

УДК 579.67

В.Б. ПАНИЧКИН\*, В.А. ЛИВШИЦ, И.В. БИРЮКОВА, С.В. МАШКО

ЗАО «Научно-Исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АГРИ), Москва, 117545

e-mail: vladimir\_panichkin@agri.ru

## Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции L-триптофана

Обзор суммирует основные подходы, которые применялись при создании штаммов-продуцентов L-триптофана на основе *Escherichia coli* с целью промышленного производства этой аминокислоты. Кроме того, в обзоре намечены некоторые перспективы дальнейшего совершенствования продуцентов триптофана с целью повышения их продуктивности и улучшения технологических характеристик на основе подходов системной метаболической инженерии. Эти подходы могут быть использованы при получении продуцентов других ароматических аминокислот, а также предшественников или производных триптофана.

*Ключевые слова:* метаболическая инженерия, продуцент, L-триптофан, устойчивость к стрессам, *Escherichia coli*.

L-Триптофан (далее триптофан) — гидрофобная ароматическая аминокислота с индольной боковой цепью. Из 20 основных протеиногенных аминокислот триптофан наряду с цистеином встречается в белках всех живых организмов в наимень-

шем количестве, причем в белках эукариот реже, чем все остальные аминокислоты [1]. В белках человека среднее его содержание составляет около 1,3%; приблизительно столько же или несколько меньше — в белках сельскохозяйственных живот-

Паничкин Владимир Борисович, Лившиц Виталий Аркадьевич, Бирюкова Ирина Владимировна, Машко Сергей Владимирович.

*Список сокращений:* АФК — активные формы кислорода; ПФП — пентозофосфатный путь; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЦНС — центральная нервная система; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот; путь ЭМП — путь гликолиза Эмбдена—Мейергофа—Парнаса; AcCoA — ацетил-коэнзим А; ADP — аденозиндифосфат; ANTA — антранилат; ASA — L-аспартат-4-семиальдегид; Asp — L-аспарагин; Asp — L-аспартат; Asp-P — β-аспартил-фосфат; ATP — аденозинтрифосфат; cAMP — циклический аденозинмонофосфат; CHA — хоризмат; CoASH — коэнзим А восстановленный; DAHP — 3-дезоксид-арабино-гептулозонат 7-фосфат; DHA — дигидроксиацетон; DHAP — дигидроксиацетонфосфат; DHQ — 3-дегидрохинат; DHS — 3-дегидрошикимат; DKFP — 6-дезоксид-5-кетофруктозо-1-фосфат; DTHDA — 3,7-дидезокси-D-трео-гепто-2,6-диулозонат; E4P — эритрозо-4-фосфат; EPSP — 5-енолпирувил-шкимаат-3-фосфат; F1P — D-фруктозо 1-фосфат; F1,6P — D-фруктозо 1,6-бисфосфат; F6P — β-D-фруктофуранозо-6-фосфат; FADH<sub>2</sub> — флавинадениндинуклеотид восстановленный; FMNH<sub>2</sub> — флавиномононуклеотид восстановленный; G6P — β-D-глюкозо 6-фосфат; GA — галакт; GA3P — D-глицеральдегид 3-фосфат; Gln — L-глутамин; Glu — L-глутамат; HS — гомосерин; Ind — индол; KDPPGal — 2-кето-3-деокси-6-фосфогалактонат; Lys — L-лизин; Met — L-метионин; MG — метилглиоксаль; NAD<sup>+</sup> — никотинамидадениндинуклеотид окисленный; NADH — никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; NADP<sup>+</sup> — никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный; NADPH — никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; OAA — оксалоацетат; PEP — фосфоенолпируват; 3PG — 3-фосфоглицерат; Phe — L-фенилаланин; Pi — неорганический фосфат; PPA — префенат; PPi — пирофосфат; PRPP — 5-фосфо-α-D-рибозо-1-дифосфат; PTS — фосфотрансферазная система; Puc — пируват; QA — хиннат; Rib5P — рибозо-5-фосфат; Rul5P — рибулозо-5-фосфат; S3P — шкимаат-3-фосфат; SA — шкимаат; Sed7P — седогептулозо-7-фосфат; Ser — L-серин; Tre — L-треонин; Trp — L-триптофан; Tug — L-тирозин; Xyl5P — ксилулозо-5-фосфат.

\* Автор для переписки.

ных и птицы. В белках семян растений содержание триптофана варьирует: в запасных белках некоторых злаковых его существенно меньше, чем в белках животных (например, в зеине кукурузы — около 0,7%), однако в белках некоторых бобовых и орехов триптофан находится в количестве до 2% [2].

Триптофан относится к числу незаменимых аминокислот, т.е. он не синтезируется в организме человека и животных и обязательно должен доставляться с пищей или кормом [3]. Суточная потребность человека в этой аминокислоте определена в 4—5 мг/кг массы тела [4].

Триптофан выполняет в организме человека и животных множество важных функций. Поступивший в организм триптофан используется как для синтеза белка, так и для других целей: на основе триптофана образуется целый ряд соединений, таких как серотонин, мелатонин, ниацин, кинуренин и др., которые играют разнообразную и важную роль в жизнедеятельности человека и животных [5, 6]. В частности, нейромедиатор серотонин, который в популярной литературе иногда называют «гормоном счастья», участвует в осуществлении функций центральной нервной системы (ЦНС), определяющих настроение, возбуждение, агрессивность, боль, сон, память, пищевую и двигательную активность, контроль температуры тела и эндокринную регуляцию. В связи с этим диетические добавки триптофана рассматриваются как перспективное средство в комплексной терапии многих нервных и психических заболеваний. Условия и факторы, влияющие на эффективность триптофана при его применении в указанных случаях, продолжают исследоваться [4, 7, 8].

Наряду с другими аминокислотами триптофан входит в состав растворов для парэнтерального питания [9]. Кроме того, триптофан все шире применяют в качестве кормовой добавки, восстанавливающей баланс аминокислот и повышающей устойчивость животных к стрессам [3]. Сегодня с этой целью используется основная часть получаемого промышленностью триптофана.

Триптофан входит в качестве структурного блока в молекулы антидепрессантов [10] и противораковых препаратов — виолацеина, деоксивиолацеина [11].

Актуальность работ, связанных с установлением функций триптофана, его предшественников и производных для человека и животных, а также с их получением и применением, отражает тот факт, что им посвящен специальный международный научный журнал — “International Journal of Tryptophan Research” [12]. В 2015 г. вышел сбор-

ник обзоров, рассматривающих различные аспекты метаболизма триптофана в норме и при различных заболеваниях у человека [13].

Поскольку триптофан, его производные и предшественники находят широкое практическое применение, они представляют значительный коммерческий интерес. Производство этой аминокислоты осуществляют в основном с помощью микробного синтеза.

В настоящем обзоре мы постарались обобщить ранее известную информацию об основных подходах к созданию продуцентов триптофана на основе *Escherichia coli*, а также обрисовать проблемы, которые до сих пор остаются нерешенными, и на основе подходов системной метаболической инженерии наметить некоторые перспективы дальнейшего улучшения свойств продуцентов, в частности, за счет оптимизации их технологических характеристик.

#### ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ АМИНОКИСЛОТ

Методы и подходы, которые используют в настоящее время при создании штаммов-продуцентов аминокислот, и в частности, триптофана, объединяют понятием «метаболическая инженерия». Эта методология включает рациональное направленное изменение метаболизма клетки, которое осуществляется путем генно-инженерных манипуляций с ее регуляторными, ферментативными, транспортными функциями и энергетикой, для повышения биосинтеза целевого продукта. В последние годы с этой целью все чаще применяют глобальный подход — системную метаболическую инженерию, которая оперирует с клеткой на системном уровне, объединяя «X-омик»-технологии (геномику, транскриптомику, протеомику, метаболомику и флюксомику) с компьютерными методами, прецизионные возможности синтетической биологии — с методами рационального и случайного мутагенеза, эволюционной инженерии и обратной метаболической инженерии, тонкие изменения локальной регуляции — с манипуляциями глобальными регуляторами клеточного метаболизма [14—17]. К этим исследованиям привлекается весь арсенал современных методов, используемых при конструировании промышленных штаммов микроорганизмов [18].

Системная метаболическая инженерия приобретает особое значение при создании эффективного продуцента триптофана, поскольку достижение этой цели требует перераспределения метаболических потоков, регулируемых на различных

уровнях с участием глобальных регуляторов. Именно из-за существования сложной и строгой регуляции процесса биосинтеза этой аминокислоты в клетках бактерий на протяжении почти четырех десятилетий не удавалось методами классического мутагенеза и селекции получить пригодные для использования в промышленности продуценты. Успех был достигнут только с применением технологии рекомбинантных ДНК и подходов метаболической инженерии [19].

Себестоимость триптофана, как и других аминокислот, получаемых с помощью микробного синтеза, в большой степени определяется стоимостью основного субстрата — источника углерода (глюкозы, сахарозы, а в перспективе — глицерина, ацетата и др.). Поэтому важнейшей задачей при конструировании штаммов-продуцентов является обеспечение высокой конверсии субстрата в желаемый продукт.

В норме регуляция метаболизма бактерий направлена на максимизацию клеточного роста. Промышленное же производство требует, чтобы метаболизм клетки был ориентирован на образование определенного соединения. Таким образом, конструирование штамма-продуцента в значительной степени сводится к перенаправлению метаболических потоков от оптимального роста к оптимальному синтезу целевого продукта.

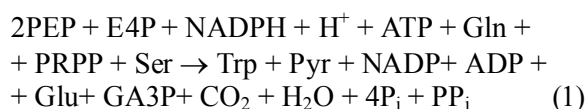
Границы максимально возможной конверсии субстрата в продукт детерминированы стехиометрией реакций в метаболической сети, которые включают образование и потребление кофакторов. Теоретические пределы микробного синтеза у *E. coli* определяли с использованием анализа баланса потока углерода в метаболической сети реакций. Без учета накопления биомассы максимальный теоретический молярный (т.е. моль/моль) выход триптофана из глюкозы, глицерина или уксусной кислоты составляет 0,414, 0,237 или 0,076, соответственно [20]. Рассчитанная максимальная конверсия указанных источников углерода в продукт по массе (т.е. г/г) равна 46,9%, 64,5 и 25,8%, соответственно.

Увеличение микробной продукции аминокислот достигается с помощью изменения уровня экспрессии и модификации ключевых структурных и регуляторных генов с последующим измерением накопления целевого и побочных продуктов. Полученная информация указывает на узкое место в пути биосинтеза. На этом основании дополнительно осуществляется сверхэкспрессия нужных генов, введение делеций или другие генетические модификации. Этот цикл (с учетом данных транскриптомного, протеомного, метаболомного и флюк-

сомного анализа полученного продуцента) повторяется до тех пор, пока не будут достигнуты достаточный для промышленного производства выход целевой аминокислоты и приемлемое соотношение между количеством основного и побочных продуктов [21].

Для того, чтобы описанный подход оказался успешным, необходимо выбрать оптимальный исходный штамм и в той или иной последовательности решить следующие задачи: обеспечить эффективный путь поступления субстрата в клетку; оптимизировать биосинтез целевого продукта; увеличить интенсивность потоков его предшественников; ограничить синтез побочных продуктов; предотвратить деградацию целевого продукта; обеспечить вывод целевого продукта из клетки и предотвратить его обратный транспорт в клетку.

Из суммарной реакции биосинтеза триптофана [22]



следует, что образование этой аминокислоты — энергоемкий процесс, требующий в качестве предшественников интермедиаты центрального метаболизма — фосфоенолпируват (PEP), эритрозо-4-фосфат (E4P) и фосфорибозилипирозин (PRPP), образующиеся в различных путях гликолиза: первый — в реакциях цепи Эмбдена—Мейергофа—Парнаса (ЭМП), а второй и третий — в пентозофосфатном пути (ПФП), соответственно; а также аминокислоты — глутамин и серин. При создании эффективного продуцента триптофана следует обеспечить этот процесс всеми необходимыми предшественниками.

Рассмотрим основные этапы и подходы, которые применялись при получении продуцентов триптофана на основе штаммов *E. coli*, использующих в качестве субстрата D-глюкозу.

## ВЫБОР И ОПТИМИЗАЦИЯ ИСХОДНОГО ШТАММА

В качестве исходного штамма *E. coli* целесообразно использовать или получить быстро растущий штамм, по возможности, не содержащий в геноме «лишней» информации в виде профагов [23], пар токсинов—антитоксинов и IS-элементов [24], наличие которой может явиться причиной потенциальной нестабильности будущего продуцента. Устранение несущественных областей генома, приобретенных клеткой в результате горизонтально-

го переноса генов, позволяет несколько ускорить рост клетки вследствие уменьшения размера реплицируемой хромосомы, а также уменьшить эффект белковой скученности (crowding) в цитоплазме и в мембране. С другой стороны, нужно помнить, что эта «лишняя» информация, возможно, содержит участки, ответственные за иммунитет клеток к фаговой инфекции. Уменьшение генома оказало заметный положительный эффект при конструировании, например, продуцента треонина [24].

Следует отметить, что широко распространенный лабораторный штамм *E. coli* MG1655 дикого типа (производный *E. coli* K12) несет ряд мутаций (*ilvG*, *rfb-50*, *rph-1*, *fnr-267*, *eut*), некоторые из которых ухудшают его рост на минимальной среде с глюкозой [25]. Замена аллелей с двумя мутациями, *ilvG* и *rph-1*, в геноме этого штамма на аллели дикого типа улучшила ростовые характеристики клеток [26]. В комбинации с протяженными делециями несущественных областей генома, перечисленными в работах [23, 24, 27], такой подход может обеспечить формирование приемлемого исходного штамма для последующего введения модификаций, приводящих к эффективной продукции триптофана.

Хотя штамм *E. coli* K12 и его производные до сих пор наиболее часто используют в качестве исходных при создании продуцентов аминокислот, следует иметь в виду, что другие штаммы *E. coli* — В (BL21), W и Crooks — имеют перед ним ряд преимуществ. Так, штамм *E. coli* В (BL21) изначально быстрее растет, продуцирует меньше ацетата и более устойчив к нему и лучше переносит повышенную концентрацию глюкозы в среде, видимо, по причине большей активности генов пути глюконеогенеза (*fbp*, *pckA*, *ppsA*), а также ЦТК и глиоксилатного шунта [28]. Высокая активность глиоксилатного шунта связана с тем, что у этого штамма слабо экспрессируются регуляторные гены *arcA* и *iclR* [29]. Что касается штамма *E. coli* W, то он изначально способен усваивать сахарозу [30], что может быть интересно для использования этого углевода как источника углерода при промышленном производстве триптофана. Все три указанных штамма более устойчивы к ряду стрессоров [31]. (Здесь следует заметить, что хотя стресс — это, как известно, адаптивная реакция организма, в литературе обычно используют термины «устойчивый/чувствительный к стрессу» и им подобные для обозначения способности или неспособности организма выживать и размножаться при воздействии неблагоприятных и повреждающих факторов — стрессоров.)

Для получения исходного штамма, обладающего большей скоростью роста и/или устойчивого к стрессорам, которые сопровождают процесс промышленной ферментации, можно модифицировать глобальные регуляторы, а также осуществлять адаптивную лабораторную эволюцию и комбинировать выявленные полезные мутации [31, 32].

Кроме различных лабораторных штаммов *E. coli* дикого типа в качестве исходного для получения продуцента триптофана можно использовать эффективный продуцент другой ароматической аминокислоты, например, фенилаланина [33].

### ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ ТРИПТОФАНА

Известно, что *E. coli* может разрушать триптофан и утилизировать его в качестве источника углерода и азота. Реакцию гидролитического расщепления триптофана до индола, пирувата и аммония катализирует фермент триптофаназа (триптофан-индоллиаза) [34].

Способность выделять индол долгое время использовалась для таксономической идентификации бактерий. В настоящее время установлено, что этим признаком обладают более 85 видов бактерий, включая некоторые патогенные, а также симбионты желудочно-кишечного тракта человека и животных [35]. Следует отметить, что эти симбионты могут заметно влиять на судьбу поступившего в организм триптофана, определяя его последующую доступность для синтеза белка и биологически активных производных (см. выше), а также уже в кишечнике превращать триптофан в серотонин или катаболизировать его с образованием кинуренина и других биологически активных соединений, влияющих на функции ЦНС и других органов и систем организма [36].

Сравнительно недавно было установлено, что и сам индол, являясь сигнальной молекулой, регулирует различные физиологические процессы у бактерий и человека [35]. В то же время, высокие концентрации индола и его производных, в том числе образующихся в кишечнике, подавляют рост бактерий, токсичны и канцерогенны для животных и человека [37, 38].

Геном *E. coli* содержит *tna*-оперон (*tna(C)AB*), кодирующий триптофаназу (TnaA), транспортер триптофана (TnaB), а также лидерный участок (*tnaC*), состоящий из 319 нуклеотидов, предшествующих *tnaA*. Белок TnaB, H<sup>+</sup>-симпортер, обеспечивает эффективный транспорт триптофана в клетку. Образование индола определяется коли-

чеством экзогенного триптофана, но триптофаназа не влияет заметным образом на стабильность этой аминокислоты, синтезируемой в клетке *de novo* [39]. Синтез триптофана подавляется в результате катаболитной репрессии *tna*-оперона в присутствии глюкозы и других источников углерода. При этом базальный (не подавляемый) синтез фермента в штаммах *E. coli* может быть довольно высоким, достигая 1—3% от максимального индуцированного уровня [40]. После исчерпания глюкозы в присутствии триптофана происходит индукция синтеза, которая обусловлена прекращением аттенуации, — прекращением терминации сопряженной с трансляцией транскрипции лидерного участка *tna*-оперона на Rho-зависимых сайтах терминации [41].

Необходимость устранения активности триптофаназы в процессе создания штамма-продуцента триптофана стала понятна уже по результатам первых экспериментов. Мутанты *E. coli*, устойчивые к 5-метилтриптофану, накапливали значительно больше индола, чем триптофана [42]. Очевидно, что индол появлялся в результате разрушения накапливающегося в среде триптофана, поскольку в качестве источника углерода в этих опытах использовали глицерин, не подавляющий синтез триптофаназы. Если же культивирование осуществляется на среде с глюкозой, образование индола особенно активно происходит после ее исчерпания. Таким образом, инактивация гена *tnaA*, а лучше — делеция всего *tna(C)AB*-оперона с тем, чтобы нарушить также транспорт триптофана в клетки (см. ниже), является обязательным начальным этапом конструирования продуцента этой аминокислоты [43—46].

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТРИПТОФАНОВОГО ПУТИ

Триптофан образуется из общего предшественника ароматических аминокислот — хоризмата, который синтезируется в ходе шикиматного пути (рис. 1).

Путь биосинтеза триптофана состоит из пяти последовательных энзиматических реакций. Первая реакция заключается в превращении хоризмата и глутамината в антранилат, глутамат и пиридат. Реакция катализируется антранилат-синтазой; гены *trpE* и *trpD* кодируют компоненты I и II антранилат-синтазы, соответственно. После этого из антранилата и PRPP формируется фосфорибозилантранилат. Реакцию катализирует компонент II антранилат-синтазы, или антранилат-фосфорибозилтрансфераза (продукт гена *trpD*). Первый фермент биосинтетического пути подвержен ре-

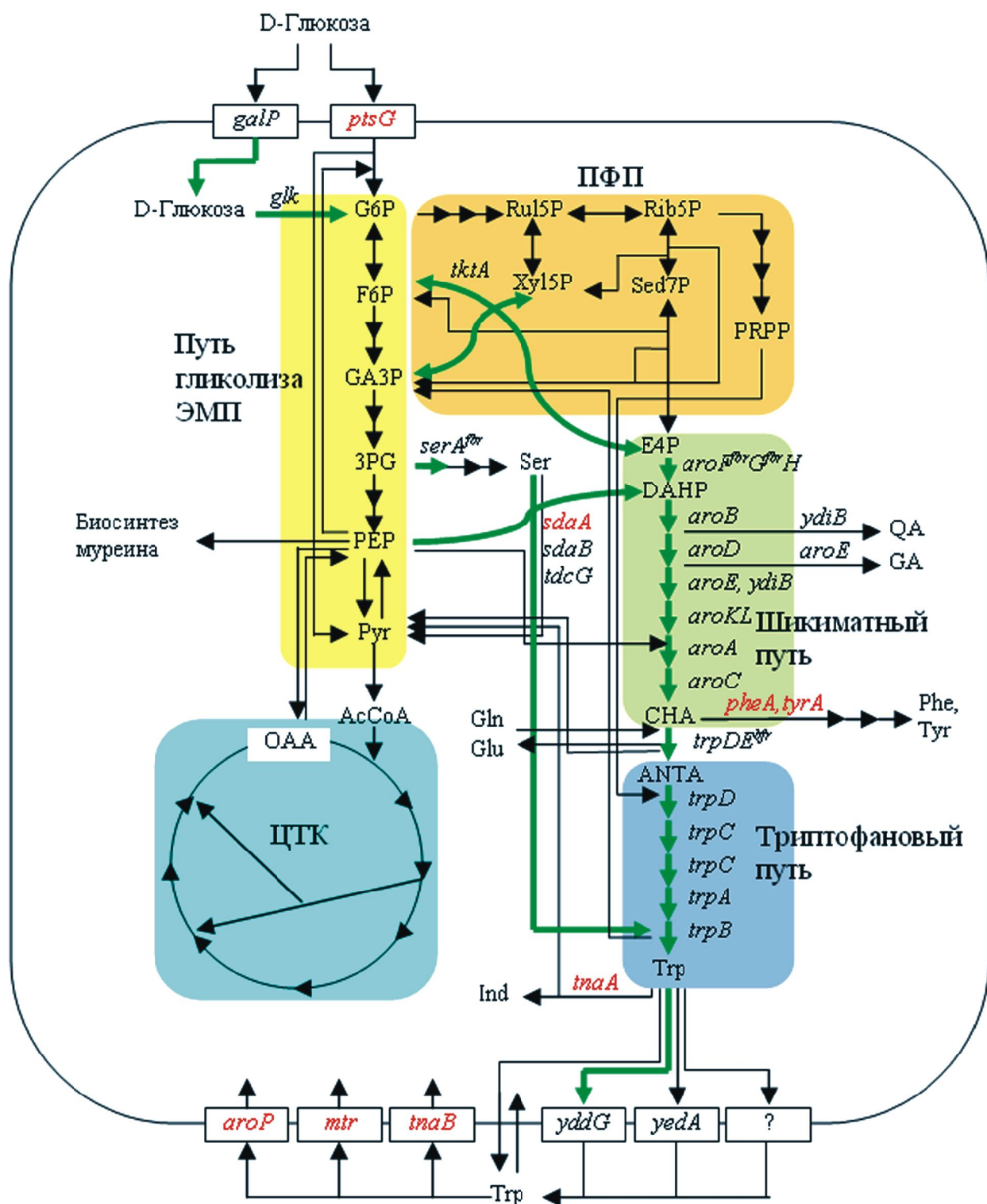
роингибированию триптофаном. При этом триптофан подавляет и антранилат-синтетазную и фосфорибозил-трансферазную активность. Ингибирование компонента I достигает 100%, в то время как компонента II — 70% [47]. При этом компонент II вне комплекса не подавляется. Две следующие реакции — изомеризация фосфорибозилантранилата в 1-(о-карбоксофениламино)-1-деоксирибулозо-5-фосфат и последующее формирование индолглицеролфосфата катализируются одним ферментом, кодируемым геном *trpC*. Индолглицеролфосфат-синтетазная активность ингибируется антранилатом [48].

Последнюю стадию биосинтеза триптофана осуществляет фермент триптофансинтаза, содержащий два белковых компонента, А ( $\alpha_2$ ) и В ( $\beta_2$ ), каждый из которых представляет собой димер продуктов генов *trpA* и *trpB*, соответственно. Компонент В состоит из двух  $\beta$ -субъединиц,  $\beta_2$ , имеет два центра связывания кофактора — пиридоксальфосфата и два независимых сайта, к которым присоединяется по одной  $\alpha$ -субъединице. Субъединица  $\alpha$  катализирует образование индола и D-глицеральдегид-3-фосфата из индолглицеролфосфата, а субъединицы  $\beta_2$  участвуют в превращении индола и серина в присутствии пиридоксальфосфата в триптофан.

Биосинтез триптофана у *E. coli* подвержен негативной генетической и метаболической регуляции. Для его сверхпродукции необходимо в первую очередь нарушить все элементы этой регуляции. Гены, контролирующие последовательные этапы синтеза триптофана, организованы в *trp*-оперон (*trpP/O-L-EDCBA*) [49]. Транскрипция *trp*-оперона регулируется с помощью механизма репрессии продуктом гена *trpR*, который после присоединения триптофана взаимодействует с промотор/операторным участком (*trpP/O*) регуляторной области оперона. Для обеспечения повышенного синтеза ферментов триптофанового пути уже в ранних работах, связанных с получением продуцента, отбирали мутации, инактивирующие ген *trpR* [43—45].

Экспрессия *trp*-оперона дополнительно регулируется с помощью механизма аттенуации — терминации транскрипции на сайте вслед за локусом *trpL*. Аттенуация связана с трансляцией кодируемого *trpL* лидерного пептида и определяется содержанием в клетке триптофанил-тРНК<sup>Trp</sup>, которое, в свою очередь, зависит от внутриклеточной концентрации триптофана [49].

Для предотвращения терминации можно удалить аттенуатор или использовать мутантный



аллель гена *trpS* (*trpS*<sup>378</sup>), кодирующий триптофан-ил-тРНК-синтетазу с пониженным сродством к триптофану [43, 50]. Однако наиболее радикальное средство усиления экспрессии *trp*-оперона — это замена всей его регуляторной области на сильный индуцибельный или конститутивный промотор [51, 52]. При этом инактивировать TrpR, видимо, все равно представляется целесообразным, поскольку он репрессирует гены *aroL* и *aroH* шикиматного пути [50].

Другое ограничение сверхпродукции триптофана обусловлено тем, что фермент антранилатсинтаза, катализирующий первую реакцию в пути его биосинтеза, как уже было отмечено, подвержен ретроингибированию [47]. Поэтому необходимым этапом оптимизации биосинтеза триптофана является получение мутаций в гене *trpE*, которые нарушают подавление активности антранилатсинтазы конечным продуктом. Соответствующие мутации (*trpE*<sup>fbr</sup>) получали у *E. coli* с помощью селекции на устойчивость к аналогам триптофана и использовали уже при создании первых штаммов *E. coli*, способных выделять триптофан в среду [42].

В исследовании с *Salmonella typhimurium* такого рода мутации были получены и локализованы в двух кластерах белка TrpE, затрагивающих аминокислотные остатки 39—41 и 288—305 [53]. Среди проанализированных 14 мутаций три — E39K, S40F, M293T — представляют наибольший интерес, поскольку детерминируют синтез антранилатсинтаз, которые не ингибируются триптофаном и в то же время имеют практически неизменную каталитическую активность [53]. Поскольку белки TrpE из *S. typhimurium* и *E. coli* имеют значительное сходство, соответствующие мутации в данной субъединице антранилатсинтазы используют при конструировании продуцента триптофана на основе *E. coli*; например, в опубликованной недавно работе с этой целью получали мутацию M293T [54].

В результате комбинирования мутаций, нарушающих репрессию и аттенуацию *trp*-оперона, с мутациями, снимающими ретроингибирование антранилатсинтазы и ДАНР-синтазы (фермента, катализирующего ключевую реакцию общего ароматического пути, см. ниже), а также с мутациями в генах *pheA* и *tyrA*, блокирующими отток хоризмата на путь синтеза фенилаланина и тирозина, в работе [43] получили продуцент, который накапливал немногим более 1 г/л триптофана. При этом было установлено, что узким местом оставался недостаточно высокий уровень активности ферментов *trp*-оперона, поскольку введение дополни-

тельной копии гена *trpE*<sup>fbr</sup> на F'-плазмиде повышало продукцию триптофана.

Как уже отмечалось, решающую роль в создании продуцентов триптофана (и других ароматических аминокислот), подходящих для использования в промышленности, сыграло применение методов рекомбинантных ДНК. Амплификация *trp*-оперона путем клонирования на плазмидах повысила уровень его экспрессии [55]. После получения на гибридной плазмиде мутации *trpE*<sup>fbr</sup> и введения этой плазмиды в штамм *E. coli*, имеющий делецию всего *trp*-оперона (*trpA-E*), а также мутации в генах *trpR* и *tnaA* [44, 45] продукция триптофана на среде с глюкозой возросла до 5,5 г/л [44], а с добавлением антраниловой кислоты увеличилась до 6,2 г/л [45]. На основе этого штамма с помощью селекции на устойчивость к 6-фтортриптофану, 8-азагуанину и сульфуганидину был получен его производный, который в ферментационной среде с антранилатом накапливал 54,6 г/л триптофана. При этом 31,2 г/л аминокислоты образовывалось из экзогенного антранилата и 23,4 г/л — из глюкозы [56]. Интересно, что если для ферментации использовать антранилат, замещенный в положениях 3, 4, 5 и 6, то и на выходе получается триптофан с заместителями в этих положениях [57].

В работе [58] рекомбинантный штамм *E. coli* был получен за счет интеграции в хромосому и последующей амплификации (до трех копий) триптофанового оперона, первоначально клонированного на плазмиде. Это привело к повышению уровня активности антранилатсинтазы и обеспечило накопление 9,2 г/л триптофана (13%-ная конверсия глюкозы в триптофан). При этом было установлено, что полученный штамм в отличие от плазмидного оставался стабильным без специального селективного давления (введения антибиотика) во время ферментации. В этом исследовании впервые показана эффективность стратегии амплификации соответствующих генов в хромосоме для обеспечения сверхсинтеза аминокислоты.

Таким образом, основным подходом к оптимизации триптофанового пути является адекватное повышение уровня синтеза соответствующих ферментов с одновременным нарушением ретроингибирования антранилатсинтазы и антранилатфосфорибозилтрансферазы. Это может быть достигнуто за счет усиления экспрессии *trp*-оперона, несущего мутацию *trpE*<sup>fbr</sup>, путем клонирования его на мультикопийной плазмиде, или введения его под контроль сильного промотора. В последнем случае одна или несколько копий оперона

могут быть интегрированы в хромосому для получения стабильного бесплазмидного продуцента.

#### ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА СЕРИНА, ГЛУТАМИНА И PRPP

Указанные в суммарной реакции (1) такие предшественники биосинтеза триптофана, как серин, глутамин и PRPP, нужны именно для осуществления этапов биосинтеза по триптофановому пути. Было обнаружено, что у *Corynebacterium glutamicum* генетические модификации, увеличивающие поток углерода по этому пути, могут приводить к накоплению индола. Поскольку указанный организм не имеет триптофаназы, индол, очевидно, появляется из-за недостатка серина, необходимого для его превращения в триптофан. Следовательно, увеличение доступности серина является важным условием эффективной продукции триптофана [59].

Биосинтез серина начинается с интермедиата пути гликолиза ЭМП — 3-фосфоглицерата (3PG), который посредством трех последовательных реакций, катализируемых 3-фосфоглицератдегидрогеназой, 3-фосфосеринаминотрансферазой и 3-фосфосеринфосфатазой, продуктами генов *serA*, *serC* и *serB*, соответственно, превращается в серин.

Первый из указанных ферментов подвержен ингибированию серином, поэтому наиболее значимым приемом оптимизации его биосинтеза является получение мутантного гена *serA* (*serA<sup>fbr</sup>*), продукт которого не чувствителен к ретроингибированию. С этой целью можно использовать производные *SerA*, несущие, в частности, замены N344A и N346A [60].

Реакция превращения 3-фосфогидроксипирувата в 3-фосфосерин, осуществляемая *SerC*, требует наличия глутамата, выступающего в качестве донора аминогруппы. Образующийся при этом 2-оксоглутарат снова способен превращаться в глутамат в результате реакции, катализируемой глутаматсинтазой, которую кодируют гены *gltB* и *gltD*, с использованием глутамина и NADPH или в результате прямого аминирования, катализируемого глутаматдегидрогеназой (кодируется геном *gdhA*), с использованием аммония. В свою очередь, образование глутамина осуществляется в реакции аминирования глутамата глутаминсинтазой (кодируется геном *glnA*) при участии АТФ.

Таким образом, наряду с повышением уровня экспрессии гена *serA<sup>fbr</sup>*, оптимизация экспрессии генов *gltB*, *gltD*, *glnA* и *gdhA* может рассматриваться как путь к увеличению доступности серина

для эффективной продукции триптофана. Следует отметить, что одновременно с этим может решаться и другая задача — обеспечение доступности самого глутамина, также необходимого для биосинтеза триптофана. С этой целью можно использовать приемы, которые применяют для повышения продукции этой аминокислоты. Одним из подходов может быть внесение замены Y397F в белок *GlnA*, которая, видимо, нарушает аденилирование глутаминсинтазы, и в конечном счете подавление ее глутамином, что приводит к значительному увеличению активности фермента в клетке [61]. Другой подход заключается в прямом нарушении активности белков, принимающих участие в сложном двухстадийном процессе аденилирования глутаминсинтазы. Не рассматривая детали этого процесса, отметим только, что инактивация *GlnE* и/или *GlnB* также приводит к сверхсинтезу глутамина и может применяться при конструировании различных продуцентов, использующих глутамин в процессе биосинтеза целевого продукта [62].

Принципиально иным подходом к увеличению пула серина в клетках является подавление его расщепления до пирувата (Pyr) и  $\text{NH}_4^+$ . В деградацию серина вовлечены дезаминазы I, II и III, кодируемые генами *sdaA*, *sdaB*, и *tdcG*, соответственно. Удаление активности этих ферментов успешно применялось при конструировании продуцента триптофана [63]. Ген *sdaA* был делетирован также при конструировании продуцента производных триптофана — виолацеина и дезоксивиолацеина [11, 64]. При конструировании продуцента серина, у которого повышена экспрессия гена *serA<sup>fbr</sup>*, введение мутации  $\Delta sdaA$ , двойной делеции  $\Delta sdaAB$ , а также тройной делеции  $\Delta sdaAB \Delta tdcG$  сопровождалось последовательным увеличением продукции серина [60].

Однако наибольшее количество синтезируемого серина метаболизируется далее продуктом гена *glyA* — серингидроксиметилтрансферазой, которая катализирует превращение его в глицин. Полностью инактивировать этот ген нельзя потому, что тем самым нарушится основной процесс образования не только глицина, но и 5,10-метилентетрагидрофолата, источника  $\text{C}_1$ -компонентов, важных для биосинтеза пуринов, тимидина, метионина, холина и липидов. В то же время, можно использовать более тонкие приемы, например, изменение уровня экспрессии гена *glyA* путем модификации его регуляторной области [65].

Для обеспечения повышенной потребности в PRPP в условиях сверхсинтеза триптофана целесообразно усилить экспрессию гена *prs*, кодирующего фосфорибозилпирофосфатсинтазу. Такой



подход осуществлялся фирмой Showa Denko при создании продуцента триптофана на основе *Bacillus amyloliquefaciens* [цит. по 66]. Так был получен штамм с повышенной продуктивностью. Однако, стремясь еще больше снизить себестоимость продукта, при этом одновременно изменили процедуру очистки триптофана, что, вероятно, и привело к трагическим последствиям (см. ниже). Необходимость активации синтеза PRPP при конструировании продуцента триптофана на основе *E. coli* обсуждается в цитированной выше работе [52].

### ШИКИМАТНЫЙ ПУТЬ И ЕГО ОПТИМИЗАЦИЯ

Слово «шикимат» произошло от японского названия («шикими но ки») растения бадьяна анисового (*Illicium anisatum*), из плодов которого впервые была выделена шикимовая кислота [67]. Шикиматный, или общий ароматический путь посредством семи реакций обеспечивает биосинтез хоризмата (см. рис. 1) — предшественника всех ароматических аминокислот, а также образование интермедиатов самых разных ароматических соединений у микроорганизмов и растений [68]. Ферменты, катализирующие эти реакции у *E. coli*, достаточно хорошо изучены и описаны (см., например, [19, 69, 70]). Рассмотрим эти ферменты, соответствующие гены и их модификации, необходимые для получения эффективного продуцента триптофана.

**ДАНР-синтазы (гены *aroG*, *aroF*, *aroH*).** Первую, ключевую реакцию общего ароматического пути — альдольную конденсацию E4P и PEP в семиуглеродную кетокислоту ДАНР с выделением неорганического фосфата — катализируют у *E. coli* ДАНР-синтазы AroG, AroF, и AroH. Активность каждого из этих изоферментов составляет около 80%, 20 и 1%, соответственно, от всей активности [19]. Эти белки аллостерически ингибируются ароматическими аминокислотами: активность AroG почти полностью подавляется фенилаланином и частично тирозином; AroF полностью ингибируется тирозином, в то время как на AroH эти аминокислоты не оказывают подавляющего действия. Активность AroH лишь на 55% ингибируется триптофаном [71]. Поэтому простое увеличение экспрессии генов этих ферментов малоэффективно. Получение мутантных вариантов наиболее активных изоферментов, нечувствительных к ингибированию конечным продуктом (AroG<sup>fbr</sup> и AroF<sup>fbr</sup>), является необходимым этапом в создании продуцентов триптофана [72].

Белки AroG, AroF, и AroH состоят из приблизительно одинакового числа аминокислотных

остатков — 350, 356 и 348, соответственно. Около 39,9% остатков идентичны; последние локализованы главным образом в центральной области аминокислотной последовательности (остатки 49—75, 90—111 и 122—191), в то время как менее схожие участки находятся на С- и N-концах [73]. Это позволяет сравнивать и выявлять аминокислоты, замена которых приводит к снятию ретроингибирования. Например, замена P148L приводит к устранению чувствительности к тирозину у AroF [74]. Замены V147M, G149D и A177T полностью снимают подавление продукта гена AroH триптофаном [73]. У AroG по крайней мере три замены имеют наилучшее сочетание высокой активности и устойчивости к ингибированию фенилаланином: P150L, L175D и F209A [75]. Следует отметить, что именно мутацию P150L в AroG использовали авторы недавно опубликованной работы, посвященной рациональному конструированию продуцента триптофана [52]. При этом надо иметь в виду, что некоторые мутации ДАНР-синтаз, нарушающие их ретроингибирование, могут придавать ферменту температурочувствительность [76].

Поток углерода через шикиматный путь у *E. coli* в норме не превышает 2% [77]. В то же время, через шикиматный путь растения синтезируют не только ароматические аминокислоты, но и множество вторичных метаболитов — пигменты, алкалоиды, кумарины, лигнин и др., направляя туда до 30% всего фиксированного углерода [78]. Поэтому не исключено, что растения имеют набор ферментов, более приспособленный для высокой продукции ароматических соединений. Действительно, например, ДАНР-синтаза, выделенная из цветной капусты (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* Mill.), не ингибируется ни хоризматом, ни триптофаном, ни тирозином, ни фенилаланином [79]. Другим примером такого устойчивого к ингибированию фермента является ДАНР-синтаза чая (*Camellia sinensis* L.). Было показано, что ее активность не изменялась при добавлении как любой из ароматических аминокислот, так и некоторых других синтезируемых в растении ароматических соединений [80].

Еще более эффективными для сверхсинтеза интермедиатов шикиматного пути могут быть ДАНР-синтазы, активируемые продуктами этого пути; это явление было неожиданно обнаружено, например, для Mn<sup>2+</sup>-зависимой ДАНР-синтазы III из моркови, которая активируется триптофаном и в меньшей степени тирозином. D-Аминокислоты и другие 18 протеиногенных аминокислот не влияют на активность этого фермента [81]. Похожими свойствами обладает единственная ДАНР-син-

таза из клубней картофеля, которая активируется не только триптофаном, тирозином и фенилаланином, но и некоторыми соединениями, образующимися в результате реакций общего ароматического пути — хоризматом и префенатом [82].

Таким образом, еще одним подходом, позволяющим усилить ключевую реакцию общего ароматического пути, может быть использование ДАНР-синтазы из растений.

**ДНҚ-синтаза (ген *aroB*).** После того, как пул ДАНР увеличен, узким местом в образовании конечного продукта становится вторая стадия шикиматного пути — реакция синтеза ДНҚ из ДАНР, осуществляемая ДНҚ-синтазой (*AroB*) (см. рис. 1) [83, 84]. Среди подходов, увеличивающих поток углерода через эту стадию, можно выделить два: классическое увеличение экспрессии гена *aroB* (амплификация, изменение силы промотора, сайта инициации трансляции, стабилизация мРНК), а также оптимизация его кодонов (что обычно бывает эффективно при оптимизации экспрессии гетерологичных генов). В частности, третий кодон гена *aroB E. coli* (AGG) является одним из наиболее редко встречающихся аргининовых кодонов, что может затруднять трансляцию. Для повышения уровня экспрессии гена в некоторых его первых 15 кодонах заменяли редко встречающиеся кодоны на синонимичные с большей частотой встречаемости. Так был получен оптимизированный ген *aroB<sup>op</sup>*, обеспечивший значительный положительный эффект на продукцию тирозина [21]. Этот успех указывает на возможность применения аналогичного подхода для оптимизации экспрессии и других генов шикиматного пути, содержащих редкие аргининовые кодоны (см. ниже). При этом, однако, следует помнить о том, что оптимизация кодонов не всегда интенсифицирует экспрессию [15].

**ДНҚ-дегидратаза (ген *aroD*).** Белок *AroD* катализирует третью реакцию шикиматного пути, осуществляя конверсию ДНҚ в 3-дегидрошикимат путем введения первой двойной связи в ароматическое кольцо [85]. Сверхэкспрессия гена *aroD*, сама по себе или в комбинации с другими генами шикиматного пути, в некоторых случаях повышала продукцию тирозина [86]. Этот ген также включали в шикиматный модуль и оптимизировали его экспрессию при модульном конструировании продуцента тирозина [21].

**Шикимат-дегидрогеназа (гены *aroE* и *ydiB*).** Четвертую стадию шикиматного пути — восстановление 3-дегидрошикимата в шикимат, катализируют два фермента: NADPH-зависимая шикиматдегидрогеназа *AroE* и фермент с двойной спе-

цифичностью — хиннат-шикиматдегидрогеназа *YdiB* (кофактор — NADP<sup>+</sup> или NAD<sup>+</sup>) [86—88]. Каталитическая активность *YdiB in vitro* ниже, чем *AroE*, однако это свойство может компенсироваться *in vivo* более широкой кофакторной специфичностью первого фермента [88]. При комбинировании на плазмиде разных генов шикиматного пути было показано, что сверхэкспрессия гена *ydiB* (в сочетании с *aroK*, а не *aroE*) в наибольшей степени повышала продукцию тирозина модельными продуцентами этой аминокислоты [21]. Авторы связывают данный факт с тем, что фермент *AroE* подвержен ингибированию шикиматом [83]. Основываясь на этих данных, для обеспечения биосинтеза шикимата при модульном конструировании продуцента тирозина первоначально использовали ген *ydiB* [21]. Однако полученный штамм накапливал значительное количество предшественников, в первую очередь DHS (что указывало на узкое место в пути биосинтеза), а также хиннат, что, очевидно, было связано с хиннатдегидрогеназной активностью *YdiB*. Замена *ydiB* на *aroE* привела к пятикратному увеличению продукции шикимата и прекращению накопления хинната. Однако общий поток углерода в направлении биосинтеза шикимата при этом уменьшился, видимо, из-за того, что образующийся шикимат подавлял активность *AroE* [21].

Целесообразность ослабления или даже полного устранения активности *YdiB* следует из данных патента, в котором показано, что делеция *ydiB* и/или *ydiN* (предположительно ген шикиматного транспортера [89]) повышает продукцию ароматических аминокислот [90]. Таким образом, при создании продуцента триптофана следует повысить экспрессию гена *aroE*, а подавление активности *AroE* шикиматом [83] и образование галловой кислоты [91], которое может катализировать *AroE*, предотвратить путем эквивалентной интенсификации следующей стадии общего ароматического пути [21].

**Шикиматкиназы (гены *aroL* и *aroK*).** Шикиматкиназы осуществляют пятую стадию шикиматного пути, и обеспечивают синтез шикимат-3-фосфата из шикимата и АТФ. Реакция, катализируемая этими ферментами, рассматривается как еще один лимитирующий этап общего ароматического пути [83, 84]. Обеспечивая отток шикимата, она влияет на осуществление предшествующей стадии. Большинство работ посвящено усилению экспрессии шикиматкиназы II (*AroL*), поскольку константа Михаэлиса (*K<sub>m</sub>*) у нее ниже, чем у шикиматкиназы I *AroK* (200 мкМ против более 20 мМ) [92—94]. Однако *AroL* подвержена ингибированию

нию высокими концентрациями субстрата реакции (активность уменьшается в семь раз при увеличении концентрации шикимата от 1 до 10 мМ); к тому же ген *aroL* имеет два редких аргининовых кодона — AGG-150 и AGA-177 [86, 95]. Поэтому при получении продуцентов рекомендуют увеличивать эффективность экспрессии не только гена *aroL*, но и *aroK*, продукт которого менее чувствителен к ингибированию. Следует отметить, что при некоторых условиях, например, в сочетании с увеличенной экспрессией *ydiB*, сверхэкспрессия *aroK* приводит к более высокой продукции аминокислот по сравнению с усилением экспрессии *aroL* [86, 96].

**EPSP-синтаза (ген *aroA*).** Белок AroA катализирует шестую реакцию шикиматного пути, осуществляя перенос енолпирувоильной части от PEP к гидроксильной группе углерода в положении 5 шикимат-3-фосфата с образованием 5-енолпирувилшикимат-3-фосфата (EPSP) [97]. Добавляемый трехуглеродный фрагмент участвует в формировании боковой цепи фенилаланина и тирозина, но удаляется в процессе биосинтеза триптофана на стадии превращения хоризмата в антранилат (см. рис. 1). Недостаточная активность этой реакции может ограничивать скорость биосинтеза ароматических аминокислот и нуждается в усилении [21, 83, 86].

**Хоризматсинтаза (ген *aroC*).** Фермент катализирует седьмую, последнюю стадию шикиматного пути, превращая EPSP в хоризмат за счет введения второй двойной связи в систему ароматического кольца. Энзиматический механизм реакции подробно изучен (см., например, [98, 99]). Фермент требует наличия FMN<sub>2</sub> или FADH<sub>2</sub> с предпочтением FMN<sub>2</sub> в качестве кофактора [100]. Реакция чувствительна к кислороду [101].

При одновременном повышении активности хоризматсинтазы и EPSP-синтазы путем клонирования на плазмиде генов *aroC* и *aroA* наблюдали увеличение продукции фенилаланина [83] и тирозина [86] соответствующими продуцентами.

Экспрессия генов *aroG*, *aroF* и *aroL* общего ароматического пути репрессируются белком TugR, продуктом гена *tyrR*; кроме того, как уже отмечалось, гены *aroH* и *aroL* репрессируются при участии TrpR, продукта гена *trpR*. При конструировании продуцента регуляторные гены *tyrR* и *trpR* следует инактивировать.

Таким образом, для увеличения потока углерода через шикиматный путь следует использовать в качестве ДАНР-синтазы ферменты с высокой активностью и нарушенным ретроингибированием — AroG<sup>fbr</sup> или AroF<sup>fbr</sup>, а также устранить ме-

таболическую регуляцию и повысить активность ряда других ферментов общего ароматического пути, в первую очередь AroB, AroE, AroL и AroA. С этой целью, в частности, можно расположить соответствующие гены в виде искусственных оперонов и обеспечить оптимальный уровень их экспрессии [21], например, конструируя опероны, содержащие трансляционно-сопряженные гены [102]. При этом в гене *aroB*, а также в *aroE* и *aroL* стоит заменить редкие аргининовые кодоны. В процессе этих манипуляций целесообразно использовать целевую протеомику и метаболомику для определения оптимального уровня экспрессии всех создаваемых конструкций [21].

Другой подход может быть связан с использованием гена *ARO1* из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [103]. Этот ген кодирует пентафункциональный пептид AROM, осуществляющий пять из семи реакций общего ароматического пути, домены которого гомологичны монофункциональным ферментам (AroB, AroA, AroL, AroD и AroE) из *E. coli* [104]. Однако экспрессию *ARO1* необходимо существенно оптимизировать из-за наличия в нем 37 редких аргининовых кодонов, которое может затруднять его эффективную экспрессию в клетках *E. coli*.

Еще одним подходом, перспективным при создании продуцентов триптофана и других ароматических соединений, может быть использование чужеродных генов из растений.

#### ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДОСТУПНОСТИ PEP И E4P ДЛЯ СИНТЕЗА ТРИПТОФАНА

После того, как активирован триптофановый путь, оптимизировано поступление в него серина, глутамина и PRPP, а также расширены узкие места шикиматного пути, следующей задачей становится увеличение доступности основных предшественников всех ароматических соединений — PEP и E4P, интермедиатов центрального метаболизма.

Как видно из суммарной реакции биосинтеза триптофана (1), на каждый моль аминокислоты требуется 2 моля PEP. Следовательно, недостаток PEP может ограничивать продукцию этой аминокислоты. В клетках *E. coli*, растущих на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, 50% PEP, образующегося при реализации пути гликолиза ЭМП, используется для ее транспорта в клетки и фосфорилирования с помощью PTS. Оставшийся PEP в пропорции приблизительно 16%, 15, 16 и 3% расходуется в реакциях, катализируемых соответственно PEP-карбоксилазой (Ppc), пируваткиназами (PycA и

РукF), уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин-енол-пирувилтрансферазой (MurA) и ДАНР-синтазами (AgoG, AgoH и AgoF) [105]. Важность сохранения PEP для синтеза ароматических соединений ярко демонстрируют следующие факты. При использовании независимого от PTS пути поступления глюкозы в клетки выход ДАНР и фенилаланина увеличивался соответственно на 65 и 57% по сравнению с изогенными PTS<sup>+</sup>-штаммами [106].

Перечислим возможные подходы к увеличению доступности PEP для синтеза триптофана (и других ароматических аминокислот):

— замена PTS-зависимого транспорта глюкозы на ее PTS-независимый транспорт. С этой целью, с одной стороны, инактивируют гены, кодирующие соответствующие компоненты PTS (мутации  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta ptsHlcr$ ), а с другой — активируют транспорт глюкозы с помощью H<sup>+</sup>-симпортеров моносахаридов, способных также перемещать в клетки глюкозу. Чаще всего с этой целью используют пермеазу галактозы GalP [107, 108]; можно использовать также пермеазу ксилозы XylE и пермеазу фукозы FucP из *E. coli* [108] или *Pantoea ananatis* [109]. Для последующего внутриклеточного фосфорилирования глюкозы с использованием АТР (вместо PEP) необходимо увеличить до оптимального уровня активность глюкокиназы (Glk), кодируемой геном *glk* [107, 108]. Кроме того, для обеспечения PEP-независимого транспорта можно ввести в геном PTS<sup>-</sup>-клеток *E. coli* гены *glf* и *glk* из *Zymomonas mobilis*, продукт первого из которых облегчает диффузию глюкозы в клетки, а второго — обеспечивает ее фосфорилирование [110];

— инактивация (или существенное ослабление уровня экспрессии) генов, продукты которых катализируют реакции с расходом PEP, таких как PEP-карбоксилаза (продукт гена *ppc*) [111] или пируваткиназы (продукты генов *pykA* и *pykF*) [112];

— регенерация PEP из пирувата, образующегося при PEP-зависимом транспорте сахара, в реакциях, катализируемых пируваткиназами и др., путем повышения уровня экспрессии гена *ppsA*, кодирующего PEP-синтазу [113];

— активация декарбоксилирования оксалоацетата (ОАА) с образованием PEP в АТР-зависимой реакции, катализируемой PEP-карбоксикиназой, путем повышения уровня экспрессии гена *pscA*, кодирующего этот фермент [114, 115]. Данную реакцию можно рассматривать также как завершение цикла превращений пирувата (Pyr) в PEP посредством вхождения Pyr в гликоксилатный шунт через последовательные реакции синтеза Ас-

СоА, цитрата, изоцитрата и перехода углерода Ас-СоА в ОАА и далее в PEP [114];

— манипуляции с глобальной регуляторной системой Csr, контролирующей, в частности, экспрессию генов ферментов глюконеогенеза, гликолиза, а также синтеза и катаболизма гликогена [116]. Этот подход обсуждался нами в другой статье [117]. Недавно появилась новая работа, свидетельствующая о перспективности повышения уровня экспрессии гена *csrB* для сверхсинтеза триптофана [118];

— наконец, можно использовать источники углерода, поступающие в клетку не через PTS, например, глицерин [64].

Осуществляя манипуляции, способные приводить к повышению внутриклеточной концентрации PEP, следует иметь в виду регуляторную функцию этого соединения. Избыток PEP может снижать поток углерода через путь гликолиза ЭМП за счет ингибирования некоторых ферментов, в частности фосфофруктокиназы, продукта гена *pfkA* [119], а также фосфоглюкоизомеразы (продукта гена *pgi*) и фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолазы (продукта гена *fbaB*) [120].

PEP может эффективно конкурировать за сайт связывания с АТР на глюкокиназе [120], подавляя фосфорилирование глюкозы, поступающей в клетки с помощью PTS-независимого транспорта и тем самым нарушая ее усвоение. Описано также ингибирование со стороны PEP ряда ферментов ЦТК и гликоксилатного шунта [121], а также ферментов, катализирующих его собственное образование из Pyr и ОАА (см. выше) [122, 123].

Чтобы не допустить негативных последствий повышенной внутриклеточной концентрации PEP, необходимо обеспечить баланс исходных предшественников Trp — PEP и E4P — в клетках с суперпродукцией этой аминокислоты. Основной подход, который позволяет преодолеть недостаток E4P для эффективной продукции ароматических соединений, связан со сверхэкспрессией генов, кодирующих транскетолазы [124, 125] или трансальдолазы [126, 127] — ферменты неокислительного этапа ПФП. С этой целью обычно увеличивают экспрессию генов *tktA* и *talB*, кодирующих указанные ферменты.

Кроме того, описан ряд приемов, позволяющих перенаправить поток углерода в ПФП и тем самым создать условия для повышенного образования E4P:

— инактивация фосфоглюкоизомеразы [128], кодируемой геном *pgi*, либо подавление экспрессии этого гена с помощью малых регуляторных РНК [129];

— усиление экспрессии гена *fbp*, кодирующего фруктозо-1,6-бисфосфатазу [130];

— усиление экспрессии гена *zwf*, кодирующего глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу [131] и/или гена *pgl*, кодирующего 6-фосфоглюконолактоназу (ферментов окислительного этапа ПФП) [132].

Интересно отметить, что у мутантов *talAB*, дефектных по трансальдолазам, при росте на среде с ксилозой или глюконатом было обнаружено превращение седогептулозо-7-фосфата в седогептулозо-1,7-бисфосфат с последующим образованием Е4Р и ДНАР [133]. Эти реакции катализируют гликолитические ферменты, соответственно 6-фосфофруктокиназа I (продукт гена *pfkA*) и фруктозобисфосфатальдолаза (продукт гена *fbaA*) [133]. Возможно, использование этих ферментов откроет новые подходы к увеличению пула Е4Р.

#### АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ИНТЕРМЕДИАТОВ ОБЩЕГО АРОМАТИЧЕСКОГО ПУТИ

##### Образование ДАНР из пирувата и эритрозо-4-фосфата

Как уже упоминалось, в качестве исходных соединений для синтеза триптофана и других ароматических аминокислот служат PEP и Е4Р, в результате конденсации которых образуется ДАНР. Однако PEP в норме активно расходуется при сопряженном транспорте в клетки и фосфорилировании D-глюкозы с помощью PTS. В результате конкуренции между этими процессами снижается выход веществ, образующихся по общему ароматическому пути. Одним из способов устранения этой конкуренции может быть применение фермента, который в качестве субстрата в реакции с Е4Р при синтезе ДАНР использует не PEP, а Pуг [134, 135]. Такой фермент, альдолаза 2-кето-3-деокси-6-фосфогалактоната (KDPGal-альдолаза), в норме осуществляет реакцию обратимого расщепления KDPGal на Pуг и GA3P. Поскольку GA3P имеет определенное структурное сходство с Е4Р, предположили, что этот фермент может катализировать и реакцию образования ДАНР из Е4Р и Pуг. Действительно, было показано, что KDPGal-альдолаза *E. coli* в некоторой степени обладает указанной способностью [134]. Чтобы повысить специфичность этого фермента к Е4Р, кодирующий его ген *dgoA* из *E. coli*, а также ген *dgoA* из *Klebsiella pneumoniae* были клонированы на плаزمиде и подвергнуты направленной лабораторной эволюции за счет двух раундов амплифика-

ции с помощью допускающей ошибки (error-prone) ПЦР [136] и последующей «перетасовки генов» (gene-shuffling) из разных организмов [137]. У штамма *E. coli*, у которого были инактивированы все гены, кодирующие ДАНР-синтазы, отбирали варианты, способные к росту на минимальной среде M9. Оказалось, что два наиболее активных мутантных фермента из *K. pneumoniae* и *E. coli* обладали соответственно четырех- и восьмикратно повышенной способностью синтезировать ДАНР и тридцати- и семикратно сниженной способностью расщеплять KDPGal по сравнению с исходными ферментами [134]. Две аминокислотные замены (V85A, V154F) наряду с несколькими другими присутствовали у этих активных мутантных белков DgoA из обоих организмов.

Работа по направленной эволюции KDPGal-альдолазы была продолжена с привлечением гена *dgoA* из *S. typhimurium* [135]. Повторные манипуляции с применением допускающей ошибки ПЦР и перетасовки генов не дали заметного результата. Тогда осуществили множественный сайт-направленный мутагенез области предполагаемого активного центра ранее улучшенного фермента из *E. coli*. Это привело к созданию варианта (NR8.276-2), который по сравнению с родительским содержал дополнительно одну замену (Y180F) и четыре молчащие мутации. Новый мутантный фермент DgoA характеризовался шестидесятикратным увеличением параметра  $k_{cat}/K_m$  по сравнению с диким типом. Дальнейший мутагенез соответствующего гена не приводил к увеличению активности.

Полученный мутантный фермент DgoA в клетках тестового продуцента с сохраненным PTS-зависимым транспортом глюкозы обеспечивал синтез 19 г/л DHS, что, однако, примерно в 2 раза меньше, чем фермент штамма, несущего мутацию *aroF<sup>tblr</sup>* (40 г/л DHS). При функционирующей PTS у продуцента с *aroF<sup>tblr</sup>* для синтеза DHS доступно в два раза меньше молекул PEP, чем для той же цели молекул Pуг у варианта с мутантным геном *dgoA*. Однако попытки сбалансировать соотношение Pуг и Е4Р за счет повышения экспрессии гена *tktA*, увеличивающего поток к Е4Р, не улучшили ситуацию.

ДАНР-синтаза AroF<sup>tblr</sup> катализирует *необратимую* реакцию конденсации PEP и Е4Р с образованием ДАНР и неорганического фосфата. Мутантная альдолаза KDPGal, напротив, катализирует *обратимую* реакцию конденсации Pуг и Е4Р с образованием ДАНР. Второй фермент общего ароматического пути — ДНҚ-синтаза, кодируемая геном *aroB*, катализирует необратимую конверсию

ДАНР в DHQ. Следовательно, увеличение активности *AroB* должно направить обратимую реакцию альдольной конденсации, катализируемую KDPGal-альдолазой, в сторону образования ДАНР. Тем не менее, усиление экспрессии гена *aroB* также не привело к дальнейшему увеличению синтеза продукта [135]. Несмотря на это использование оптимизированной KDPGal-альдолазы является альтернативным подходом к синтезу ДАНР, при котором в реакции конденсации с Е4Р вместо PEP участвует Pуг. Этот подход в условиях избытка Pуг и дефицита PEP может найти практическое применение.

### Альтернативный путь биосинтеза DHQ

Интересные перспективы для конструирования шикиматного пути открывает использование генов из других организмов, в частности, из архебактерий. Анализ геномов этих микроорганизмов

свидетельствует о том, что у большинства из них отсутствует полноценный ПФП и многие не могут синтезировать Е4Р [138]. Кроме того, у таких архебактерий не оказалось и гомологов ферментов, катализирующих первые две реакции шикиматного пути (ДАНР-синтазы и DHQ-дегидрогеназы) [139, 140].

Как показал White [139], DHQ у *Methanocaldococcus jannaschii* образуется из 6-дезоксиглюкозы (DKFP) и L-аспарат-4-полуальдегида (ASA). При этом промежуточным соединением синтеза DKFP является метилглиоксаль [141], образующийся в результате отщепления фосфата от GA3P (рис. 2). Далее, в реакции конденсации метилглиоксала с дигидроксиацетонфосфатом образуется DKFP. Взаимодействие последнего с ASA приводит к образованию 3,7-дидезокси-D-трео-гепто-2,6-диулозоната (DTHDA). Стадия окислительного дезаминирования и циклизации приводит к синтезу DHQ, который затем под-

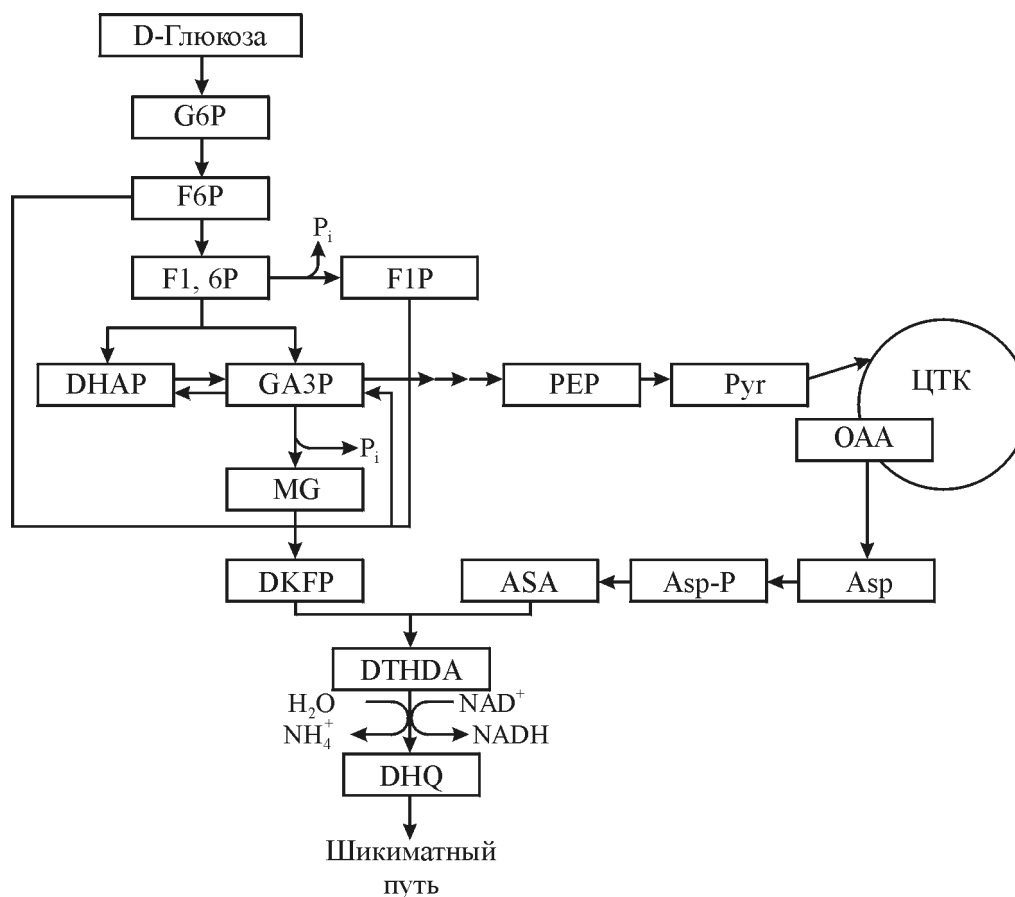


Рис. 2. Формирование DHQ из L-аспаратполуальдегида и дигидроацетонфосфата у архебактерий

Fig. 2. Formation of DHQ from L-aspartate semialdehyde and dihydroacetone phosphate in archaea. D-глюкоза means D-glucose; Шикиматный путь means shikimate pathway; ЦТК means tricarboxylic acid cycle

вергается каноническим изменениям в общем ароматическом пути с образованием хоризмата и всех его производных, включая триптофан. У *M. jannaschii*, а также у другой археобактерии — *Halo-bacterium salinarum* идентифицированы гены ферментов, катализирующих альтернативные реакции биосинтеза DHQ [140, 141]. Экспрессия этих генов в клетках *E. coli*, возможно, позволит создать путь биосинтеза ароматических соединений, в том числе триптофана, не требующий PEP и E4P.

### Формирование шикимата из хинната

В ряде организмов шикимат образуется не через DHS, а через хиннат. В частности, у некоторых растений известен фермент хиннат-гидролизаза, катализирующий превращение хинната в шикимат, минуя стадию образования DHS [142] (рис. 3). Эта реакция у гороха *Pisum sativum* L. не требует наличия кофакторов и катионов двухвалентных металлов. Использование чужеродного фермента, способного вовлечь хиннат в общий ароматический путь, позволит сэкономить NADPH, расходующийся ферментом AroE [142].

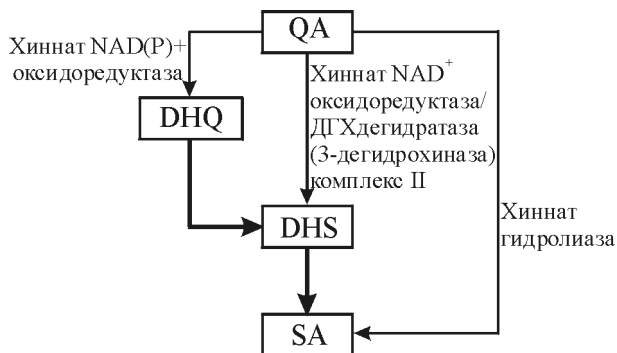
### ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ТРАНСПОРТА ТРИПТОФАНА В КЛЕТКИ И АКТИВАЦИЯ ЕГО ВЫБРОСА ИЗ КЛЕТОК

Целесообразность нарушения транспорта триптофана в клетки при создании продуцента впервые была продемонстрирована на примере штамма *C. glutamicum* [143]. Мутанты, у которых скорость включения меченого триптофана была снижена, более эффективно продуцировали его во второй половине ферментации и накапливали в среде на 10—20% больше аминокислоты, чем исходный штамм. Как полагали авторы этой работы, нарушение транспорта триптофана снижает его обратное поступление в клетки и тем самым его

внутриклеточную концентрацию, что уменьшает (по факту неполностью устраненное) ретроингибирование ферментов, обеспечивающих его биосинтез.

Инактивацию всех генов *E. coli*, контролирующих транспорт триптофана, без детального анализа эффекта на продукцию аминокислоты впервые осуществили авторы уже упоминавшегося патента [50]. Таких генов у *E. coli* три: *mtr*, *tnaB*, и *aroP*. Они кодируют специфичные для этой аминокислоты системы транспорта Mtr (высокоафинную,  $K_m \sim 3$  мкМ) и TnaB (низкоафинную,  $K_m \sim 70$  мкМ), состоящие из ферментов семейства HAAAP (hydroxy/aromatic amino acid permease), а также общую для ароматических аминокислот систему транспорта AroP из близкого семейства APC (amino acid-polyamine-organocation), соответственно.

В последние годы вышла серия работ китайских авторов, посвященных изучению влияния инактивации генов транспортеров триптофана на физиологию рекомбинантных штаммов на основе *E. coli* и эффективность продукции этой аминокислоты [144—146]. В наиболее интересном исследовании [144], где роль этих транспортеров изучалась с использованием рационально сконструированного штамма-продуцента, содержащего большое число полезных для сверхсинтеза модификаций (мутации  $\Delta trpR$ ,  $\Delta tnaA$  в хромосоме; гены  $aroG^{fbr}$ ,  $trpE^{fbr}$ ,  $tktA$  на плазмиде) [52], было показано, что основным переносчиком триптофана является TnaB, удаление которого (в результате делеции *tnaB*) на 11% повышало накопление аминокислоты в среде. Мутация *mtr* подавляла рост, но не влияла на накопление триптофана. Рост ингибировался у всех штаммов, несущих комбинацию любых двух мутаций в генах транспортеров, и при этом в среде накапливался ацетат. Значительное накопление этой кислоты (более 8 г/л) при сочетании *mtr* с *aroP* или *tnaB* сопровождалось резким подавлением роста и снижением продукции. Соче-



**Рис. 3.** Реакции вовлечения хинната в общий ароматический путь у растений. Жирными стрелками показана часть общего ароматического пути у *E. coli*. Тонкие стрелки — альтернативные пути синтеза шикимата из хинната

**Fig. 3.** Reaction of shikimate involvement in the common aromatic pathway in plants. Bold arrows indicate the portion of the common aromatic pathway occurring in *E. coli*. Thin arrows mean alternative pathways of the shikimate synthesis from quinnat. *Хиннат-NAD(P)+-оксидоредуктаза* means quinnate-NAD(P)+-oxidoreductase; *ДГХ-дегидратаза* means DHQ-dehydratase; *Хиннатгидролизаза* means quinnate hydrolyase; *3-дегидрохиназа* means 3-dehydroquinase; *комплекс II* means complex II

тание *tnaB* с *aroP* обеспечивало наибольшие (на 32%) увеличение накопления триптофана и продуктивность клеток, поскольку сопровождалось почти двукратным уменьшением оптической плотности. Примечательно, что сочетание всех трех мутаций не только восстанавливало, но и улучшало рост клеток и на 51% увеличивало накопление аминокислоты по сравнению с исходным штаммом [144]. В цитируемой работе с помощью ПЦР в реальном времени также исследовали, как влияет инактивация транспортеров триптофана на экспрессию генов *gltA*, *zwf* и *pgi*, кодирующих соответственно цитратсинтазу (фермент ЦТК), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (фермент ПФП) и глюкозофосфатизомеразу (фермент пути ЭМП). Оказалось, что экспрессия этих генов у всех транспортных мутантов снижена, причем у двойных мутантов *mtr aroP* и *mtr tnaB* она составляет 0,01—0,08 от уровня исходного штамма, принято за 1. Пытаясь объяснить этот факт, авторы связывают его с тем, что Mtr (а также, видимо, в меньшей степени два других транспортера) наряду с триптофаном перемещает в клетки индол, который является для бактерий сигнальной молекулой. Но поскольку штамм несет делецию в гене *tnaA*, это вещество может появиться только в том случае, если в клетке не хватает серина для биосинтеза триптофана (см. выше). Однако наличие индола в среде в работе не показано. Каким образом нарушение транспорта триптофана и/или индола в клетки влияет на физиологические процессы у *E. coli* еще предстоит выяснить так же, как и ответить на вопрос, почему у тройного мутанта экспрессия указанных генов, особенно *gltA*, в значительной степени восстанавливается.

В работе, где в менее продуктивном штамме инактивировали по отдельности гены *mtr*, *aroP* или *tnaB*, показан положительный эффект на продукцию каждой из модификаций и одновременно обнаружено их негативное влияние на рост [144], что в целом согласуется с данными других авторов [145].

Как уже отмечалось, триптофан является гидрофобной аминокислотой, а потому он способен эффективно диффундировать через богатые липидами мембраны, в том числе через цитоплазматическую мембрану клетки [147]. В связи с этим, а также учитывая строгую регуляцию его биосинтеза, предполагалось, что в клетках не существует специальной системы для его экспорта [148]. Однако целенаправленная проверка влияния амплификации генов, кодирующих гомологи известных транспортеров аминокислот, на устойчивость к ингибирующим рост клеток концентрациям аро-

матических аминокислот и их аналогов привела к обнаружению кандидатов на эту функцию. Оказалось, что гены *yddG* и *yedA*, кодирующие белки надсемейства DMT (drug/metabolite transporter), к которым принадлежит экспортер гомосерина и треонина RhtA [149], при клонировании их в многокопийных векторах и других способах усиления экспрессии повышали устойчивость к фенилаланину, его аналогам — DL-*p*-фторфенилаланину, DL-*o*-фторфенилаланину — а также к DL-5-фтортриптофану [150—152]. В этих и ряде последующих работ [153, 154] показано увеличение продукции триптофана, а также фенилаланина и тирозина при активации указанных генов экспортеров [155].

Продукты генов *yddG* и *yedA*, белки YddG и YedA, являются вторичными переносчиками, осуществляющими активный транспорт (экспорт) ароматических аминокислот из клеток *E. coli*. В отличие от диффузии этот процесс значительно ускоряет вывод триптофана и может осуществляться против градиента концентрации, что особенно важно, когда аминокислота уже накопилась в среде в большом количестве. С другой стороны, снижение внутриклеточной концентрации триптофана [152, 153] создает дополнительные преимущества для синтеза целевого метаболита: равновесие реакций биосинтеза сдвигается в сторону образования конечного продукта и не происходит ингибирования им чувствительных ферментов. В условиях сверхсинтеза при отсутствии активного экспорта высокая внутриклеточная концентрация этой гидрофобной аминокислоты может нарушать физиологию клетки, индуцируя защитные реакции — стрессы, которые ухудшают продуктивность, поскольку на них отвлекаются ресурсы клетки [156]. Кроме того, возможно, что именно в этих условиях образуются токсичные модифицированные производные триптофана ([66], см. ниже).

Вероятно, функция экспорта ароматических аминокислот из клетки не является для YddG и YedA основной или единственной, поскольку избыточного образования и накопления этих аминокислот в клетках *E. coli* дикого типа не происходит из-за наличия многочисленных механизмов генетической и метаболической регуляции (см. выше). Эти белки, как и другие транспортеры, выводящие аминокислоты из клеток *E. coli*, могут обладать достаточно широкой субстратной специфичностью [149]. В частности, известно, что ортолог YddG у *S. enterica* sv. *typhimurium* совместно с порином OmpD выводит из клеток метилвионоген (паракват) [157].



Следует отметить, что кроме YddG и YedA у *E. coli* существуют и другие транспортеры, способные обеспечивать экспорт триптофана. На это указывает тот факт, что хотя усиление экспрессии генов *yddG* и *yedA* на 50% снижало внутриклеточную концентрацию триптофана, их инактивация не влияла на его содержание в клетках в условиях повышенного образования из добавленного в среду дипептида Ala-Trp [153].

Из гетерологичных белков, которые могли бы быть использованы для активации экспорта триптофана, интересно упомянуть пластидный катионный транспортер аминокислот PnpCAT из растения *Petunia hybrida*. Будучи экспрессированным в клетках *E. coli*, он, судя по результатам опыта с мечеными  $^{14}\text{C}$ -фенилаланином,  $^{14}\text{C}$ -тирозином и  $^{14}\text{C}$ -триптофаном, экспортирует из клеток все три ароматические аминокислоты [158].

#### ПОДАВЛЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

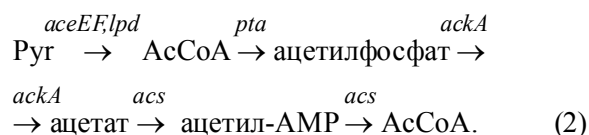
В работе по созданию высокопродуктивных штаммов-продуцентов необходимо ограничить образование побочных веществ, часто уменьшающих синтез целевого продукта, усложняющих процесс его выделения и дальнейшей очистки, к тому же отвлекающих поток углерода на образование ненужных для практики соединений, некоторые из которых при накоплении могут ингибировать рост клеток.

Как уже отмечалось, образующийся в шикиматном пути хоризмат расходуется на биосинтез всех ароматических аминокислот. Поэтому для устранения оттока хоризмата на образование фенилаланина и тирозина при создании продуцента триптофана инактивировали гены *pheA* и *tyrA* [43, 46, 146].

Серьезной проблемой при промышленном культивировании штаммов *E. coli*, в том числе продуцентов триптофана, является образование ими на средах с глюкозой значительного количества ацетата, который снижает конверсию моносахарида в целевой продукт и угнетает рост клеток [159]. Ацетат, как и другие слабые органические кислоты, в протонированной форме легко проникает через цитоплазматическую мембрану клетки. Там происходит его диссоциация на  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  и  $\text{H}^+$ , ведущая к снижению внутриклеточного pH [160] и подавлению метаболизма из-за дестабилизации чувствительных белков (см. ниже). Это подавление связано также с тем, что происходит замещение глутамата и других физиологически активных анионов клетки на анион ацетата [161].

Выделение клетками ацетата, в который может превращаться до 15% глюкозы, связывают с потребностями в регенерации  $\text{NAD}^+$ , который расходуется в процессе гликолиза и в рециклизации коэнзима А (CoASH), необходимого для превращения Pyp в AcCoA. Поскольку окисление AcCoA до  $\text{CO}_2$  и высвобождение CoASH осуществляется в ЦТК, образование ацетата происходит в случаях, когда поток углерода через гликолиз превосходит возможность его утилизации в ЦТК [162]. Последнее обстоятельство создает в клетках состояние так называемого избыточного метаболизма (overflow metabolism).

В опытах, где использовался хемостат с регулируемой скоростью протока (задающего скорость роста клеток) и применялись подходы системной биологии, было обнаружено, что накопление ацетата является результатом катаболитной репрессии ацетил-СоА-синтетазы (Acs), которая происходит в условиях быстрого роста и, соответственно, быстрого потребления глюкозы [163]. Как полагают авторы работы, в клетках *E. coli* постоянно функционирует цикл образования и превращения ацетата (PTA-ACS). В этом цикле AcCoA, продукт превращения пирувата, катализируемого пируват-дегидрогеназным комплексом (кодируют гены *aceEF*, *lpd*), под воздействием фосфотрансацилазы (кодирует ген *pta*) превращается в ацетилфосфат, из которого при посредстве ацетаткиназы (кодирует ген *ackA*) и образуется ацетат, который, в свою очередь, может снова превращаться в AcCoA в реакциях, катализируемых ацетил-СоА-синтетазой (ген *acs*):



Цикл PTA-ACS обеспечивает клетки ацетилфосфатом, который необходим для осуществления целого ряда важных физиологических процессов — функционирования шаперонов, протеолиза, хемотаксиса и др. [162], а также посттрансляционного ацетилирования различных белков [164]. Ацетат же накапливается в среде тогда, когда его обратное превращение в AcCoA подавлено.

Установлено, что угнетение роста, вызванное ацетатом, снимается при добавлении в среду метионина. Это связано с тем, что слабые органические кислоты подавляют активность ферментов, обеспечивающих превращение гомоцистеина в метионин [165]. Дальнейшие исследования показали, что ацетат снижает активность кобаламин-независимой гомоцистеинтрансметилазы

(метионинсинтазы) MetE [166], а также первого фермента пути биосинтеза метионина — гомосеринтрансукцинилазы (MetA) [167]. Оба эти фермента обнаруживают особую чувствительность к ряду стрессоров и выполняют роль «метаболического предохранителя», блокирующего синтез белка в условиях, ведущих к его дестабилизации и образованию токсичных для клетки белковых агрегатов [167].

Чтобы предотвратить образование ацетата при культивировании продуцентов триптофана, удаляли ген *pta* [154, 168], ген *ackA* или ген *tdcD* (кодирует пропионат-ацетаткиназу), а также оба гена *ackA* и *tdcD* [169]. Инактивация одновременно двух этих генов была более эффективной, чем делеции отдельно каждого из них. Этот эффект представляется необычным, поскольку экспрессия *tdcD*, входящего в *tdc*-оперон деградации треонина, осуществляется только в анаэробных условиях и подвержена катаболитной репрессии [170]. Анализ метаболических потоков показал, что у двойного мутанта поток углерода через путь ЭМП на 8,37% ниже, а через ПФП — на 57% выше, чем у исходного штамма. В итоге по сравнению с исходным штаммом у продуцента с делециями генов *ackA* и *tdcD* на 22% уменьшилось накопление ацетата, а продукция триптофана и конверсия глюкозы в целевой продукт возросли на 10,9% (до 47,9 г/л) и 8,16% (до 21,2%), соответственно. Следует отметить, что все штаммы, мутантные по генам *pta*, *ackA* и *tdcD*, в начальной фазе культивирования росли медленнее, чем исходный штамм, хотя в дальнейшем их рост превосходил рост последнего, поскольку они накапливали меньше ацетата. В процессе культивирования эти штаммы выделяли в среду пируват и лактат, которые к концу ферментации практически полностью усваивались [154, 169].

Другой подход, который применялся при конструировании продуцента треонина — это возврат ацетата в состав АсСоА путем повышения уровня Асс за счет экспрессии гена *acs* с конститутивного промотора [171].

Уровень синтеза ацетата может быть снижен путем уменьшения скорости поступления глюкозы в клетки за счет мутации в гене *ptsG* [172]. Увеличение активности ЦТК, либо глиоксилатного шунта также уменьшает продукцию ацетата [173].

Наконец, с накоплением ацетата можно бороться технологическими приемами. Так, поддержание в процессе культивирования концентрации глюкозы и кислорода ниже порога возникновения состояния «избыточного метаболизма» позволило уменьшить образование ацетата, увеличить

концентрацию клеток и накопление триптофана рекомбинантным продуцентом *E. coli* [159].

#### МИНОРНЫЕ ТОКСИЧНЫЕ ПРИМЕСИ В ПРЕПАРАТАХ ТРИПТОФАНА

Производство триптофана иногда сопровождалось образованием небольшого количества ядовитых соединений, которые могли попасть в конечный продукт. В США в период с 1980 г. триптофан широко применялся населением в качестве лекарственного препарата при депрессии, а также как успокаивающее и снотворное средство. Но в 1989 г. японская химическая компания Showa Denko выпустила препарат триптофана, содержащий смертельно опасные примеси. Его применение вызывало синдром эозинофилии-миалгии (Eosinophilia-Myalgia Syndrome, или EMS) с летальным исходом для некоторых пациентов [66]. Появление токсичных примесей, как показало расследование, было связано с осуществленными в производстве двумя изменениями: использованием нового более продуктивного штамма (*B. amyloliquefaciens* strain V) и уменьшением количества активированного угля наполовину по сравнению со стандартной схемой очистки конечного продукта [174]. Токсичность триптофана связали с присутствием в нем таких соединений, как димер триптофана 1,1'-этилиден-бис[L-триптофан] (ЕВТ) и 3-(феналамино)-L-аланин (РАА) [66]. Причины появления этих примесей остаются непонятными. Следует отметить, что опасный препарат содержал 99,65% триптофана при допустимой чистоте 98,5%. В связи с возникшей вспышкой EMS — всего заболело 1511 человек, из которых 37 умерли — Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration) запретило использовать триптофан, получаемый микробиологическим синтезом, в пищевых добавках для человека. Этот запрет просуществовал 10 лет и был отменен с оговоркой в 2001 г. [175]. Инцидент послужил для конкурентов поводом к дискредитации через СМИ генетической инженерии и продуктов, получаемых с ее применением.

Другой гетероциклический амин, 5-амино-6-гидрокси-8Н-бензо[6,7]азепино[5,4,3-де]хинолин-7-он (АВАQ), образуется в результате реакции Мэйларда при физиологических температурах и рН из триптофана и D-глюкозы [176]. АВАQ является сильным мутагеном для штаммов *Salmonella* и обладает генотоксичным действием [176].

Таким образом, при производстве триптофана любое существенное изменение в технологии

должно сопровождаться новым исследованием безопасности продукта, причем необходимо проверить не только степень его чистоты, но и наличие в нем ЕВТ, РАА и АВАQ, используя адекватные методы определения токсичности и мутагенности.

Следует иметь в виду, что различные вредные производные могут появляться в организме при избыточном потреблении триптофана [177]. Кроме того, они могут накапливаться в пищевых продуктах при использовании определенных технологий их изготовления, в частности, при добавлении нитритов [178].

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЬЮТЕРНЫХ МЕТОДОВ ПЛАНИРОВАНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ГЕНОМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТА ТРИПТОФАНА

С развитием подходов метаболической инженерии стали доступными и продолжают развиваться вычислительные методы планирования модификаций генома.

К настоящему времени для оценки метаболического потенциала клетки разработан метод моделирования и анализа метаболических потоков (Flux Balance Analysis, FBA), имеющий ряд алгоритмов, позволяющих теоретически оценивать потенциальные метаболические потоки как в исходных штаммах (дикого типа), так и во вновь полученных генетически модифицированных штаммах-продуцентах [179, 180].

Созданы компьютерные программы, с помощью которых можно обнаружить в том числе и нетривиальные решения для оптимизации потоков к целевому продукту. Наибольшее распространение получили работы на основе двухуровневой системы планирования делеций OptKnock [181]. Позднее она была расширена до OptReg [182] с возможностью оптимизации экспрессии генов. Система OptStrain [183] позволяла использовать искусственные пути для осуществления синтеза целевого продукта. В дальнейшем эта программа была усовершенствована до OptForce [184] и далее до K-OptForce [185]. Алгоритм системного моделирования (ensemble modeling) метаболических сетей опирается на набор моделей, учитывающих фенотип, формирующийся после перенаправления метаболических потоков, например в результате изменения уровня экспрессии ферментов. Поэтому этот алгоритм не нуждается в детальных кинетических характеристиках [186]. Алгоритм GDLS (Genetic Design through Local Search), позволяющий осуществлять локальный поиск множества путей, был использован для дизайна продуцентов ацетата и сукцината на основе *E. coli* [187]. На-

конец, программа RobOKoD (Robust, Overexpression, Knockout and Dampening) позволяет при создании продуцентов идентифицировать реакции, которые надо устранить, усилить или ослабить применительно к конкретным условиям и штамму [188].

Систему OptKnock использовали для моделирования продуцента хоризмата как предшественника ароматических аминокислот [189, 190]. Программа идентифицировала шесть делеций, необходимых для перенаправления потока углерода к хоризмату. Реакции, катализируемые трансальдозазой В (ген *talB*) и PEP-карбоксилазой (ген *ppc*), участвующие в расходовании Е4Р и PEP, соответственно, были выбраны программой OptKnock в качестве мишеней для устранения. Инактивация гена *ppc* является известным приемом увеличения пула PEP [111]. Однако в том, что касается *talB*, решение кажется необычным, поскольку описаны подходы, которые, напротив, увеличивают экспрессию этого гена с целью повышения синтеза Е4Р и усиления потока через общий ароматический путь [126, 127, 191]. Другой интересной модификацией генома, обнаруженной с помощью OptKnock, является делеция гена *pgl*, кодирующего 6-фосфоглюконолактоназу. По мнению авторов, эта мутация обладает вместе с делецией гена *talB* синергическим действием при направлении потока на образование Е4Р [189, 190]. В этой стратегии поток через оксидативную ветвь ПФП полностью блокирован. Другие три делеции — гена пируватоксидазы (*pox*), гена пируватдегидрогеназы (*lpdA*) и гена пируватформатлиазы (*pfl*) были нацелены на сохранение пула PEP. Однако усиление экспрессии гена фосфоенолпируватсинтазы (*pps*), вовлеченного в обеспечение реакции образования PEP из PEP, которое является традиционной стратегией увеличения пула PEP, данной системой не описано из-за ограниченный алгоритм OptKnock, вычисляющего только делеции. По этой же причине инактивация PTS-системы, потребляющей около 50% всего PEP [106], которую целесообразно осуществлять только с одновременной активацией PEP-независимого транспорта глюкозы в сочетании с увеличенной экспрессией Glk (см. выше), также не указана в ряду рекомендованных стратегий.

Таким образом, несмотря на имеющиеся ограничения, создаваемые и совершенствуемые биоинформационные вычислительные алгоритмы и программы оптимизации путей биосинтеза могут быть существенным подспорьем при метаболической инженерии продуцентов ароматических соединений и, в частности, триптофана.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУЦЕНТОВ ТРИПТОФАНА ЗА СЧЕТ УЛУЧШЕНИЯ ИХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Хотя промышленную ферментацию стремятся осуществлять в оптимальных для роста бактерий условиях, само по себе выращивание их в ферментере неизбежно связано с действием негативных факторов. Это высокая концентрация субстрата и продукта, а также побочных продуктов, в том числе, ацетата (см. выше), высокое содержание растворенных частиц (осмолярность), повышенная температура, образование активных форм кислорода (АФК), особенно при дополнительном внесении кислорода в процессе аэрации, а также градиент гидростатического давления вдоль оси ферментера, создающий постоянные колебания в концентрации кислорода. Все эти факторы вызывают стрессы, которые отвлекают клеточные ресурсы на адаптацию, снижают скорость синтеза целевого продукта и конечный его выход. Таким образом, улучшение технологических характеристик продуцентов — это, главным образом, внесение генетических модификаций, которые предупреждают стрессы или придают штаммам «устойчивость к стрессам» [31].

#### Повышение устойчивости штаммов к высокой осмолярности и кислотности среды

Высокая осмолярность среды, обусловленная высокой концентрацией молекул и ионов растворенных в ней веществ, снижает продуктивность и может приводить к гибели клеток. Бактерии способны адаптироваться к этому стрессовому фактору благодаря транспорту в клетки или синтезу так называемых осмолитов — органических соединений, уравнивающих осмотическое давление, присутствие которых в клетке совместимо с нормальным функционированием белков, нуклеиновых кислот и мембран. Такими веществами являются трегалоза, глицинбетаин, пролин, эктоин и др. [192, 193]. Указанные соединения-осмопротекторы обычно действуют и как «химические шапероны»; они (часто совместно с молекулярными шаперонами) способствуют правильному фолдингу белков и препятствуют их развертыванию и агрегации при воздействии дестабилизирующих факторов [194, 195].

Один из путей повышения устойчивости продуцентов к осмотическому стрессу — это увеличение синтеза собственных осмопротекторов.

Так, устойчивые к 3,4-дегидро-DL-пролину мутанты продуцента инозина, способные к сверхсинтезу пролина, продуцировали больше инозина, чем исходные штаммы [196]. Очевидно, это связано с их большей резистентностью к высокой осмолярности ферментационной среды. Возможно также, что возникающий при этом избыток в клетках пролина, который может затем окисляться до глутамата, обуславливает повышение их устойчивости и к окислительному стрессу (см. ниже). Это явление может объясняться тем, что при катаболизме пролина активируется каталаза-пероксидаза I, которая превращает перекись водорода в воду и кислород [197].

Повышенная устойчивость к высокой осмолярности наблюдалась и у штамма *E. coli*, продуцирующего больше трегалозы за счет введения в геном дополнительной копии генов *otsBA*, контролирующих биосинтез этого дисахарида [198]. С той же целью можно вводить в геном *E. coli* чужеродные гены, обеспечивающие синтез таких осмопротекторов, как глицинбетаин [199], эктоин [200, 201], полибетагидроксибутират (РНВ) [202] и др. РНВ — это запасное соединение, которое образуется в клетках ряда бактерий в условиях избытка источника углерода и катаболизируется в условиях голодания. Экспрессия у *E. coli* генов, контролирующих синтез этого соединения, повышает устойчивость бактерий к ряду стрессоров, в том числе, к высокой осмолярности, т.е. РНВ ведет себя как осмолит [202]. Биосинтез РНВ в клетках продуцента триптофана увеличивает накопление этой аминокислоты [203].

Для уменьшения дополнительной нагрузки на клеточный метаболизм как собственные, так и чужеродные гены, контролирующие синтез осмолитов, целесообразно экспрессировать под контролем промоторов, индуцируемых стрессорами. Однако даже такая экспрессия не устраняет полностью расходование ресурсов клетки на адаптацию к неблагоприятному воздействию. Поэтому представляют интерес подходы, связанные с инактивацией генов, позволяющие в некоторых случаях избегать этих затрат. Например, были получены мутанты штаммов *E. coli* W и *E. coli* B, которые при инсерции в хромосому транспозона Tn5 или делеции определенных генов приобретали способность к эффективному росту в присутствии негативных факторов, возникающих в процессе промышленной ферментации: высокой осмолярности (0,4—0,6 М NaCl), снижении pH среды (до 5,5), добавлении в среду ацетата Na (15 г/л), а также при комбинации этих факторов (pH 5,5 + 0,4 М NaCl; 5 г/л ацетата Na + 0,4 М NaCl). Среди про-

чих у этих вариантов идентифицированы следующие мутации: *ΔproV*, которая затрагивает ген, кодирующий компонент системы транспорта пролина и глицинбетаина; *ΔackA*, которая, как уже упоминалось, кодирует ацетаткиназу; *ΔyobF*, *ΔyugA* и *ΔusiW*, кодирующие белки с неизвестной функцией. Интересно, что значительная часть идентифицированных мутаций затрагивает регуляторные гены или гены, так или иначе участвующие в передаче регуляторных сигналов: *nagC*, *evgA*, *evgS*, *rcsB*, *typA*, и *ptsP*. Таким образом, инактивация некоторых регуляторных генов может явиться перспективным подходом к приданию штаммам повышенной устойчивости к стрессорам. Возможно, что происходящее при этом изменение транскриптома и протеома клетки не столь драматичны, как при самом стрессе [156]. Следует отметить, что комбинации некоторых из упомянутых выше мутаций давали синергический эффект: например, *ΔevgA + yobF::kan* обеспечивали более высокий уровень устойчивости к pH 5,5 + 0,4 M NaCl, чем каждая мутация в отдельности [31].

### Предупреждение окислительного стресса

Как известно, окислительный стресс — это состояние клетки, при котором нарушается баланс между образованием АФК и ее антиоксидантной системой, функционирующей на базальном уровне. К АФК относятся образующиеся в клетках в результате дыхательной активности и аэробного метаболизма супероксиды и перекиси, которые могут повреждать белки, ДНК и липиды клеточных мембран, подавляя метаболизм и рост бактерий [204]. Предупреждать окислительный стресс у продуцентов триптофана особенно целесообразно, поскольку к ферментам, в первую очередь подверженным инактивации супероксидами, относится транскетолаза [205], которая обеспечивает образование одного из предшественников ароматических аминокислот — E4P (см. выше) [152].

При окислительном стрессе активируются глобальные регуляторы — OxyR, SoxRS, а также RpoS [206]. OxyR и SoxR, будучи окисленными под воздействием соответственно перекиси водорода и супероксидных радикалов, претерпевают конформационную модификацию и изменяют экспрессию множества генов своих регулонов. При этом OxyR репрессирует 10 генов и активирует экспрессию 28 генов. Среди последних — гены, продукты которых обеспечивают защиту клетки от токсичного действия перекиси водорода, атомарного кислорода, некоторых других вредных факто-

ров, и гены, исправляющие вызванные ими повреждения. Примером могут служить ген *katG*, кодирующий каталазу-пероксидазу I, ген *gorA* — глутатион-редуктазу, ген *grxA* — глутаредоксин, ген *ahpCF* — алкилпероксид-NADPH-оксидоредуктазу, ген *fur* — регулятор включения железа в клетки.

SoxRS формируют двухступенчатую систему контроля экспрессии более 100 генов, некоторые из которых непосредственно обеспечивают защиту от повреждающего действия супероксидов. Прежде всего, это ген *sodA*, кодирующий марганец-содержащую супероксиддисмутазу, катализирующую распад супероксида на кислород и перекись водорода, которая затем разлагается каталазой-пероксидазой I [206].

У *E. coli* имеется еще один ген, *sodB*, кодирующий железо-содержащую супероксиддисмутазу, в регуляции экспрессии которого участвует белок, кодируемый геном *fur* [207].

Для придания штаммам-продуцентам устойчивости к окислительному стрессу, который особенно вероятен при аэрации, обогащенной кислородом, можно вводить мутации в OxyR и SoxR, обеспечивающие конститутивную экспрессию соответствующих регулонов [206]. Однако возможно, что для этого достаточно повысить уровень экспрессии отдельных генов, продукты которых обеспечивают защиту от перекиси и супероксидов, например *katG* и *sodA*, или *sodB*.

Еще один подход, обеспечивающий повышение устойчивости к окислительному стрессу, — это сверхэкспрессия генов, кодирующих шапероны или шапероноподобные белки, которые защищают чувствительные ферменты от повреждающего действия супероксидов и/или восстанавливают их активность. Например, сверхэкспрессия гена *yajL*, продукт которого защищает клетки от индуцируемой окислительным стрессом агрегации белков [208], повышает продукцию ряда аминокислот, в том числе фенилаланина и триптофана [209]. Следует отметить, что сверхэкспрессия генов, кодирующих шапероны, может быть полезной и при воздействии других стрессоров, дестабилизирующих нормальную структуру белков.

### Обеспечение стабильной продукции в условиях неоднородности концентраций растворенного кислорода и углекислого газа в биореакторе

В промышленных условиях культивирования клеток растворимость кислорода и углекисло-

го газа изменяется из-за градиента гидростатического давления вдоль оси ферментера. Например, в ферментере с высотой жидкости 10 м растворимость газа ( $O_2$  или  $CO_2$ ) на дне аппарата на 70% выше, чем в верхней части [210]. Это приводит к возникновению флуктуирующего локального дефицита растворенного кислорода [211]. При этом регуляторные механизмы каждый раз активируют или репрессируют ключевые ферменты, подготавливая клетки к аэробным или анаэробным условиям [212], что сопровождается усилением синтеза побочных продуктов (ацетата, пирувата, лактата и др.), замедлением роста и снижением продуктивности клеток. Кроме того, увеличение концентрации растворенного кислорода, пусть даже транзиторное, может индуцировать окислительный стресс [213].

Одним из подходов, позволяющих улучшить ситуацию, может быть введение в клетки штамма-продуцента гена *vhb*, кодирующего бактериальный гемоглобин из *Vitreoscilla* (VHb). Этот ген, экспрессируемый в клетках *E. coli* с собственного промотора, индуцируется в условиях гипоксии, и содержание VHb при этом увеличивается в 50 раз [214]. Как и другие гемоглобины VHb может связывать и высвобождать кислород в зависимости от его концентрации в окружающей среде. При этом он может непосредственно взаимодействовать с терминальными оксидазами [215]. В условиях флуктуации содержания  $O_2$  это обеспечивает буферный эффект, уменьшает отрицательные последствия гипоксии на синтез белка, рост и образование побочных соединений и увеличивает продуктивность [216, 217]. Экспрессия *vhb* представляется целесообразной при конструировании продуцентов триптофана и других ароматических соединений, поскольку способствует перераспределению потока углерода в ПФП, который обеспечивает синтез их общего предшественника — E4P [218].

Еще один важный эффект, сопровождающий экспрессию *vhb* в клетках *E. coli*, — это повышение их устойчивости к окислительному стрессу [214]. Данное явление связано с тем, что в условиях стресса VHb взаимодействует с OxyR и переводит его в окисленную форму, активирующую транскрипцию OxyR-регулона. При этом окисленный OxyR действует как негативный регулятор транскрипции гена *vhb*. Он связывается с его регуляторной областью, перекрывая сайты присоединения глобальных регуляторов Fnr и Crp, о которых известно, что они активируют транскрипцию *vhb* при гипоксии [214], и ограничивает дальнейший синтез VHb в условиях образования АФК.

Экспрессия гена *vhb* с оптимизированными для *E. coli* кодонами в клетках продуцента триптофана под контролем собственного промотора улучшила рост культуры при пониженной аэрации на 16%. Накопление аминокислоты в этих условиях выросло по сравнению с контрольным штаммом на 21% [219].

Таким образом, в настоящее время имеется большой объем данных о реакции клеток *E. coli* — продуцентов триптофана на воздействие различных стрессоров, с которыми они встречаются в процессе промышленного культивирования, а также о возможных подходах, позволяющих повысить устойчивость бактерий к этим воздействиям.

Итак, незаменимая аминокислота триптофан выполняет в организме человека и животных множество важных функций, а потому представляет постоянно растущий интерес для медицины и сельского хозяйства. Основные этапы конструирования штаммов-продуцентов триптофана на основе *E. coli* в настоящее время включают выбор и/или создание оптимального исходного штамма, блокирование катаболизма триптофана и последовательное внесение в геном модификаций, устраняющих узкие места в шикиматном и триптофановом путях биосинтеза. Требуются также модификации, обеспечивающие эти пути необходимыми предшественниками: PEP и E4P, серином, глутамином и PRPP. Целесообразно блокирование системы транспорта триптофана в клетки и усиление экспрессии генов, обеспечивающих его активное выведение из клеток, что снижает внутриклеточную концентрацию аминокислоты. Полезно также ограничение образования побочных продуктов — других ароматических аминокислот и ацетата.

Перспективы дальнейшего совершенствования продуцентов триптофана для повышения их продуктивности и улучшения технологических свойств связаны с применением всего арсенала подходов системной метаболической инженерии. Это и использование генов из растений, у которых до 30% фиксируемого углерода направляется на синтез ароматических соединений, и включение альтернативных путей образования предшественников. Для оптимизации технологических характеристик продуцентов целесообразно осуществление генетических модификаций, которые предупреждают реакции клеток на возникающие в процессе ферментации стрессоры (высокая осмолярность, изменения pH, колебания концентрации растворенного кислорода и появление активных форм кислорода) или придают устойчивость к ним. При этом следует ограничить реакции, свя-

занные с отвлечением ресурсов клетки на реализацию глобальных преобразований транскриптома и протеома клетки в ответ на стрессы, и тем самым уменьшить негативное влияние стресс-факторов на продукцию триптофана.

Дальнейшее совершенствование штаммов-продуцентов позволит снизить себестоимость производимого триптофана и сделает его более доступным для потребителей, что расширит сферу его применения.

Получено 17.03.16

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bogatyreva, N.S. Trend of amino acid composition of proteins of different taxa / N.S. Bogatyreva, A.V. Finkelstein, O.V. Galzitskaya // J. Bioinform. Comput. Biol. — 2006. — V. 4. — N. 2. — P. 597—608.
2. Smith, C.R. Seed protein sources — Amino acid composition and total protein content of various plant seeds / C.R. Smith, M.C. Shekleton, I.A. Wolff, Q. Jones // Economic Botany. — 1959. — V. 13. — N. 2. — P. 132—150.
3. Wu, G. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond / G. Wu, F.W. Bazer, Z. Dai, D. Li, J. Wang, Z. Wu // Annu. Rev. Anim. Biosci. — 2014. — V. 2. — P. 387—417.
4. Fernstrom, J.D. Effects and side effects associated with the non-nutritional use of tryptophan by humans // J. Nutr. — 2012. — V. 142. — N. 12. — P. 2236S—2244S.
5. Le Floc'h, N. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications / N. Le Floc'h, W. Otten, E. Merlot // Amino Acids. — 2011. — V. 41. — N. 5. — P. 1195—1205.
6. Yao, K. Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health / K. Yao, J. Fang, Y.L. Yin, Z.M. Feng, Z.R. Tang, G. Wu // Front Biosci. (Schol Ed.). — 2011. — V. 3. — P. 286—297.
7. Sandyk, R. L-Tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review // Int. J. Neurosci. — 1992. — V. 67. — N. 1—4. — P. 127—144.
8. Richard, D.M. L-Tryptophan: basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications / D.M. Richard, M.A. Dawes, C.W. Mathias, A. Acheson, N. Hill-Kaputczak, D.M. Dougherty // Int. J. Tryptophan Res. — 2009. — V. 2. — P. 45—60.
9. Yarandi, S.S. Amino acid composition in parenteral nutrition: what is the evidence? / S.S. Yarandi, V.M. Zhao, G. Hebbbar, T.R. Ziegler // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. — 2011. — V. 14. — N. 1. — P. 75—82.
10. Porter, R.J. Tryptophan and tyrosine availability and response to antidepressant treatment in major depression / R.J. Porter, R.T. Mulder, P.R. Joyce, S.E. Luty // J. Affect. Disord. — 2005. — V. 86. — N. 2—3. — P. 129—134.
11. Rodrigues, A.L. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein / A.L. Rodrigues, N. Trachtmann, J. Becker, A.F. Lohanatha, J. Blotenberg, C.J. Bolten, C. Korneli, A.O. de Souza Lima, L.M. Porto, G.A. Sprenger, C. Wittmann // Metab. Eng. — 2013. — V. 20. — P. 29—41.
12. <http://www.la-press.com/international-journal-of-tryptophan-research-j97>
13. Engin, A. Tryptophan metabolism: implications for biological processes, health and diseases, molecular and integrative toxicology [Ed. A.B.Engin]. — Switzerland: Springer International Publishing, 2015. — 377 p.
14. Becker, J. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production — the heartbeat of industrial strain development / J. Becker, C. Wittmann // Curr. Opin. Biotechnol. — 2012. — V. 23. — N. 5. — P. 718—726.
15. Lee, J.W. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals / J.W. Lee, D. Na, J.M. Park, J. Lee, S. Choi, S.Y. Lee // Nat. Chem. Biol. — 2012. — V. 8. — N. 6. — P. 536—546.
16. Skretas, G. Combinatorial approaches for inverse metabolic engineering applications / G. Skretas, F.N. Kolisis // Comput. Struct. Biotechnol. J. — 2013. — V. 3. — P. e201210021.
17. Matsuoka, Y. Metabolic regulation in *Escherichia coli* in response to culture environments via global regulators / Y. Matsuoka, K. Shimizu // Biotechnol. J. — 2011. — V. 6. — N. 11. — P. 1330—1341.
18. Дебабов В.Г. Современные подходы к созданию промышленных штаммов микроорганизмов // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 4. — С. 443—455.  
Дебабов, В.Г., Current approaches to creation of industrial microbial strains // Genetika (Genetics). — 2015. — V. 51. — N. 4. — P. 443—455.
19. Ikeda, M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 69. — N. 6. — P. 615—626.
20. Varma, A. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli* / A. Varma, B.W. Boesch, B.O. Palsson // Biotechnol. Bioeng. — 1993. — V. 42. — N. 1. — P. 59—73.
21. Juminaga, D. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli* / D. Juminaga, E.E. Baidoo, A.M. Redding-Johanson, T.S. Batth, H. Burd, A. Mukhopadhyay, C.J. Petzold, J.D. Keasling // Appl. Environ. Microbiol. — 2012. — V. 78. — N. 1. — P. 89—98.
22. Pittard, J., Yang, J. Biosynthesis of the aromatic amino acids // EcoSal Plus. — 2008. — doi:10.1128/ecosalplus.3.6.1.8.
23. Kolisnychenko, V. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome / V. Kolisnychenko, G. Plunkett, 3rd, C.D. Herring, T. Feher, J. Posfai, F.R. Blattner, G. Posfai // Genome Res. — 2002. — V. 12. — N. 4. — P. 640—647.
24. Mizoguchi, H. *Escherichia coli* minimum genome factory / H. Mizoguchi, H. Mori, T. Fujio // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2007. — V. 46. — N. Pt 3. — P. 157—167.
25. Soupene, E. Physiological studies of *Escherichia coli* strain MG1655: growth defects and apparent cross-regulation of gene expression / E. Soupene, W.C. van Heeswijk, J. Plumb-ridge, V. Stewart, D. Bertenthal, H. Lee, G. Prasad, O. Paliy, P. Charemnoppakul, S. Kustu // J. Bacteriol. — 2003. — V. 185. — N. 18. — P. 5611—5626.

26. Бирюкова И.В. Конструирование на основе *E. coli* K-12 MG1655 нового штамма с улучшенными ростовыми характеристиками для экспериментов по метаболической инженерии / И.В. Бирюкова, А.А. Крылов, Е.М. Киселева, Н.И. Минаева, С.В. Машко // Генетика. — 2010. — Т. 46. — № 3. — С. 349—355.
- Biryukova, I.V.*, Construction of a new strain with improved growth characteristics on the basis of *E. coli* for experiments on metabolic engineering / I.V. Biryukova, A.A. Krylov, E.M. Kiseleva, N.I. Minaeva, and S.V. Mashko // *Genetika (Genetics)*. — 2010. — V. 46. — N 3. — P. 349—355.
27. Posfai, G. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli* / G. Posfai, G. Plunkett, 3rd, T. Feher, D. Frisch, G.M. Keil, K. Umenhoffer, V. Kolisnychenko, B. Stahl, S.S. Sharma, M. de Arruda, V. Burland, S.W. Harcum, F.R. Blattner // *Science*. — 2006. — V. 312. — N. 5776. — P. 1044—1046.
28. Phue, J.N. Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses / J.N. Phue, S.B. Noronha, R. Hattacharyya, A.J. Wolfe, J. Shiloach // *Biotechnol. Bioeng.* — 2005. — V. 90. — N. 7. — P. 805—820.
29. Waegeman, H. Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3) / H. Waegeman, J. Beauprez, H. Mogens, J. Maertens, M. De Mey, M.R. Foulquie-Moreno, J.J. Heijnen, D. Charlier, W. Soetaert // *BMC Microbiol.* — 2011. — V. 11. — P. 70.
30. Sabri, S. Molecular control of sucrose utilization in *Escherichia coli* W, an efficient sucrose-utilizing strain / S. Sabri, L.K. Nielsen, C.E. Vickers // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2013. — V. 79. — N. 2. — P. 478—487.
31. Lennen, R.M. Combinatorial strategies for improving multiple-stress resistance in industrially relevant *Escherichia coli* strains / R.M. Lennen, M.J. Herrgard // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2014. — V. 80. — N. 19. — P. 6223—6242.
32. LaCroix, R.A. Use of adaptive laboratory evolution to discover key mutations enabling rapid growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on glucose minimal medium / R.A. LaCroix, T.E. Sandberg, E.J. O'Brien, J. Utrilla, A. Ebrahim, G.I. Guzman, R. Szubin, B.O. Palsson, A.M. Feist // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2015. — V. 81. — N. 1. — P. 17—30.
33. Ju, J.-y., Choi, H., Koh, E.-s., Lee, J.-s., Lee, J.-h., Kim, S.-y., Jin, C.-h., Park, Y.-h. Genetically engineered recombinant *Escherichia coli* producing L-tryptophan having originally L-phenylalanine productivity, and method for producing L-tryptophan using the microorganism // US Patent US 8569066, C 12 N 1/21, C 12 N1 5/09, C 12 P 13/22. 2013.
34. Snell, E.E. Tryptophanase: structure, catalytic activities, and mechanism of action // *Adv. Enz. Relat. Areas Mol. Biol.* — 1975. — V. 42. — P. 287—333.
35. Lee, J.H. Indole as an intercellular signal in microbial communities / J.H. Lee, J. Lee // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2010. — V. 34. — N. 4. — P. 426—444.
36. O'Mahony, S.M. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis / S.M. O'Mahony, G. Clarke, Y.E. Borre, T.G. Dinan, J.F. Cryan // *Behav. Brain Res.* — 2015. — V. 277. — P. 32—48.
37. Yokoyama, M.T. Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole / M.T. Yokoyama, J.R. Carlson // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1979. — V. 32. — N. 1. — P. 173—178.
38. Ochiai, M. Mutagenicities of indole and 30 derivatives after nitrite treatment / M. Ochiai, K. Wakabayashi, T. Sugimura, M. Nagao // *Mutat. Res.* — 1986. — V. 172. — N. 3. — P. 189—197.
39. Li, G. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan / G. Li, K.D. Young // *Microbiology*. — 2013. — V. 159. — Pt. 2. — P. 402—410.
40. Botsford, J.L. Catabolite repression of tryptophanase in *Escherichia coli* / J.L. Botsford, R.D. DeMoss // *J. Bacteriol.* — 1971. — V. 105. — N. 1. — P. 303—312.
41. Konan, K.V. Regulation of the *Escherichia coli* *tna* operon: nascent leader peptide control at the *tnaC* stop codon / K.V. Konan, C. Yanofsky // *J. Bacteriol.* — 1997. — V. 179. — N. 5. — P. 1774—1779.
42. Lim, P.G. Tryptophan- and indole-excreting bacterial mutants / P.G. Lim, R.I. Mateles // *Science*. — 1963. — V. 140. — N. 3565. — P. 388—389.
43. Tribe, D.E. Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation / D.E. Tribe, J. Pittard // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1979. — V. 38. — N. 2. — P. 181—190.
44. Aiba, S. Enhancement of tryptophan production by *Escherichia coli* as an application of genetic engineering / S. Aiba, T. Imanaka, H. Tsunekawa // *Biotechnol. Letters*. — 1980. — V. 2. — N. 12. — P. 525—530.
45. Aiba, S. New approach to tryptophan production by *Escherichia coli*: genetic manipulation of composite plasmids *in vitro* / S. Aiba, H. Tsunekawa, T. Imanaka // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1982. — V. 43. — N. 2. — P. 289—297.
46. Zhao, Z.J. Development of L-tryptophan production strains by defined genetic modification in *Escherichia coli* / Z.J. Zhao, C. Zou, Y.X. Zhu, J. Dai, S. Chen, D. Wu, J. Wu, J. Chen // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — V. 38. — N. 12. — P. 1921—1929.
47. Pabst, M.J. Feedback regulation in the anthranilate aggregate from wild type and mutant strains of *Escherichia coli* / M.J. Pabst, J.C. Kuhn, R.L. Somerville // *J. Biol. Chem.* — 1973. — V. 248. — N. 3. — P. 901—914.
48. Gibson, F. The partial purification and properties of indole-3-glycerol phosphate synthetase from *Escherichia coli* / F. Gibson, C. Yanofsky // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1960. — V. 43. — P. 489—500.
49. Merino, E. Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation / E. Merino, R.A. Jensen, C. Yanofsky // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2008. — V. 11. — N. 2. — P. 78—86.
50. Camakaris, H., Cowan, P., Pittard, J. Production of tryptophan by the bacterium *Escherichia coli* // US Patent US 5756345, C 12 N 1/20, C 12 P 13/22, C 12 N 15/09. 1998.



51. Berry, A. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering // Trends Biotechnol. — 1996. — V. 14. — N. 7. — P. 250—256.
52. Gu, P. One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of L-tryptophan in *Escherichia coli* / P. Gu, F. Yang, J. Kang, Q. Wang, Q. Qi // Microb. Cell. Fact. — 2012. — V. 11. — P. 30.
53. Caligiuri, M.G. Identification of amino acid residues involved in feedback regulation of the anthranilate synthase complex from *Salmonella typhimurium*. Evidence for an amino-terminal regulatory site / M.G. Caligiuri, R. Bauerle // J. Biol. Chem. — 1991. — V. 266. — N. 13. — P. 8328—8335.
54. Wang, H.H. Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE / H.H. Wang, H. Kim, L. Cong, J. Jeong, D. Bang, G.M. Church // Nat. Methods. — 2012. — V. 9. — N. 6. — P. 591—593.
55. Nagahari, K. Control of tryptophan synthetase amplified by varying the numbers of composite plasmids in *Escherichia coli* cells / K. Nagahari, T. Tanaka, F. Hishinuma, M. Kuroda, K. Sakaguchi // Gene. — 1977. — V. 1. — N. 2. — P. 141—152.
56. Azuma, S. Hyper-production of L-tryptophan via fermentation with crystallization / S. Azuma, H. Tsunekawa, M. Okabe, R. Okamoto, S. Aiba // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1993. — V. 39. — N. 4. — P. 471—476.
57. Chase, M.W., Power, S.D., Whited, G.M. Microbial production of 4-,5-,6- and 7-substituted indole and tryptophan analogs via fermentation production // Intern. Patent Application WO 1995034657, C 12 P 17/10, C 12 P 13/22, C 12 N 15/52. 1995.
58. Chan, E.-C. Amplification of the tryptophan operon gene in *Escherichia coli* chromosome to increase L-tryptophan biosynthesis / E.-C. Chan, H.-L. Tsai, S.-L. Chen, D.-G. Mou // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1993. — V. 40. — N. 2—3. — P. 301—305.
59. Ikeda, M. Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway / M. Ikeda, K. Nakanishi, K. Kino, R. Katsumata // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1994. — V. 58. — N. 4. — P. 674—678.
60. Li, Y. Construction of *Escherichia coli* strains producing L-serine from glucose / Y. Li, G.K. Chen, X.W. Tong, H.T. Zhang, X.G. Liu, Y.H. Liu, F.P. Lu // Biotechnol. Lett. — 2012. — V. 34. — N. 8. — P. 1525—1530.
61. Гусятинер М.М., Ивановская Л.В., Леонова Т.В., Муханова Е.И., Ростова Ю.Г., Филиппов Д.В., Чудакова Д.А. Мутантная глутаминсинтетаза, фрагмент ДНК, штамм *Escherichia coli* ? продуцент L-глутамина и способ получения L-аминокислот // Патент РФ RU 2230114, C 12 N 1/21, C 12 N 9/10, C 12 N 15/11. 2004.  
Gusiatiner, M.M., Ivanovskaya, L.V., Leonova, T.V., Mukhanova, E.I., Rostova, Yu.G., Filippov, D.V., and Chudakova, D.A. A mutant glutamine synthase, DNA fragment, *Escherichia coli* strain producing L-glutamine and method for obtaining of L-amino acids // Patent RF RU 2230114, C 12 N 1/21, C 12 N 9/10, C 12 N 15/11. 2004.
62. Hashimoto, S., Tabata, K. Process for producing L-glutamine using *Escherichia coli* with deficient *glnB* and *glnE* function // US Patent US 8211688, C 12 N 1/20, C 12 P 13/14. 2012.
63. Bang, W.G. Production L-tryptophan by *Escherichia coli* cells / W.G. Bang, S. Lang, H. Sahm, F. Wagner // Biotechnol. Bioeng. — 1983. — V. 25. — N. 4. — P. 999—1011.
64. Rodrigues, A.L. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for gram scale production of the antitumor drug deoxyviolacein from glycerol / A.L. Rodrigues, J. Becker, A.O. de Souza Lima, L.M. Porto, C. Wittmann // Biotechnol. Bioeng. — 2014. — V. 111. — N. 11. — P. 2280—2289.
65. Simic, P. Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum* / P. Simic, J. Willuhn, H. Sahm, L. Eggeling // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — V. 68. — N. 7. — P. 3321—3327.
66. Mayeno, A.N. Eosinophilia-myalgia syndrome and tryptophan production: a cautionary tale / A.N. Mayeno, G.J. Gleich // Trends Biotechnol. — 1994. — V. 12. — N. 9. — P. 346—352.
67. Bohm, B.A. Shikimic acid (3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid) // Chem. Rev. — 1965. — V. 65. — P. 435—466.
68. Dewick, P.M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. Medicinal Natural Products. — John Wiley & Sons, Ltd, 2009. — P. 137—186.
69. Herrmann, K.M. The shikimate pathway / K.M. Herrmann, L.M. Weaver // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1999. — V. 50. — P. 473—503.
70. Frost, J.W. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds / J.W. Frost, K.M. Draths // Annu. Rev. Microbiol. — 1995. — V. 49. — P. 557—579.
71. Brown, K.D. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis *Escherichia coli* K12 // Genetics. — 1968. — V. 60. — N. 1. — P. 31—48.
72. Baez-Viveros, J.L. Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli* / J.L. Baez-Viveros, J. Osuna, G. Hernandez-Chavez, X. Soberon, F. Bolivar, G. Gosset // Biotechnol. Bioeng. — 2004. — V. 87. — N. 4. — P. 516—524.
73. Ray, J.M. Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli* / J.M. Ray, C. Yanofsky, R. Bauerle // J. Bacteriol. — 1988. — V. 170. — N. 12. — P. 5500—5506.
74. Weaver, L.M. Cloning of an *aroF* allele encoding a tyrosine-insensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase / L.M. Weaver, K.M. Herrmann // J. Bacteriol. — 1990. — V. 172. — N. 11. — P. 6581—6584.
75. Hu, C. Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli* / C. Hu, P. Jiang, J. Xu, Y. Wu, W. Huang // J. Basic Microbiol. — 2003. — V. 43. — N. 5. — P. 399—406.
76. Jossek, R. Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of *Escherichia coli* / R. Jossek, J. Bongaerts, G.A. Sprenger //

- FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — V. 202. — N. 1. — P. 145—148.
77. Flores, S. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by  $(^{13}\text{C})$  labeling and NMR spectroscopy / S. Flores, G. Gosset, N. Flores, A.A. de Graaf, F. Bolivar // Metab. Eng. — 2002. — V. 4. — N. 2. — P. 124—137.
78. Maeda, H. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants / H. Maeda, N. Dudareva // Annu. Rev. Plant Biol. — 2012. — V. 63. — P. 73—105.
79. Huisman, O.C. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in higher plants. II. 3-Deoxy-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthetase from cauliflower / O.C. Huisman, T. Kosuge // J. Biol. Chem. — 1974. — V. 249. — N. 21. — P. 6842—6848.
80. Saijo, R. Some properties of the initial four enzymes involved in shikimic acid biosynthesis in tea plant / R. Saijo, T. Takeo // Agric. Biol. Chem. — 1979. — V. 43. — N. 7. — P. 1427—1432.
81. Suzich, J.A. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from carrot root (*Daucus carota*) is a hysteretic enzyme / J.A. Suzich, J.F. Dean, K.M. Herrmann // Plant Physiol. — 1985. — V. 79. — N. 3. — P. 765—770.
82. Pinto, J.E. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) / J.E. Pinto, J.A. Suzich, K.M. Herrmann // Plant Physiol. — 1986. — V. 82. — N. 4. — P. 1040—1044.
83. Dell, K.A. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis / K.A. Dell, J.W. Frost // J. Am. Chem. Soc. — 1993. — V. 115. — P. 11581—11589.
84. Kramer, M. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid / M. Kramer, J. Bongaerts, R. Bovenberg, S. Kremer, U. Muller, S. Orf, M. Wubbolts, L. Raeven // Metab. Eng. — 2003. — V. 5. — N. 4. — P. 277—283.
85. Mitsuhashi, S. Aromatic biosynthesis. XII. Conversion of 5-dehydroquinic acid to 5-dehydroshikimic acid by 5-dehydroquinase / S. Mitsuhashi, B.D. Davis // Biochim. Biophys. Acta. — 1954. — V. 15. — N. 1. — P. 54—61.
86. Lutke-Eversloh, T. Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression / T. Lutke-Eversloh, G. Stephanopoulos // Metab. Eng. — 2008. — V. 10. — N. 2. — P. 69—77.
87. Yaniv, H. Aromatic biosynthesis. XIV. 5-Dehydroshikimic reductase / H. Yaniv, C. Gilvarg // J. Biol. Chem. — 1955. — V. 213. — N. 2. — P. 787—795.
88. Michel, G. Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its Paralog YdiB. A common structural framework for different activities / G. Michel, A.W. Roszak, V. Sauve, J. Maclean, A. Matte, J.R. Coggins, M. Cygler, A.J. Laphorn // J. Biol. Chem. — 2003. — V. 278. — N. 21. — P. 19463—19472.
89. Johansson, L. Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions / L. Johansson, G. Lidén // J. Biotechnol. — 2006. — V. 126. — N. 4. — P. 528—545.
90. Скороходова А.Ю., Машко С.В., Гайденко Т.А., Бирюкова И.В., Ермишев В.Ю., Гулевич А.Ю. Способ получения ароматической L-аминокислоты с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован ген *ydiB*, способ получения сложного эфира низших алкилов альфа-1-аспартил-1-фенилаланина // Патент РФ RU 2355759, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22, С 12 R 1/19. 2009.
- Skorokhodova, A.Yu., Mashko, S.V., Gaidenko, T.A., Biryukova, I.V., Ermishev, V.Yu., and Gulevich, A.Yu. A method for obtaining of aromatic L-amino acid using bacteria of the *Escherichia* genus in which the *ydiB* gene is inactivated, method for obtaining of ester of lower alkyls of alfa-1-aspartyl-1-phenylalanine // Patent RF RU 2355759, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22, С 12 R 1/19. 2009.
91. Muir, R.M. Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*) / R.M. Muir, A.M. Ibanez, S.L. Uratsu, E.S. Ingham, C.A. Leslie, G.H. McGranahan, N. Batra, S. Goyal, J. Joseph, E.D. Jemmis, A.M. Dandekar // Plant Mol. Biol. — 2011. — V. 75. — N. 6. — P. 555—565.
92. Oldiges, M. Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway / M. Oldiges, M. Kunze, D. Degenring, G.A. Sprenger, R. Takors // Biotechnol. Prog. — 2004. — V. 20. — N. 6. — P. 1623—1633.
93. Weiner, M. Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli* / M. Weiner, C. Albermann, K. Gottlieb, G.A. Sprenger, D. Weuster-Botz // Biochem. Eng. J. — 2014. — V. 83. — P. 62—69.
94. Weiner, M. Improvement of constraint-based flux estimation during L-phenylalanine production with *Escherichia coli* using targeted knock-out mutants / M. Weiner, J. Trondle, C. Albermann, G.A. Sprenger, D. Weuster-Botz // Biotechnol. Bioeng. — 2014. — V. 111. — N. 7. — P. 1406—1416.
95. DeFeyer, R.C. Purification and properties of shikimate kinase II from *Escherichia coli* K-12 / R.C. DeFeyer, J. Pittard // J. Bacteriol. — 1986. — V. 165. — N. 1. — P. 331—333.
96. Liu, S.-P. Production of L-phenylalanine from glucose by metabolic engineering of wild type *Escherichia coli* W3110 / S.-P. Liu, M.-R. Xiao, L. Zhang, J. Xu, Z.-Y. Ding, Z.-H. Gu, G.-Y. Shi // Process Biochem. — 2013. — V. 48. — N. 3. — P. 413—419.
97. Anderson, K.S. Evaluation of 5-enolpyruvoylshikimate-3-phosphate synthase substrate and inhibitor binding by stopped-flow and equilibrium fluorescence measurements / K.S. Anderson, J.A. Sikorski, K.A. Johnson // Biochemistry. — 1988. — V. 27. — N. 5. — P. 1604—1610.
98. Bornemann, S. *Escherichia coli* chorismate synthase: a deuterium kinetic-isotope effect under single-turnover and steady-state conditions shows that a flavin intermediate forms before the C-(6proR)-H bond is cleaved / S. Bornemann, S. Balasubramanian, J.R. Coggins, C. Abell, D.J. Lowe, R.N.

- Thorneley // *Biochem. J.* — 1995. — V. 305. — Pt. 3. — P. 707—710.
99. Hawkes, T.R. Chorismate synthase. Pre-steady-state kinetics of phosphate release from 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate / T.R. Hawkes, T. Lewis, J.R. Coggins, D.M. Mousdale, D.J. Lowe, R.N. Thorneley // *Biochem. J.* — 1990. — V. 265. — N. 3. — P. 899—902.
100. White, P.J. The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from *Escherichia coli* K12 and its comparison with the enzyme from *Neurospora crassa* / P.J. White, G. Millar, J.R. Coggins // *Biochem. J.* — 1988. — V. 251. — N. 2. — P. 313—322.
101. Morell, H. The enzymic synthesis of chorismic and prephenic acids from 3-enolpyruvylshikimate acid 5-phosphate / H. Morell, M.J. Clark, P.F. Knowles, D.B. Sprinson // *J. Biol. Chem.* — 1967. — V. 242. — N. 1. — P. 82—90.
102. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Минаева Н.И., Зименков Д.В., Крылов А.А., Бирюкова И.В., Машко С.В. Способ конструирования оперонов, содержащих транскрипционно сопряженные гены // Патент РФ RU 2411292, С 12 N 15/00. 2011.
- Gulevich, A.Yu., Skorokhodova, A.Yu., Ermishev, V.Yu., Minaeva, N.I., Zimenkov, D.V., Krylov, A.A., Biryukova, I.V., and Mashko, S.V.* A method for construction of operons that contain translation-conjugated genes // Patent of RF RU 2411292, С 12 N 15/00. 2011.
103. Машко С.В., Куваева Т.М., Минаева Н.И., Бирюкова И.В., Каташкина Ж.И. Способ получения ароматических аминокислот с использованием бактерии, экспрессирующей ген *ARO1* из дрожжей // Патент РФ RU 2408723, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22. 2009.
- Mashko, S.V., Kuvaeva, T.M., Minaeva, N.I., Biryukova, I.V., and Katashkina, Zh.I.* A method for obtaining aromatic amino acids using bacteria that express the *ARO1* gene from yeast // Patent of RF RU 2408723, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22. 2009.
104. Duncan, K. The *Saccharomyces cerevisiae* *ARO1* gene. An example of the co-ordinate regulation of five enzymes on a single biosynthetic pathway / K. Duncan, R.M. Edwards, J.R. Coggins // *FEBS Lett.* — 1988. — V. 241. — N. 1—2. — P. 83—88.
105. Gosset, G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system / G. Gosset // *Microb. Cell Fact.* — 2005. — V. 4. — N. 1. — P. 14.
106. Valle, F. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node / F. Valle, E. Muñoz, E. Ponce, N. Flores, F. Bolivar // *J. Ind. Microbiol.* — 1996. — V. 17. — N. 5. — P. 458—462.
107. Flores, N. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli* / N. Flores, J. Xiao, A. Berry, F. Bolivar, F. Valle // *Nat. Biotechnol.* — 1996. — V. 14. — N. 5. — P. 620—623.
108. Сливинская Е.А. Конститутивный синтез в *Escherichia coli* низкоаффинных H<sup>+</sup>-симпортеров D-галактозы (GalP), D-ксилозы (XylE) или L-фукозы (FucP) приводит к возможности эффективного роста PST-штаммов на среде с D-глюкозой / Е.А. Сливинская, К.В. Рыбак, Ж.И. Каташкина, С.В. Машко, Ю.И. Козлов // *Биотехнология.* — 2007. — № 5. — С. 24—37.
- Slivinskaya, E.A.* Constitutive synthesis of low-affinity H<sup>+</sup>-symporters of D-galactose (GalP), D-xylose (XylE) or L-fucose (FucP) results in a possibility of effective growth of PST strains on D-glucose-containing medium / E.A. Slivinskaya, K.V. Rybak, Zh.I. Katashkina, S.V. Mashko, and Yu.I. Kozlov // *Biotekhnologiya (Biotechnology).* — 2007. — N 5. — P. 24—37.
109. Андреева И.Г. Предполагаемые H<sup>+</sup>-симпортеры GalP, XylE и FucP из *Pantoea ananatis* способны транспортировать глюкозу в клетки *Escherichia coli* / И.Г. Андреева, Л.И. Голубева, Ж.И. Каташкина // *Биотехнология.* — 2012. — № 2. — С. 21—31.
- Andreeva, I.G.* Putative H<sup>+</sup>-symporters GalP, XylE and FucP from *Pantoea ananatis* are capable of transporting glucose in *Escherichia coli* cells / I.G. Andreeva, L.I. Golubeva, and Zh.I. Katashkina // *Biotekhnologiya (Biotechnology).* — 2012. — N. 2. — P. 21—31.
110. Snoep, J.L. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase / J.L. Snoep, N. Arfman, L.P. Yomano, R.K. Fliege, T. Conway, L.O. Ingram // *J. Bacteriol.* — 1994. — V. 176. — N. 7. — P. 2133—2135.
111. Miller, J.E. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli* / J.E. Miller, K.C. Backman, M.J. O'Connor, R.T. Hatch // *J. Ind. Microbiol.* — 1987. — V. 2. — N. 3. — P. 143—149.
112. Gosset, G. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* / G. Gosset, J. Yong-Xiao, A. Berry // *J. Ind. Microbiol.* — 1996. — V. 17. — N. 1. — P. 47—52.
113. Patnaik, R. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield / R. Patnaik, J.C. Liao // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1994. — V. 60. — N. 11. — P. 3903—3908.
114. Liao, J.C. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism / J.C. Liao, S.Y. Hou, Y.P. Chao // *Biotechnol. Bioeng.* — 1996. — V. 52. — N. 1. — P. 129—140.
115. Гулевич А.Ю., Бирюкова И.В., Зименков Д.В., Скороходова А.Ю., Киверо А.Д., Беларева А.В., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, обладающих повышенной экспрессией гена *pckA* // Патент РФ RU 2268300, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22. 2004.
- Gulevich, A.Yu., Biryukova, I.V., Zimenkov, D.V., Skorokhodova, A.Yu., Kivero, A.D., Belareva, A.V., and Mashko, S.V.* A method for obtaining L-amino acids using bacteria with enhanced expression of gene *pckA* // Patent of RF RU 2268300, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22. 2004.
116. Timmermans, J. Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria / J. Timmermans, L. Van Melderen // *Cell Mol. Life Sci.* — 2010. — V. 67. — N. 17. — P. 2897—2908.

117. Дорощенко В.Г. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции фенилаланина и родственных соединений / В.Г. Дорощенко, В.А. Лившиц, Л.Г. Айрих, И.С. Шмагина, Е.А. Саврасова, М.В. Овсиенко, С.В. Машко // Биотехнология. — 2014. — №. 4. — С. 8—27.
- Doroshenko, V.G.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for phenylalanine and related compounds production / V.G. Doroshenko, V.A. Livshits, L.G. Eirich, I.S. Shmagina, E.A. Savrasova, M.V. Ovsienko, and S.V. Mashko // *Biotechnologiya* (Biotechnology). — 2014. — №. 4. — P. 8—27.
118. Lu, L. Improved production of L-tryptophan in *Escherichia coli* with *csrB* and *tkaA* overexpression / L. Lu, B. Zhuge, H. Zong, X. Lu, H. Fang, J. Song // *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* — 2015. — V. 21. — N. 4. — P. 647—651.
119. Shimizu, K. Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses // *Metabolites*. — 2013. — V. 4. — N. 1. — P. 1—35.
120. Ogawa, T. Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli* / T. Ogawa, H. Mori, M. Tomita, M. Yoshino // *Res. Microbiol.* — 2007. — V. 158. — N. 2. — P. 159—163.
121. Ogawa, T. Role of phosphoenolpyruvate in the NADP-isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase reaction in *Escherichia coli* / T. Ogawa, K. Murakami, H. Mori, N. Ishii, M. Tomita, M. Yoshin // *J. Bacteriol.* — 2007. — V. 189. — N. 3. — P. 1176—1178.
122. Chulavatnatol, M. Phosphoenolpyruvate synthetase from *Escherichia coli*. Effects of adenylate energy charge and modifier concentrations / M. Chulavatnatol, D.E. Atkinson // *J. Biol. Chem.* — 1973. — V. 248. — N. 8. — P. 2712—2715.
123. Krebs, A. The kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli* / A. Krebs, W.A. Bridger // *Can. J. Biochem.* — 1980. — V. 58. — N. 4. — P. 309—318.
124. Frost, J.W. Enhanced production of common aromatic pathway compounds // US Patent US 5168056, C 12 N 9/10. 1992.
125. Draths, K.M. Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase / K.M. Draths, D.L. Pompliano, D.L. Conley, J.W. Frost, A. Berry, G.L. Disbrow, R.J. Staversky, J.C. Lievens // *J. Am. Chem. Soc.* — 1992. — V. 114. — N. 10. — P. 3956—3962.
126. Lu, J.L. Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase / J.L. Lu, J.C. Liao // *Biotechnol. Bioeng.* — 1997. — V. 53. — N. 2. — P. 132—138.
127. Sprenger, G., Siewe, R., Sahm, H., Karutz, M., Sonke, T. Microbial preparation of substances from aromatic metabolism // Intern. Patent Application WO 1998018937, C 12 P 7/42, C 12 N 9/12, C 12 P 13/22. 1998.
128. Mascarenhas, D. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli* / D. Mascarenhas, D.J. Ashworth, C.S. Chen // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1991. — V. 57. — N. 10. — P. 2995—2999.
129. Na, D. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs / D. Na, S.M. Yoo, H. Chung, H. Park, J.H. Park, S.Y. Lee // *Nat. Biotechnol.* — 2013. — V. 31. — N. 2. — P. 170—174.
130. Becker, J. Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources / J. Becker, C. Klopprogge, O. Zelder, E. Heinzle, C. Wittmann // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 71. — N. 12. — P. 8587—8596.
131. Yakandawala, N. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production / N. Yakandawala, T. Romeo, A.D. Friesen, S. Madhyastha // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2008. — V. 78. — N. 2. — P. 283—291.
132. Zimenkov, D.V., Gulevich, A.Y., Skorokhodova, A.Y., Katschinskina, J.Y., Kivero, A.D., Biryukova, I.V., Doroshenko, V.G., Mashko, S.V. Method for producing L-amino acids // Intern. Patent Application WO 2005080583, C 12 N 9/18, C 12 P 13/22. 2005.
133. Nakahigashi, K. Systematic phenome analysis of *Escherichia coli* multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism / K. Nakahigashi, Y. Toya, N. Ishii, T. Soga, M. Hasegawa, H. Watanabe, Y. Takai, M. Honma, H. Mori, M. Tomita // *Mol. Syst. Biol.* — 2009. — V. 5. — P. 306.
134. Ran, N. Creation of a shikimate pathway variant / N. Ran, K.M. Draths, J.W. Frost // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — V. 126. — N. 22. — P. 6856—6857.
135. Ran, N. Directed evolution of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase to replace 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase / N. Ran, J.W. Frost // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129. — N. 19. — P. 6130—6139.
136. Cadwell, R.C. Randomization of genes by PCR mutagenesis / R.C. Cadwell, G.F. Joyce // *PCR Methods Appl.* — 1992. — V. 2. — N. 1. — P. 28—33.
137. Stemmer, W.P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — V. 91. — N. 22. — P. 10747—10751.
138. Brasen, C. Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation / C. Brasen, D. Esser, B. Rauch, B. Siebers // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2014. — V. 78. — N. 1. — P. 89—175.
139. White, R.H. L-Aspartate semialdehyde and a 6-deoxy-5-ketohexose 1-phosphate are the precursors to the aromatic amino acids in *Methanocaldococcus jannaschii* // *Biochemistry.* — 2004. — V. 43. — N. 23. — P. 7618—7627.
140. Gulko, M.K. How do haloarchaea synthesize aromatic amino acids? / M.K. Gulko, M. Dyall-Smith, O. Gonzalez, D. Oesterheld // *PLoS One.* — 2014. — V. 9. — N. 9. — P. e107475.
141. White, R.H. Methylglyoxal is an intermediate in the biosynthesis of 6-deoxy-5-ketofructose-1-phosphate: a precursor for aromatic amino acid biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii* / R.H. White, H. Xu // *Biochemistry.* — 2006. — V. 45. — N. 40. — P. 12366—12379.
142. Leuschner, C. The metabolism of quinate in pea roots (purification and partial characterization of a quinate hydrolyase)

- / C. Leuschner, K.M. Herrmann, G. Schultz // *Plant Physiol.* — 1995. — V. 108. — N. 1. — P. 319—325.
143. Ikeda, M. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum* / M. Ikeda, R. Katsumata // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 1995. — V. 59. — N. 8. — P. 1600—1602.
144. Gu, P. Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving L-tryptophan production / P. Gu, F. Yang, F. Li, Q. Liang, Q. Qi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — V. 97. — N. 15. — P. 6677—6683.
145. Liu, Q. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli* / Q. Liu, Y. Cheng, X. Xie, Q. Xu, N. Chen // *Biores. Technol.* — 2012. — V. 114. — P. 549—554.
146. Zhao, Z. Effect of gene knockouts of L-tryptophan uptake system on the production of L-tryptophan in *Escherichia coli* / Z. Zhao, S. Chen, D. Wu, J. Wu, J. Chen // *Proc. Biochem.* — 2012. — V. 47. — N. 2. — P. 340—344.
147. Chakrabarti, A.C. Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate / A.C. Chakrabarti, D.W. Deamer // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — V. 1111. — N. 2. — P. 171—177.
148. Kramer, R. Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes // *Arch. Microbiol.* — 1994. — V. 162. — N. 1—2. — P. 1—13.
149. Livshits, V.A. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli* / V.A. Livshits, N.P. Zakataeva, V.V. Aleshin, M.V. Vitushkina // *Res. Microbiol.* — 2003. — V. 154. — N. 2. — P. 123—135.
150. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Гусятинер М.М., Зиятдинов М.Х., Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Дорошенко В.Г., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* — продуцент L-аминокислоты (варианты) // Патент РФ RU 2229513, С 12 R 1/19, С 12 P 13/08, С 12 N 1/21. 2004.
- Livshits, V.A., Vitushkina, M.V., Gusiater, M.M., Ziyatdinov, M.Kh., Akhverdyan, V.Z., Savrasova, E.A., Doroshenko, V.G., and Mashko, S.V. A method for obtaining L-amino acids, a strain of *Escherichia coli* producing L-amino acid (variants) // Patent RF RU 2229513, С 12 R 1/19, С 12 P 13/08, С 12 N 1/21. 2004.
151. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Машко С.В., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Беларева А.В. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* — продуцент L-аминокислоты (варианты) // Патент РФ RU 2222596, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22, С 12 N 1/21. 2004.
- Livshits, V.A., Vitushkina, M.V., Mashko, S.V., Doroshenko, V.G., Biryukova, I.V., Katashkina, Zh.I., Skorokhodova, A.Yu., and Belareva, A.V. A method for obtaining L-amino acids, a strain of *Escherichia coli* producing L-amino acid (variants) // Patent RF RU2222596, С 12 N 1/21, С 12 P 13/22, С 12 N 1/21. 2004.
152. Doroshenko, V. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids / V. Doroshenko, L. Airich, M. Vitushkina, A. Kolokolova, V. Livshits, S. Mashko // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2007. — V. 275. — N. 2. — P. 312—318.
153. Mohrbach, T. Untersuchungen zum Export von Tryptophan in *Escherichia coli*. PhD Thesis. — Köln: Universität zu Köln, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, 2010.
154. Wang, J. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan / J. Wang, L.K. Cheng, J. Wang, Q. Liu, T. Shen, N. Chen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — V. 97. — N. 17. — P. 7587—7596.
155. Gosset, G. Production of aromatic compounds in bacteria // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2009. — V. 20. — N. 6. — P. 651—658.
156. Guo, M.S. Stress-induced remodeling of the bacterial proteome / M.S. Guo, C.A. Gross // *Curr. Biol.* — 2014. — V. 24. — N. 10. — P. R424—434.
157. Santiviago, C.A. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen / C.A. Santiviago, J.A. Fuentes, S.M. Bueno, A.N. Trombert, A.A. Hildago, L.T. Socias, P. Youderian, G.C. Mora // *Mol. Microbiol.* — 2002. — V. 46. — N. 3. — P. 687—698.
158. Widhalm, J.R. Identification of a plastidial phenylalanine exporter that influences flux distribution through the phenylalanine biosynthetic network / J.R. Widhalm, M. Gutensohn, H. Yoo, F. Adebessin, Y. Qian, L. Guo, R. Jaini, J.H. Lynch, R.M. McCoy, J.T. Shreve, J. Thimmapuram, D. Rhodes, J.A. Morgan, N. Dudareva // *Nat. Commun.* — 2015. — V. 6. — P. 8142.
159. Cheng, L.-K. Effect of feeding strategy on L-tryptophan production by recombinant *Escherichia coli* / L.-K. Cheng, J. Wang, Q.-Y. Xu, X.-X. Xie, Y.-J. Zhang, C.-G. Zhao, N. Chen // *Annals Microbiol.* — 2012. — V. 62. — N. 4. — P. 1625—1634.
160. Смирнова, Г.В. Влияние активности первичных протонных помп на рост *E. coli* в присутствии ацетата / Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский // *Микробиология.* — 1988. — Т. 57. — № 4. — С. 554—559.
- Smirnova, G.V. Effect of the activity of primary protonic pumps on *E. coli* growth in the occurrence of acetate / G.V. Smirnova, O.N. Oktiabrskii // *Mikrobiologiya (Microbiology).* — 1988. — V. 57. — N 4. — P. 554—559.
161. Roe, A.J. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids / A.J. Roe, D. McLaggan, I. Davidson, C. O'Byrne, I.R. Booth // *J. Bacteriol.* — 1998. — V. 180. — N. 4. — P. 767—772.
162. Wolfe, A.J. The acetate switch // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2005. — V. 69. — N. 1. — P. 12—50.
163. Valgepea, K. Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase / K. Valgepea, K. Adamberg, R. Nahku, P.J. Lahtvee, L. Arike, R. Vilu // *BMC Syst. Biol.* — 2010. — V. 4. — P. 166.
164. Schilling, B. Protein acetylation dynamics in response to carbon overflow in *Escherichia coli* / B. Schilling, D. Christensen, R. Davis, A.K. Sahu, L.I. Hu, A. Walker-Peddakotla, D.J. Sorensen, B. Zemaitatis, B.W. Gibson, A.J. Wolfe // *Mol. Microbiol.* — 2015. — V. 98. — N. 5. — P. 847—863.

165. Han, K. Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *Escherichia coli* fermentation / K. Han, J. Hong, H.C. Lim // *Biotechnol. Bioeng.* — 1993. — V. 41. — N. 3. — P. 316—324.
166. Roe, A.J. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity / A.J. Roe, C. O'Byrne, D. McLaggan, I.R. Booth // *Microbiology.* — 2002. — V. 148. — N. Pt 7. — P. 2215—2222.
167. Price-Carter, M. Polyphosphate kinase protects *Salmonella enterica* from weak organic acid stress / M. Price-Carter, T.G. Fazzio, E.I. Vallbona, J.R. Roth // *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187. — N. 9. — P. 3088—3099.
168. Wang, J. Fermentation characterization of an L-tryptophan producing *Escherichia coli* strain with inactivated phosphotransacetylase / J. Wang, J. Huang, J. Shi, Q. Xu, X. Xie, N. Chen // *Annal. Microbiol.* — 2013. — V. 63. — N. 4. — P. 1219—1224.
169. Zhao, C. Impact of deletion of the genes encoding acetate kinase on production of L-tryptophan by *Escherichia coli* / C. Zhao, L. Cheng, J. Wang, Z. Shen, N. Chen // *Annal. Microbiol.* — 2015. — V. 66. — N. 1. — P. 261—269.
170. Hesslinger, C. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate / C. Hesslinger, S.A. Fairhurst, G. Sawers // *Mol. Microbiol.* — 1998. — V. 27. — N. 2. — P. 477—492.
171. Lee, K.H. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production / K.H. Lee, J.H. Park, T.Y. Kim, H.U. Kim, S.Y. Lee // *Mol. Syst. Biol.* — 2007. — V. 3. — P. 149.
172. Chou, C.H. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures / C.H. Chou, G.N. Bennett, K.Y. San // *Biotechnol. Bioeng.* — 1994. — V. 44. — N. 8. — P. 952—960.
173. Farmer, W.R. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli* / W.R. Farmer, J.C. Liao // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1997. — V. 63. — N. 8. — P. 3205—3210.
174. Belongia, E.A. An investigation of the cause of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with tryptophan use / E.A. Belongia, C.W. Hedberg, G.J. Gleich, K.E. White, A.N. Mayeno, D.A. Loegering, S.L. Dunnette, P.L. Pirie, K.L. MacDonald, M.T. Osterholm // *N. Engl. J. Med.* — 1990. — V. 323. — N. 6. — P. 357—365.
175. US Food and Drug Administration. February 2001. Information Paper on L-Tryptophan and 5-hydroxy-L-tryptophan.
176. Totsuka, Y. *In vivo* genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and L-tryptophan / Y. Totsuka, T. Watanabe, S. Coulibaly, S. Kobayashi, M. Nishizaki, M. Okazaki, T. Hasei, K. Wakabayashi, H. Nakagama // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* — 2014. — V. 760. — P. 48—55.
177. Chung, K.T. Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer / K.T. Chung, G.S. Gadupudi // *Environ. Mol. Mutagen.* — 2011. — V. 52. — N. 2. — P. 81—104.
178. Hashizume, T. Mutagenic activities of tryptophan metabolites before and after nitrite treatment / T. Hashizume, H. Saito, H. Tsujisawa, K. Kosaka, T. Ozawa, M. Yamashita, N. Kinai // *Food Chem. Toxicol.* — 1991. — V. 29. — N. 12. — P. 839—844.
179. Varma, A. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use / A. Varma, B.O. Palsson // *Nat. Biotech.* — 1994. — V. 12. — N. 10. — P. 994—998.
180. Becker, S.A. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox / S.A. Becker, A.M. Feist, M.L. Mo, G. Hannum, B.O. Palsson, M.J. Herrgard // *Nat. Protoc.* — 2007. — V. 2. — N. 3. — P. 727—738.
181. Burgard, A.P. OptKnock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization / A.P. Burgard, P. Pharkya, C.D. Maranas // *Biotechnol. Bioeng.* — 2003. — V. 84. — N. 6. — P. 647—657.
182. Pharkya, P. An optimization framework for identifying reaction activation/inhibition or elimination candidates for overproduction in microbial systems / P. Pharkya, C.D. Maranas // *Metab. Eng.* — 2006. — V. 8. — N. 1. — P. 1—13.
183. Pharkya, P. OptStrain: a computational framework for redesign of microbial production systems / P. Pharkya, A.P. Burgard, C.D. Maranas // *Genome Res.* — 2004. — V. 14. — N. 11. — P. 2367—2376.
184. Ranganathan, S. OptForce: an optimization procedure for identifying all genetic manipulations leading to targeted overproductions / S. Ranganathan, P.F. Suthers, C.D. Maranas // *PLoS Comput. Biol.* — 2010. — V. 6. — N. 4. — P. e1000744.
185. Chowdhury, A. k-OptForce: integrating kinetics with flux balance analysis for strain design / A. Chowdhury, A.R. Zomorodi, C.D. Maranas // *PLoS Comput. Biol.* — 2014. — V. 10. — N. 2. — P. e1003487.
186. Tran, L.M. Ensemble modeling of metabolic networks / L.M. Tran, M.L. Rizk, J.C. Liao // *Biophys. J.* — 2008. — V. 95. — N. 12. — P. 5606—5617.
187. Lun, D.S. Large-scale identification of genetic design strategies using local search / D.S. Lun, G. Rockwell, N.J. Guido, M. Baym, J.A. Kelner, B. Berger, J.E. Galagan, G.M. Church // *Mol. Syst. Biol.* — 2009. — V. 5. — P. 296.
188. Stanford, N.J. RobOKoD: microbial strain design for (over)production of target compounds / N.J. Stanford, P. Millard, N. Swainston // *Front Cell Dev. Biol.* — 2015. — V. 3. — P. 17.
189. Pharkya, P. Optimization based redesign of microbial production systems. PhD Thesis. — Pennsylvania: The Pennsylvania State University, 2005.
190. Pharkya, P. Exploring the overproduction of amino acids using the bilevel optimization framework OptKnock / P. Pharkya, A.P. Burgard, C.D. Maranas // *Biotechnol. Bioeng.* — 2003. — V. 84. — N. 7. — P. 887—899.
191. Karutz, M., Sahn, H., Siewe, R., Sonke, T., Sprenger, G. Microbial preparation of substances from aromatic metabo-

- lism/ii // Intern. Patent Application WO 1998018937, C 12 P 7/42, C 12 N 9/12, C 12 P 13/22. 1998.
192. Kempf, B. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments / B. Kempf, E. Bremer // Arch. Microbiol. — 1998. — V. 170. — N. 5. — P. 319—330.
  193. Burg, M.B. Intracellular organic osmolytes: function and regulation / M.B. Burg, J.D. Ferraris // J. Biol. Chem. — 2008. — V. 283. — N. 12. — P. 7309—7313.
  194. Diamant, S. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses / S. Diamant, N. Eliahu, D. Rosenthal, P. Goloubinoff // J. Biol. Chem. — 2001. — V. 276. — N. 43. — P. 39586—39591.
  195. Yancey, P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // J. Exp. Biol. — 2005. — V. 208. — N. Pt 15. — P. 2819—2830.
  196. Лившиц В.А., Казаринова Л.А., Закатаева Н.П., Кутукова Е.А., Херсонска А.М. Штаммы *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* — продуценты инозина и способ продукции инозина с их использованием // Патент РФ RU 2333949, C 12 N 1/20, C 12 N 15/01, C 12 P 19/38. 2005. Livshits, V.A., Kazarinova, L.A., Zakataeva, N.P., Kutukova, E.A., and Khersonska, A.M. Strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* producing inosine and method for inosine production using them // Patent of RF RU 2333949, C 12 N 1/20, C 12 N 15/01, C 12 P 19/38. 2005.
  197. Zhang, L. Proline metabolism increases *katG* expression and oxidative stress resistance in *Escherichia coli* / L. Zhang, J.R. Alfano, D.F. Becker // J. Bacteriol. — 2015. — V. 197. — N. 3. — P. 431—440.
  198. Purvis, J.E. Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress / J.E. Purvis, L.P. Yomano, L.O. Ingram // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — V. 71. — N. 7. — P. 3761—3769.
  199. von Weymarn, N. Improved osmotolerance of recombinant *Escherichia coli* by de novo glycine betaine biosynthesis / N. von Weymarn, A. Nyyssola, T. Reinikainen, M. Leisola, H. Ojamo // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 55. — N. 2. — P. 214—218.
  200. Louis, P. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli* / P. Louis, E.A. Galinski // Microbiology. — 1997. — V. 143. — N. 4. — P. 1141—1149.
  201. Zhu, D. Identification and characterization of ectoine biosynthesis genes and heterologous expression of the *ectABC* gene cluster from *Halomonas* sp. QHL1, a moderately halophilic bacterium isolated from Qinghai Lake / D. Zhu, J. Liu, R. Han, G. Shen, Q. Long, X. Wei, D. Liu // J. Microbiol. — 2014. — V. 52. — N. 2. — P. 139—147.
  202. Wang, Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application / Q. Wang, H. Yu, Y. Xia, Z. Kang, Q. Qi // Microb. Cell Fact. — 2009. — V. 8. — P. 47.
  203. Gu, P. The improved L-tryptophan production in recombinant *Escherichia coli* by expressing the polyhydroxybutyrate synthesis pathway / P. Gu, J. Kang, F. Yang, Q. Wang, Q. Liang, Q. Qi // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — V. 97. — N. 9. — P. 4121—4127.
  204. Cabisco, E. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species / E. Cabisco, J. Tamarit, J. Ros // Int. Microbiol. — 2000. — V. 3. — N. 1. — P. 3—8.
  205. Benov, L. Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on *Escherichia coli*. The transketolase connection / L. Benov, I. Fridovich // J. Biol. Chem. — 1999. — V. 274. — N. 7. — P. 4202—4206.
  206. Chiang, S.M. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria / S.M. Chiang, H.E. Schellhorn // Arch. Biochem. Biophys. — 2012. — V. 525. — N. 2. — P. 161—169.
  207. Niederhoffer, E.C. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus / E.C. Niederhoffer, C.M. Naranjo, K.L. Bradley, J.A. Fee // J. Bacteriol. — 1990. — V. 172. — N. 4. — P. 1930—1938.
  208. Kthiri, F. Protein aggregation in a mutant deficient in *yajL*, the bacterial homolog of the Parkinsonism-associated protein DJ-1 / F. Kthiri, H.T. Le, V. Gautier, T. Caldas, A. Malki, A. Landoulsi, C. Bohn, P. Bouloc, G. Richarme // J. Biol. Chem. — 2010. — V. 285. — N. 14. — P. 10328—10336.
  209. Самсонов В.В., Ерёмкина Н.С., Стойнова Н.В., Дорошенко В.Г. Способ получения аминокислот с использованием бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, имеющей сверхэкспрессированный ген *yajL* // Заявка на изобретение РФ № 2014105547, 2015. Samsonov, V.V., Eremina N.S., Stoinova, N.V., and Doroshenko, V.G. A method for obtaining amino acids using bacteria of the *Enterobacteriaceae* family with *yajL* overexpressed gene // Application claim RF 2014105547, 2015.
  210. Onken, U. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes / U. Onken, E. Liefke // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. — 1989. — V. 40. — P. 137—169.
  211. Manfredini, R. Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors / R. Manfredini, V. Cavallera, L. Marini, G. Donati // Biotechnol. Bioeng. — 1983. — V. 25. — N. 12. — P. 3115—3131.
  212. Spiro, S. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli* / S. Spiro, J.R. Guest // Trends Biochem. Sci. — 1991. — V. 16. — N. 8. — P. 310—314.
  213. Bueno, E. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control / E. Bueno, S. Mesa, E.J. Bedmar, D.J. Richardson, M.J. Delgado // Antioxid. Redox Signal. — 2012. — V. 16. — N. 8. — P. 819—852.
  214. Anand, A. Redox-mediated interactions of Vhb (*Vitreoscilla* haemoglobin) with OxyR: novel regulation of Vhb biosynthesis under oxidative stress / A. Anand, B.T. Duk, S. Singh, M.Y. Akbas, D.A. Webster, B.C. Stark, K.L.

- Dikshit // Biochem. J. — 2010. — V. 426. — N. 3. — P. 271—280.
215. Park, K.W. *Vitreoscilla* hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases / K.W. Park, K.J. Kim, A.J. Howard, B.C. Stark, D.A. Webster // J. Biol. Chem. — 2002. — V. 277. — N. 36. — P. 33334—33337.
216. Wei, X.X. Applications of the VHb gene *vgb* for improved microbial fermentation processes / X.X. Wei, G.Q. Chen // Methods Enzymol. — 2008. — V. 436. — P. 273—287.
217. Tsai, P.S. Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: New insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential. / P.S. Tsai, G. Rao, J.E. Bailey // Biotechnol. Bioeng. — 1995. — V. 47. — N. 3. — P. 347—354.
218. Tsai, P.S. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism / P.S. Tsai, V. Hatzimanikatis, J.E. Bailey // Biotechnol. Bioeng. — 1996. — V. 49. — N. 2. — P. 139—150.
219. Zuo, Z.Z. Construction of tryptophan overproducing *E. coli* strain. Master's Thesis. — Japan: Fujian Normal University, 2010.

V.B.PANICHKIN\*, V.A.LIVSHITS,  
I.V.BIRYUKOVA, and S.V.MASHKO

The Closed Joint Stock Company *Ajinomoto-Genetika Research Institute*, 117545, Moscow Russia

*e-mail*: vladimir\_panichkin@agri.ru

### Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for L-tryptophan Producing

The review summarizes the main approaches that were used for designing of L-tryptophan producer strains on the basis of *Escherichia coli*. Moreover, some perspectives for the further improvement of efficacy and technical characteristics of the strains based on system metabolic engineering are discussed. The mentioned approaches can also be helpful in the design of strains producing other aromatic amino acids, and L-tryptophan precursors or derivatives.

*Key words*: *Escherichia coli*, metabolic engineering, producer, stress resistance, L-tryptophan.

*Biotehnologiya (Biotechnology)*, 2016, V 32, N 2, P. 11—42.

---

\* Author for correspondence.