

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.121

А.Ю. СКОРОХОДОВА*, А.Ю. ГУЛЕВИЧ, В.Г. ДЕБАБОВ

ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Анаэробный биосинтез интермедиатов восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот штаммами *Escherichia coli* с инактивированными генами *frdAB* и *sdhAB*

Гены *frdAB* и *sdhAB*, кодирующие компоненты фумаратредуктазы и сукцинатдегидрогеназы, были делетированы в рекомбинантном штамме *E. coli* с инактивированными путями смешаннокислотного брожения и модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы при гетерологичной экспрессии гена пируваткарбоксилазы. В условиях анаэробно-анаэробного брожения родительский штамм эффективно конвертировал глюкозу в янтарную кислоту, не синтезируя заметных количеств фумаровой и яблочной кислот. При индивидуальной делеции генов *frdAB* мутантный штамм сбрасывал глюкозу с образованием янтарной кислоты со сниженной эффективностью, секретировав при этом заметные количества яблочной и фумаровой кислот. Индивидуальная делеция генов *sdhAB* в родительском штамме не оказывала значительного влияния на эффективность формирования основного продукта брожения. Совместная инактивация фумаратредуктазы и сукцинатдегидрогеназы в клетках сконструированного штамма повышала анаэробную конверсию глюкозы в фумаровую и яблочную кислоты при активации гликолатного шунта и снижении вклада в формирование целевых продуктов восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, фумаратредуктаза, фумаровая кислота, яблочная кислота, янтарная кислота, *Escherichia coli*.

Фумаровая, яблочная и янтарная кислоты относятся к соединениям, способным служить в качестве “строительных блоков” в промышленном синтезе широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая растворители и полимеры для использования в лакокрасочной, текстильной, автомобильной и фармакологической отраслях промышленности [1]. В настоящее время получение данных веществ основывается на низкоэкологичном энерго- и ресурсозатратном нефтехимическом синтезе. Однако, являясь кон-

сервативными интермедиатами центрального метаболизма множества организмов, указанные трикарбоновые кислоты потенциально могут быть получены в результате микробного синтеза из возобновляемого сырья. Известные природные продуценты в силу своих характеристик не могут на сегодняшний день обеспечить основу экономически оправданных промышленных процессов биотехнологического получения фумаровой, яблочной и янтарной кислот [2]. Вместе с тем, в последние годы значительный прогресс был достигнут в создании

Скорородова Александра Юрьевна, Гулевич Андрей Юрьевич, Дебабов Владимир Георгиевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; КЖ — культуральная жидкость; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот; AceA — изоцитратлиаза; AceB — малатсинтаза; AcpA, AcpB — аконитазы; FumA, FumB, FumC — изоферменты фумаразы; FrdABCD — фумаратредуктазный ферментативный комплекс; GltA — цитратсинтаза; Mdh — малагидрогеназа; NADH — никотинамиддениндинуклеотид восстановленный.

* Автор для переписки.

соответствующих рекомбинантных продуцентов на основе таких традиционных для промышленной биотехнологии микроорганизмов, как *Escherichia coli* [3—6] и *Saccharomyces cerevisiae* [7, 8]. Тем не менее, с использованием направленно сконструированных штаммов в настоящий момент реализовано только крупнотоннажное биотехнологическое производство янтарной кислоты [9]. Таким образом, разработка подходов к созданию высокоэффективных микробных продуцентов фумаровой и яблочной кислот остается актуальной задачей.

В клетках *E. coli* и *S. cerevisiae* яблочная и янтарная кислоты могут образовываться в реакциях как цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), так и глиоксилатного шунта, тогда как фумаровая кислота является исключительно интермедиатом ЦТК. Будучи факультативными анаэробами, *E. coli* и *S. cerevisiae* потенциально способны эффективно осуществлять анаэробные процессы биосинтеза целевых дикарбоновых кислот — интермедиатов восстановительной ветви ЦТК. Преимуществом анаэробных процессов в данном случае является возможность достижения высоких показателей конверсии субстрата в продукт. Высокие теоретические значения коэффициента конверсии в соответствующих анаэробных процессах обусловлены фиксацией CO₂ в ходе биосинтеза целевых соединений. Растущая эмиссия технологических парниковых газов дополнительно стимулирует разработку технологий, основанных на поглощении углекислого газа в процессах анаэробного биосинтеза.

Ранее нами был направленно сконструирован штамм *E. coli* MSG1.0 (MG1655 *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA*, *adhE*, *ptsG*, P_L-*glk*, P_{tac}-*galP*) с целью его использования в качестве базового для создания высокоэффективных продуцентов интермедиатов метаболического узла фосфоенолпируват/оксалоацетат/ацетил-КоА и их производных [10].

Целью данной работы являлось исследование анаэробного биосинтеза фумаровой, яблочной и янтарной кислот производными штамма *E. coli* MSG1.0 с инактивированными генами *frdAB* и *sdhAB*, кодирующими компоненты фумаратредуктазного (КФ 1.3.5.4) и сукцинатдегидрогеназного (КФ 1.3.5.1) ферментативных комплексов, для создания в дальнейшем высокоэффективных микробных продуцентов фумаровой и яблочной кислот.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Используемые в работе штаммы и плазмиды представлены в таблице. Штамм *E. coli* SGM1.0Δ_{ptsG} P_L*glk* P_{tac}*galP* [10], обозначенный

как MSG1.0, был исходным для конструирования использованных в работе рекомбинантных штаммов. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB и SOC [11] с добавлением при необходимости ампициллина (30 мкг/мл, ОАО «Синтез», Россия) или хлорамфеникола (100 мкг/мл, Sigma, США).

Реагенты. Использовали ДНК-полимеразу *Taq* (Fermentas, Литва). Олигонуклеотидные праймеры (см. таблицу) синтезировали в ЗАО «Синтол» (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и выделяли, применяя QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты были производства Panreac (Испания) и Sigma.

Конструирование штаммов и плазмид. Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннером [12]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *frdAB* и *sdhAB*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1 и P2, P3 и P4 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [13] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов с индивидуально инактивированными генами *frdAB* и *sdhAB* подтверждали с помощью ПЦР-анализа, используя пары локус-специфичных праймеров P5 и P6, P7 и P8.

Штаммы MSG1.0 Δ*frdAB*, MSG1.0 Δ*sdhAB* и MSG1.0 Δ*frdAB* Δ*sdhAB* были сконструированы путем введения полученных индивидуальных модификаций в хромосому штамма MSG1.0 с помощью P1-зависимых трансдукций [11]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [14]. Трансформацию штаммов плазмидой pPYC [15] осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов для биосинтеза дикарбоновых кислот. Клетки штаммов MSG1.0 Δ*sdhAB* [pPYC], MSG1.0 Δ*frdAB* [pPYC], MSG1.0 Δ*frdAB* Δ*sdhAB* [pPYC] и контрольного штамма MSG1.0 [pPYC] выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°. К 5 мл ночной культуры добавляли 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 4 мл раствора нейтрализованного до pH 7,0 кислотного гидролизата

Штаммы, плазмиды и олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Объект	Генотип, последовательность	Ссылка, коллекция
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MSG1.0	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _L glk, P _{tac} galP	[10], коллекция лаборатории
MSG1.0 $\Delta frdAB$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _L glk, P _{tac} galP, $\Delta frdAB$	Данная работа
MSG1.0 $\Delta sdhAB$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _L glk, P _{tac} galP, $\Delta sdhAB$	То же
MSG1.0 $\Delta frdAB \Delta sdhAB$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _L glk, P _{tac} galP, $\Delta sdhAB$, $\Delta frdAB$	—”—
Плазмида		
pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , $\lambda attL$ -cat- $\lambda attR$	[13], коллекция лаборатории
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - λgam -bet-exo	[12], CGSC, Йельский университет
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - λxis -int, <i>cIts857</i>	[14], коллекция лаборатории
pPUC	pMW119 с клонированным геном пируваткарбоксилазы (<i>pucA</i>) из <i>B. subtilis</i>	[15], коллекция лаборатории
Праймер		
P1	5'-cgtgcaaacctttcaagccgatcttccattgtaggcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'	Данная работа
P2	5'-ttagcgtggttcagggtcgcgataagaaagctctttgaagcctgctttttataactaagttgg-3'	То же
P3	5'-gatgaaattgccagtcagagaattgatgcagttgtcgcctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'	—”—
P4	5'-ttacgcattacgttgcaacaacatcgacttgatgtgaagcctgctttttataactaagttgg-3'	—”—
P5	5'-ggagcagtggaatagcgttc-3'	—”—
P6	5'-cgtcattggccgtacatac-3'	—”—
P7	5'-gtgttgaccgactacgttaaac-3'	—”—
P8	5'-ctgatgcgctgcgcttatcag-3'	—”—

пшеничного глютена (Cargill, Ефремово, Россия), с содержанием растворенного сухого вещества 115 г/л. Полученную культуру выращивали в колбах объемом 750 мл при 37° на роторной качалке

при 250 об/мин в течение 10 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и 4°. Осадок ресуспендировали в 15 мл среды М9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л NaHCO₃. В дальнейшем

культуру инкубировали в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых завинчивающимися крышками, при 37° на роторной качалке при 250 об/мин. Все среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина (ООО “Синтез”, Россия).

Клеточные суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 10000 *g* и в полученных супернатантах определяли концентрацию секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторяли не менее трех раз, результаты повторных экспериментов варьировали в диапазоне значений, не превышающем 10%.

Аналитические методы. Концентрацию органических кислот в культуральной жидкости (КЖ), освобожденной от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием Waters HPLC system (Waters, США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (300 × 7,8 мм, 8 мкм, Phenomenex, США) с детекцией 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 (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Waters). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил—этилацетат—вода (объемное соотношение 76:4:20) при скорости потока 1 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анаэробный биосинтез фумаровой, яблочной и янтарной кислот клетками *E. coli* при инактивации генов *frdAB* и *sdhAB* был исследован с использованием в качестве базового штамма MSG1.0 с делетированными генами *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA*, *adhE* и *ptsG*, кодирующими ацетаткиназу (КФ 2.7.2.1), фосфотрансацетилазу (КФ 2.3.1.8), пируватоксидазу (КФ 1.2.5.1), лактатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.28), альдегид/алкоголь-дегидрогеназу (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3) и пермеазу глюкозы, соответственно, а также при усиленной экспрессии генов *galP* и *glk*, кодирующих H⁺-симпортер галактозы и глюкокиназу (КФ 2.7.1.2). Штамм MSG1.0 был выбран в качестве базового в силу того, что в результате инактивации в нем основных путей смешаннокислотного брожения и модификации системы транспорта и фосфорилирования глюкозы данный штамм способен к эффективному вовлечению интермедиатов метаболического узла фосфоенолпируват/оксалоацетат/ацетил-КоА в реакции восстановительной ветви ЦТК и глиоксилатного шунта [10]. Для придания клет-

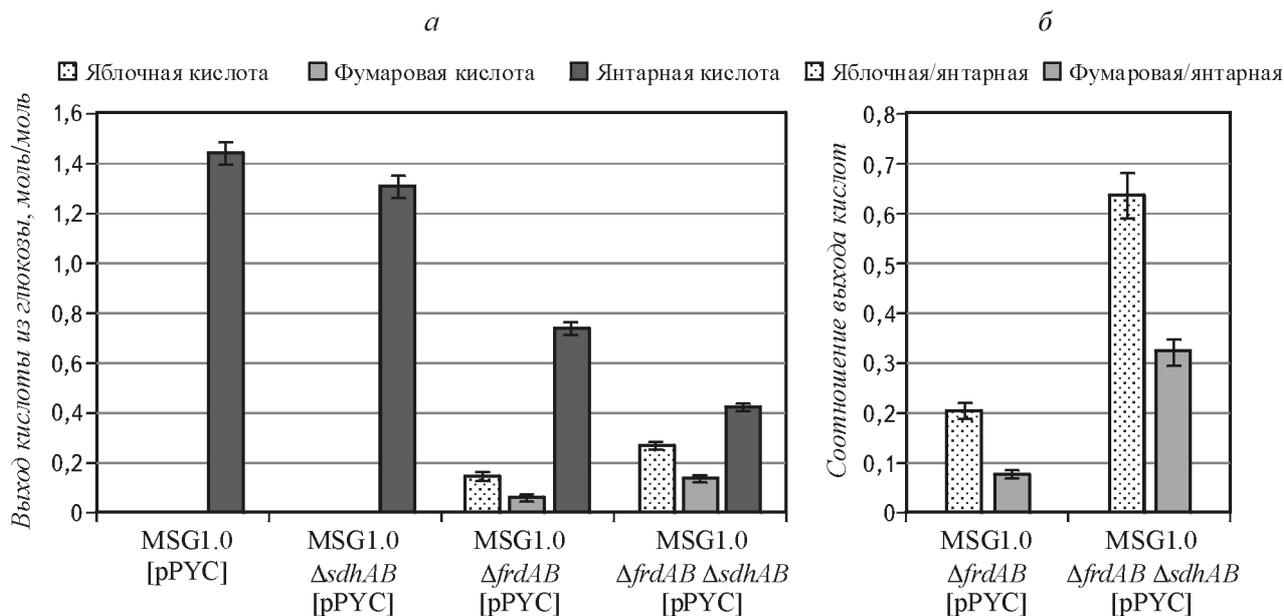
кам способности конвертировать гликолитически сформированную пирувиноградную кислоту в оксалоацетат (прямой метаболит-предшественник в анаэробном биосинтезе целевых дикарбоновых кислот) в штамм MSG1.0 и его производные вводили плазмиду pPYC [15], которая конститутивно экспрессирует ген *pycA* *Bacillus subtilis*, кодирующий пируваткарбоксылазу (КФ 6.4.1.1). Поскольку известно, что клетки *E. coli* с инактивированными генами *pta*, *ldhA* и *adhE* неспособны к анаэробному росту [16], для характеристики продукции целевых дикарбоновых кислот сконструированными штаммами использовали двухстадийную аэробно-анаэробную ферментацию. Соответствующий процесс включал стадию аэробного накопления биомассы и последующую стадию анаэробного биосинтеза.

Реакции восстановительной части ЦТК включают восстановление оксалоацетата в яблочную кислоту под действием малатдегидрогеназы Mdh (КФ 1.1.1.37), последующую конверсию яблочной кислоты в фумаровую под действием изоферментов фумаразы FumA, FumB, FumC (КФ 4.2.1.2) и финальное восстановление фумаровой кислоты в янтарную, катализируемое фумаратредуктазным ферментативным комплексом FrdABCD (КФ 1.3.5.4). В ходе реакций глиоксилатного шунта оксалоацетат и ацетил-КоА конвертируются в яблочную и янтарную кислоты в результате последовательного действия цитратсинтазы GltA (КФ 2.3.3.16), аконитаз AconA и AconB, а также изоцитратлиазы AceA (КФ 4.1.3.1) и малатсинтазы AceB (КФ 2.3.3.9).

В соответствии с этим единственной возможностью анаэробного реокисления образовавшегося в результате гликолиза NADH у штамма MSG1.0 [pPYC] является биосинтез янтарной кислоты путем совместного функционирования восстановленной ветви ЦТК и глиоксилатного шунта. Действительно, в условиях анаэробноброжения штамм MSG1.0 [pPYC] эффективно конвертировал глюкозу в янтарную кислоту с молярным выходом, составляющим около 1,45 моль/моль (рисунок, а). При этом фумаровая и яблочная кислоты отсутствовали среди продуктов брожения, формируемых штаммом MSG1.0 [pPYC].

Ранее было показано, что делеция в штамме-продуценте янтарной кислоты *E. coli* KJ060 генов, кодирующих изоферменты фумаразы, не приводила к синтезу значимых количеств яблочной кислоты, в то время как продукция данного вещества резко возрастала при инактивации фумаратредуктазы [5]. В связи с этим гены *frdAB* были делетированы в штамме MSG1.0 с целью оценки влия-

АНАЭРОБНЫЙ БИОСИНТЕЗ ИНТЕРМЕДИАТОВ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ВЕТВИ ЦИКЛА



Молярный выход (а) и молярное соотношение (б) фумаровой, яблочной и янтарной кислот, синтезированных исследованными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы

ния инактивации фумаратредуктазы на распределение фумаровой, яблочной и янтарной кислот среди продуктов анаэробного сбраживания глюкозы. В результате соответствующей модификации полученный штамм MSG1.0 Δ *frdAB* [pPYC] сбраживал глюкозу в янтарную кислоту с эффективностью, вдвое сниженной по сравнению с родительским штаммом, секретировав при этом заметные количества яблочной и фумаровой кислот (см. рисунок, а). Штамм синтезировал яблочную кислоту с молярным выходом около 0,15 моль/моль, а янтарную кислоту с выходом около 0,73 моль/моль при соотношении соответствующих продуктов 0,21:1 (см. рисунок, б). В ходе глиоксилатного шунта яблочная и янтарная кислоты формируются в эквимольном количестве. Таким образом, низкое молярное соотношение синтезированных штаммом яблочной и янтарной кислот и еще более низкое молярное соотношение фумаровой и янтарной кислот (см. рисунок, б) свидетельствовало о протекании в штамме полного каскада реакций восстановительной ветви ЦТК.

В отсутствие фумаратредуктазы восстановление фумаровой кислоты в янтарную у штамма MSG1.0 Δ *frdAB* [pPYC], по всей видимости, катализировалось сукцинатдегидрогеназой. Этот фермент, катализирующий обратимую реакцию окисления янтарной кислоты в фумаровую, является участником оксидативного ЦТК, и экспрессия генов соответствующего *sdh*-оперона в условиях анаэробнострого репрессирована. Тем не ме-

нее, было показано, что сукцинатдегидрогеназа способна функционально замещать фумаратредуктазу [17]. Более того, известно, что экспрессия генов *sdh*-оперона возрастает при аэробном культивировании штаммов *E. coli*, дефицитных по фумаратредуктазе [18]. В настоящей работе клетки штамма MSG1.0 и его производных выращивали в условиях аэрации, что обеспечивало высокую остаточную активность сукцинатдегидрогеназы в анаэробной биосинтетической фазе.

На фоне интактной фумаратредуктазы инактивация сукцинатдегидрогеназы не оказывала значительного влияния на эффективность анаэробного биосинтеза янтарной кислоты штаммом MSG1.0 [pPYC] и не приводила к биосинтезу значимых количеств фумаровой и яблочной кислот соответствующим штаммом MSG1.0 Δ *sdhAB* [pPYC] (см. рисунок, а). Таким образом, сукцинатдегидрогеназа была инактивирована в штамме MSG1.0 Δ *frdAB* [pPYC]. Полученный штамм MSG1.0 Δ *frdAB* Δ *sdhAB* [pPYC] синтезировал яблочную, фумаровую и янтарную кислоты в молярном соотношении 0,64:0,33:1 при резко сниженном потреблении глюкозы (см. рисунок, б). Эти данные указывают, что основным путем биосинтеза яблочной и янтарной кислот у штамма MSG1.0 Δ *frdAB* Δ *sdhAB* [pPYC] является глиоксилатный шунт, в то время как около 30% сформированной яблочной кислоты в дальнейшем конвертируются в фумаровую кислоту под действием фумаразы, фермента восстановительной ветви ЦТК.

Реакции глиоксилатного шунта, так же как и конверсия яблочной кислоты в фумаровую, протекают без окисления NADH. Следовательно, формирование целевых дикарбоновых кислот при анаэробной утилизации глюкозы штаммом MSG1.0 Δ frdAB Δ sdhAB [pPYC] не было сбалансировано в окислительно-восстановительном плане, вызывая торможение гликолиза избыточными восстановленными эквивалентами.

В отсутствие сукцинатдегидрогеназы и фумаратредуктазы ЦТК является разомкнутым и не может снабжать растущие клетки оксалоацетатом. Следовательно, при аэробном росте штамма MSG1.0 Δ frdAB Δ sdhAB [pPYC] в богатой комбинированной среде с глюкозой дефицит оксалоацетата, возникающий после исчерпания доступной аспарагиновой кислоты, мог вызывать в клетках компенсаторную активацию глиоксилатного шунта. Действительно, анализ спектра метаболитов, секретлируемых штаммами в ходе аэробного роста, показал значительное накопление янтарной кислоты в среде культивирования штамма MSG1.0 Δ frdAB Δ sdhAB [pPYC] (данные не приведены). Поскольку известно, что активность 2-кетоглутаратдегидрогеназы в клетках *E. coli* при аэробном росте в богатых средах с глюкозой значительно снижена [19], данный факт подтверждает предположение о высокой активности глиоксилатного шунта в клетках штамма MSG1.0 Δ frdAB Δ sdhAB [pPYC].

Таким образом, совместная инактивация фумаратредуктазы и сукцинатдегидрогеназы у штамма *E. coli*, дефицитного по основным путям смешаннокислотного брожения, приводила к выраженному повышению анаэробного биосинтеза фумаровой и яблочной кислот при избыточной активации глиоксилатного шунта и снижении вклада в формирование целевых продуктов восстановительной ветви ЦТК. При этом в результате возникающего окислительно-восстановительного дисбаланса резко снижалось анаэробное потребление глюкозы соответствующим штаммом. Вместе с тем, индивидуальная инактивация фумаратредуктазы не позволяла обеспечить эффективный биосинтез фумаровой и яблочной кислот и основным продуктом сбраживания глюкозы мутантным штаммом оставалась янтарная кислота.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что отсутствие фумаратредуктазы и сукцинатдегидрогеназы является ключевым требованием для анаэробной продукции фумаровой и яблочной кислот клетками направленно сконструированных штаммов *E. coli*. Тем не менее, работы по созданию соответствующих про-

мышленных продуцентов предполагают дальнейшую модификацию центрального метаболизма рекомбинантных штаммов, направленную на обеспечение оптимального баланса между ростовыми потребностями клетки и эффективностью функционирования целевых биосинтетических путей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках МЦП ЕАЭС “Инновационные биотехнологии” (государственный контракт № 14.М04.12.0007).

Получено 9.11.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, A., Eliot, D., Lasure, L., Jones, S. Top Value Added Chemicals from Biomass. V. 1. Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory and Department of Energy. — Washington, DC: NREL, Dept. Energy, USA, 2004. — 76 p.
2. Yin, X. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects / X. Yin, J. Li, H.D. Shin, G. Du, L. Liu, J. Chen // *Biotechnol. Adv.* — 2015. — V.33. — P. 830—841.
3. Jantama, K. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate / K. Jantama, M.J. Haupt, S.A. Svoronos, X. Zhang, J.C. Moore, K.T. Shanmugam, L.O. Ingram // *Biotechnol. Bioeng.* — 2008. — V.99. — P. 1140—1153.
4. Sánchez, A.M. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity / A.M. Sánchez, G.N. Bennett, K.Y. San // *Metab. Eng.* — 2005. — V.7. — P. 229—239.
5. Zhang, X. L-Malate production by metabolically engineered *Escherichia coli* / X. Zhang, X. Wang, K.T. Shanmugam, L.O. Ingram // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — V.77. — P. 427—434.
6. Song, C.W. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid / C.W. Song, D.I. Kim, S. Choi, J.W. Jang, S.Y. Lee // *Biotechnol. Bioeng.* — 2013. — V.110. — P. 2025—2034.
7. Van De Graaf, M.J. Valianpoer, F., Fiey, G., Delattre, L., Schulten, E.A.M. // Process for the crystallization of succinic acid // Международная патентная заявка PCT/EP2010/067868, C 07 C 51/43, C 07 C 55/10, C 12 P 7/46. 2010.
8. Zelle, R.M. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export / R.M. Zelle, E. de Hulster, W.A. van Winden, P. de Waard, C. Dijkema, A.A. Winkler, J.M. Geertman, J.P. van Dijken, J.T. Pronk, A.J. van Maris // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2008. — V.74. — P. 2766—2777.

9. Jansen, M.L. Towards large scale fermentative production of succinic acid / M.L. Jansen, W.M. van Gulik // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2014. — V.30. — P. 190—197.
10. Моржакова А.А. Рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения, способные к быстрому аэробному росту на глюкозе при сниженном эффекте Крэбтри / А.А. Моржакова, А.Ю. Скороходова, А.Ю. Гулевич, В.Г. Дебабов // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2013. — Т.49. — № 2. — С. 136—143.
11. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed. — N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. — 1659 p.
12. Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V.99. — P. 6640—6645.
13. Каташкина Ж.И. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме / Ж.И. Каташкина, А.Ю. Скороходова, Д.В. Зименков, А.Ю. Гулевич, Н.И. Минаева, В.Г. Дорошенко, И.В. Бирюкова, С.В. Машко // *Мол. биол.* — 2005. — Т.39. — № 5. — С. 823—831.
14. Гулевич А.Ю. Новый метод конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами в бактериальной хромосоме / А.Ю. Гулевич, А.Ю. Скороходова, В.Ю. Ермишев, А.А. Крылов, Н.И. Минаева, З.М. Полонская, Д.В. Зименков, И.В. Бирюкова, С.В. Машко // *Мол. биол.* — 2009. — Т.43. — № 3. — С. 547—557.
15. Скороходова А.Ю. Анаэробный синтез янтарной кислоты рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* с активированным НАД⁺-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом / А.Ю. Скороходова, А.Ю. Гулевич, А.А. Моржакова, Р.С. Шакулов, В.Г. Дебабов // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2011. — Т.47. — № 4. — С. 415—423.
16. Fischer, C.R. Assessment of heterologous butyrate and butanol pathway activity by measurement of intracellular pathway intermediates in recombinant *Escherichia coli* / C.R. Fischer, H.C. Tseng, M. Tai, K.L. Prather, G. Stephanopoulos // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V.88. — P. 265—275.
17. Maklashina, E. Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth / E. Maklashina, D.A. Berthold, G. Cecchini // *J. Bacteriol.* — 1998. — V.180. — P. 5989—5996.
18. Steinsiek, S. Characterization of *E. coli* MG1655 and *frdA* and *sdhC* mutants at various aerobiosis levels / S. Steinsiek, S. Frixel, S. Stagge, K. Bettenbrock // *J. Biotechnol.* — 2011. — V.154. — P. 35—45.
19. Park, S.J. Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter / S.J. Park, G. Chao, R.P. Gunsalus // *J. Bacteriol.* — 1997. — V.179. — P. 4138—4142.

A.Yu. SKOROKHODOVA*, A.Yu. GULEVICH,
and V.G. DEBABOV

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), 117545, Moscow, Russia

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Anaerobic Biosynthesis of Intermediates of Reducing Branch of Tricarboxylic Acids Cycle by *Escherichia coli* Strain with Inactivated *frdAB* and *sdhAB* Genes

Genes *frdAB* and *sdhAB* encoding components of fumarate reductase and succinate dehydrogenase have been deleted in a recombinant *E. coli* strain with the inactivated pathways of mixed-acid fermentation and modified system of the glucose transport and phosphorylation at the heterologous expression of the pyruvate carboxylase gene. Under anaerobic conditions, the parental strain effectively converted glucose into succinic acid without synthesizing significant amounts of fumaric or malic acid. When the *frdAB* genes were individually deleted, the mutant strain was characterized by a low-efficient glucose fermentation with the formation of succinic acid along with secreting of considerable amounts of malic and succinic acids. The individual deletion of the *sdhAB* genes in the parental strain failed to have a visible effect on the effectiveness of the formation of the major product of fermentation. The combined inactivation of fumarate reductase and succinate dehydrogenase in the constructed strain enhanced the glucose anaerobic conversion into fumaric and malic acids during the activation of the glyoxylate by-pass and decreased contribution of the reducing branch of the TCA cycle to the formation of the target products.

Key words: *Escherichia coli*, fumarate reductase, fumaric acid, malic acid, succinate dehydrogenase, succinic acid.

* Author for correspondence.