	12.1 ± 0.8	28.4	2.8 ± 0.2	6.6	4.0 ± 0.3	9.3
MG44 P _L - <i>tesB ΔyciA</i> (pBOX2)	42.2 ± 2.0	20.6 ± 1.2	48.8	4.6 ± 0.6	11.0	0.5 ± 0.1	1.2	12.9 ± 1.0	30.7
MG44 P _L - <i>tesB ΔyciA P_L-pps</i> (pBOX1)	55.8 ± 2.9	27.0 ± 1.6	48.4	16.1 ± 1.2	28.8	2.5 ± 0.1	4.5	6.0 ± 0.4	10.8
MG44 P _L - <i>tesB ΔyciA P_L-pps</i> (pBOX2)	56.4 ± 3.2	23.8 ± 1.4	42.2	0.2 ± 0.1	0.3	–	–	22.2 ± 1.6	39.5
MG44 P _L - <i>tesB ΔyciA ΔatpFH</i> (pBOX1)	63.2 ± 3.5	31.6 ± 1.8	50.0	18.0 ± 1.1	28.5	2.4 ± 0.1	3.8	7.1 ± 0.5	11.2
MG44 P _L - <i>tesB ΔyciA ΔatpFH</i> (pBOX2)	64.1 ± 3.3	19.5 ± 1.1	30.5	–	–	–	–	29.6 ± 1.9	46.2
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4-fabI}	42.0 ± 2.2	20.4 ± 1.2	48.6	12.6 ± 1.0	30.0	5.0 ± 0.3	11.9	0.5 ± 0.1	1.1
BOX3.3 Δ4 P _{trc-id-4-fabI} ΔatpFH	62.8 ± 3.0	29.9 ± 1.6	47.6	18.5 ± 1.4	29.5	7.4 ± 0.4	11.8	1.2 ± 0.1	1.8

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

имели место на начальных этапах культивирования при достаточно высоком уровне кислорода в среде, тогда как синтез масляной кислоты по обращенному БОЖК активировался при снижении аэрации и интенсивности реокисления НАДН посредством дыхания. Реакции обращенного БОЖК, приводящие к формированию 3-гидроксibuтирил-КоА и бутирил-КоА, являются НАДН-потребляющими. При этом, гликолиз подавляется избыточными внутриклеточными уровнями как НАДН, так и АТФ [19, 20]. Снижение уровня аэрации повышает доступность НАДН эквивалентов для реакций обращенного БОЖК, но уменьшает потребность культуры в АТФ. Поэтому, при выраженной кислородной лимитации, способствующей синтезу масляной кислоты с точки зрения окислительно-восстановительного баланса, избыточные уровни АТФ могли приводить к замедлению гликолиза и падению потребления штаммами глюкозы, снижая интенсивность формирования как необходимых для синтеза целевого вещества метаболитов-предшественников, так и восстановленных эквивалентов.

Основные подходы, направленные на снижение внутриклеточного уровня АТФ и интенсификацию гликолитического потока углерода в рекомбинантных штаммах *E. coli*, включают манипуляцию компонентами (F₁F₀) Н⁺-АТФ синтазного комплекса и активацию футильных циклов [21]. Так, в частности, разобщение мембранно-связанной F₀ и цитоплазматической F₁ субъединиц (F₁F₀) Н⁺-АТФ синтазного комплекса приводит не только к активации цитоплазматической АТФазы, но и к прекращению

генерации АТФ за счет окислительного фосфорилирования. В качестве примера футильного цикла, снижающего общеклеточный уровень АТФ за счет разницы в формировании и потреблении этого кофактора в разнонаправленных реакциях, может быть рассмотрен цикл пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота. При утилизации клетками гликолитических субстратов, пируваткиназа (КФ 2.7.1.40), катализирующая прямую реакцию цикла, ответственна за АДФ-зависимое дефосфорилирование фосфоенолпирувата в пировиноградную кислоту с образованием молекулы АТФ, а фосфоенолпируватсинтаза (КФ 2.7.9.2), фосфорилирующая пировиноградную кислоту в фосфоенолпируват, использует АТФ как кофактор, расщепляя его до АМФ. Регенерация АМФ в АТФ, с участием аденилаткиназы (КФ 2.7.4.3), расходует, при этом, два АТФ, обуславливая общую потерю одного АТФ в результате действия соответствующего футильного цикла. Данные подходы ранее успешно применялись для улучшения потребления субстрата и продукции целевых веществ рекомбинантными штаммами *E. coli* как в условиях аэрации, так и при анаэробии [22, 23]. В настоящем исследовании каждый из них был использован для улучшения продукции штаммами MG44 P_L-*tesB ΔyciA* (pBOX1) и MG44 P_L-*tesB ΔyciA* (pBOX2) масляной кислоты из глюкозы в микроаэробных условиях.

Активность футильного цикла пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота была обеспечена в штаммах при усилении экспрессии гена фосфоенолпируватсинтазы, *ppsA*.

Потребление глюкозы соответствующими производными, MGD4 P_L-*tesB DyciA P_L-ppsA* (pVOX1) и MGD4 P_L-*tesB DyciA P_L-ppsA* (pVOX2), возросло, по сравнению с родительскими штаммами, в 1.3 раза (табл. 2). При этом, в случае штамма MGD4 P_L-*tesB DyciA P_L-ppsA* (pVOX1), формирующего бутирил-КоА под действием ацил-КоА дегидрогеназы FadE, выход масляной кислоты повышался лишь незначительно, с 9.3% до 10.8%, тогда как штамм MGD4 P_L-*tesB DyciA P_L-ppsA* (pVOX2) синтезировал целевой продукт с выходом, выросшим практически на треть – до 39.5%. Соответственно повышение выхода масляной кислоты, пропорциональное увеличению потребления штаммом MGD4 P_L-*tesB DyciA P_L-ppsA* (pVOX2) глюкозы, указывало на то, что продукция целевого вещества штаммом возросла, в первую очередь, в результате большей доступности для обращенного БОЖК восстановленных эквивалентов и метаболитов предшественников. Действительно, титр синтезированной штаммом масляной кислоты возрастал за счет прекращения секреции янтарной кислоты, выраженного снижения формирования уксусной кислоты и некоторого падения накопления пировиноградной кислоты (табл. 2). Это свидетельствовало об интенсификации потока углерода от пировиноградной кислоты к ацетил-КоА, через реакцию катализируемую НАДН-генерирующей пируватдегидрогеназой, с последующим туннелированием соответствующего КоА-производного в реакции обращенного БОЖК, эффективно потребляющие этот тиоэфир за счет возросшей доступности гликолитического НАДН. Ограниченный рост синтеза масляной кислоты штаммом MGD4 P_L-*tesB DyciA P_L-ppsA* (pVOX1) свидетельствовал, таким образом, о правомочности предположения относительно неоптимальной активности в штамме ацил-КоА дегидрогеназы и/или флавин редуктазы.

При разобщении компонентов Н⁺-АТФ синтезного комплекса, за счет делеции генов *atpFH*, потребление глюкозы штаммами MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX1) и MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2) возрастало в 1.5 раза по отношению к исходным рекомбинантам с интактным комплексом (табл. 2). Продукция масляной кислоты штаммом MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX1) продолжала оставаться ограниченной, и выход целевого продукта возрастал лишь до 11.2%. Штамм MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2) секретировал практически 30 мМ масляной кислоты с выходом из глюкозы, возросшим до ~46%. При этом, соответствующее вещество становилось основным продуктом утилизации углеродного субстрата, в то время как единственным детектированным побочным продуктом оставалась пировиноградная кислота, выход которой из глюкозы падал до 30%. Соответственно, выраженное снижение внутриклеточного уровня АТФ вследствие прекращения его формирования при окислительном фосфорилировании

и принудительном гидролизе цитоплазматической АТФазой, в большей степени способствовало интенсификации потока углерода через гликолиз и реакции обращенного БОЖК, нежели опосредованное интерконверсией пировиноградная кислота – фосфоенолпируват. Вместе с тем, остаточная секреция штаммом пировиноградной кислоты, предполагающая возможность дальнейшего увеличения степени конверсии субстрата в целевой продукт, указывала на то, что при исключении АТФ-опосредованного торможения гликолиза, часть гликолитически сформированных НАДН-эквивалентов реокислялась посредством дыхания, оставаясь недоступными для реакций обращенного БОЖК. Это свидетельствовало о том, что для оптимизации микроаэробного биосинтеза масляной кислоты из глюкозы сконструированными штаммами необходимо соблюдение определенного баланса между окислительно-восстановительным и энергетическим статусами клетки. Очевидно, что оба параметра, зависящие от степени аэрации, могут быть подвержены тонкой регуляции при культивировании рекомбинантов в контролируемых условиях в биореакторах. Это предполагает проведение дальнейших экспериментов по масштабированию процесса микробиологического синтеза целевого вещества с использованием штаммов, сконструированных в данном исследовании.

Следует отметить, что позитивный эффект форсированного гидролиза АТФ на микроаэробный биосинтез масляной кислоты из глюкозы, в ходе вышеописанных экспериментов, был наиболее четко продемонстрирован в штамме MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2). Однако повышенная экспрессия даже нативных генов в составе плазмид, в общем случае, приводит к повышенной нагрузке на клетки рекомбинантного штамма-производителя. Поэтому, соответствующий эффект оценивали также в штамме VOX3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fabI*, экспрессирующим гены ферментов ответственных за катализ реакции обращенного БОЖК в составе хромосомы.

При инактивации генов *atpFH*, потребление глюкозы штаммом VOX3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fabI ΔatpFH* возрастало аналогично таковому, продемонстрированному штаммами MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX1) и MGD4 P_L-*tesB DyciA ΔatpFH* (pVOX2). Вместе с тем, степень конверсии рекомбинантом глюкозы в секретированные метаболиты практически не отличалась от показателей контрольного штамма VOX3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fabI*, а синтез масляной кислоты сохранялся на крайне низком уровне (табл. 2). В совокупности это указывало на необходимость совместного обеспечения благоприятного метаболического статуса клетки и повышенного уровня экспрессии ключевых генов для достижения возросших уровней синтеза масляной кислоты из глюкозы направленно сконструированными штаммами *E. coli*.

В итоге, в результате проведенного исследования, сконструированы штаммы *E. coli* способные к эффективному биосинтезу масляной кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК. Повышенные уровни конверсии субстрата в целевой продукт достигнуты при экспрессии в базовых штаммах генов ферментов, ответственных за катализ реакций обращенного БОЖК, в составе плазмид. Показано позитивное влияние на биосинтез штаммами целевого соединения форсированного гидролиза АТФ. Стратегия дальнейшего улучшения параметров микробиологического синтеза масляной кислоты с использованием сконструированных бутират-продуцирующих штаммов предполагает необходимость оптимизации процесса в контролируемых условиях аэрации.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dwidar M., Park J.Y., Mitchell R.J., Sang B.I.* // *Sci. World. J.* 2012. V. 2012. 471417. <https://doi.org/10.1100/2012/471417>
2. *Sjoblom M., Risberg P., Filippova A., Ohrman O.G.W., Rova U., Christakopoulos P.* // *CemCatChem.* 2017. V. 9. P. 4529–4537.
3. *Dürre P.* // *Biotechnol. J.* 2007. V. 2. № 12. P. 1525–1534.
4. *Jha A.K., Li J., Yuan Y., Baral N., Ai B.* // *Int. J. Agric. Biol.* 2014. V. 16. P. 1019–1024.
5. *Zigová J., Šturdík E.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 24. P. 153–160.
6. *Luo H., Yang R., Zhao Y., Wang Z., Liu Z., Huang M., Zeng Q.* // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 253. P. 343–354.
7. *Volker A.R., Gogerty D.S., Bartholomay C., Hennen-Bierwagen T., Zhu H., Bobik T.A.* // *Microbiology.* 2014. V. 160. P. 1513–1522.
8. *Saini M., Wang Z.W., Chiang C.J., Chao Y.P.* // *J. Agric. Food. Chem.* 2014. V. 62. № 19. P. 4342–4348.
9. *Kataoka N., Vangnai A.S., Pongtharangkul T., Yakushi T., Matsushita K.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2017. V. 123. № 5. P. 562–568.
10. *Wang L., Chauliac D., Moritz B.E., Zhang G., Ingram L.O., Shanmugam K.T.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2019. V. 12. № 62. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1408-9>
11. *Серегина Т.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г., Миронов А.С.* // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 24–35.
12. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2022. Т. 58. № 4. С. 330–337.
13. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
14. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.*
15. *Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 4. С. 342–352.
16. *Skorokhodova A.Y., Stasenko A.A., Krasilnikova N.V., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // *Fermentation.* 2022. V. 8. № 12. 738. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120738>
17. *Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K.* // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 66. № 4. P. 829–839.
18. *Vick J.E., Clomburg J.M., Blankschien M.D., Chou A., Kim S., Gonzalez R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 54. P. 1406–1416.
19. *Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 14. P. 3909–3916.
20. *Vemuri G.N., Altman E., Sangurdekar D.P., Khodursky A.B., Eiteman M.A.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 5. P. 3653–3661.
21. *Hädicke O., Klamt S.* // *Biochem. Soc. Trans.* 2015. V. 43. № 6. P. 1140–1145.
22. *Causey T.B., Shanmugam K.T., Yomano L.P., Ingram L.O.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. № 8. P. 2235–2240.
23. *Hädicke O., Bettenbrock K., Klamt S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2015. V. 112. № 10. P. 2195–2199.

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

A. Yu. Gulevich^{a,*}, A. Yu. Skorokhodova^a, 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

The biosynthesis of butyric acid from glucose through the inverted fatty acid β -oxidation by recombinant *Escherichia coli* strains was optimized. The increased yield of the target compound was achieved resulting from the plasmid expression of *atoB*, *fadB* and *fadE/fabI* genes in the core strain MG Δ 4 P_L-*tesB* Δ *yciA* (MG1655 Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA*). The positive effect of enforced ATP hydrolysis on microaerobic conversion of carbohydrate substrate to the final product by the recombinants was demonstrated. Activation of the futile cycle of pyruvate-phosphoenolpyruvate-pyruvate, due to the increased expression of the *ppsA* gene, ensured a marked increase in glucose consumption by the recombinants and led to an increase in the molar yield of butyric acid up to 39.5%. When the components of the H⁺-ATP synthase complex were uncoupled resulting from the deletion of *atpFH* genes, the molar yield of butyric acid from glucose demonstrated by the strain forming butyryl-CoA by the action of enoyl-ACP reductase FabI reached 46%.

Keywords: ATP, butyric acid, butyryl-CoA, *Escherichia coli*, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering