

УДК 577.121

## Активация альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы у штаммов *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению

© 2019 А.Ю. СКОРОХОДОВА<sup>1,\*</sup>, А.В. СУХОЖЕНКО<sup>1</sup>, А.Ю. ГУЛЕВИЧ<sup>1</sup>, В.Г. ДЕБАБОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИИ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика), Москва 117545

\*e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Поступила в редакцию 03.12.2018 г.

Принята к публикации 10.12.2018 г.

Исследована активация альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы у штаммов *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению. Установлено, что процессы дыхания, использующие пировиноградную кислоту в качестве эндогенного акцептора электронов, способны в значительной степени обеспечивать поддержание анаэробного окислительно-восстановительного баланса у штаммов *E. coli*, дефицитных по путям смешано-кислотного брожения. Последовательная инактивация путей анаэробной диссимиляции пировиноградной кислоты и нарушение функциональности восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот в штаммах обуславливали рост (с 11% до 54%) вклада респираторного формирования молочной кислоты и аланина в биосинтез восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы исследованными штаммами. Анализ энантиомерного состава секретированных штаммами молочной кислоты и аланина показал участие в формировании данных соединений D-лактатдегидрогеназы Dld, L-лактатдегидрогеназы LctD и D-аланиндегидрогеназы DadA.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, глюкоза, брожение, дыхание, метаболическая инженерия, пируват, лактат, аланин.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-2-16-24

Замена веществ, получаемых нефтехимическим синтезом, продуктами микробных биотехнологий является важной частью современных стратегий устойчивого развития. При этом большинство химикатов, востребованных промышленностью, являются более восстановленными по сравнению с традиционными субстратами микробной биотехнологии (сахара растительной биомассы). Таким образом, эффективный микробиологический синтез подобных соединений предполагает соблюдение условий анаэробно-

Выбор перспективного потенциального микроорганизма-производителя в таком случае ограничен представителями облигатных или же факультативных анаэробов. При этом использование факультативно анаэробных организмов в качестве продуцентов имеет ряд технологических преимуществ. Среди факультативных анаэробов наиболее изученным метаболизмом и доступным генно-инженерным инструментарием обладает бактерия *Escherichia coli*, широко используемая для создания продуцентов полезных метаболитов [1, 2].

---

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГШ – глиоксилатный шунт; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ФЕП – фосфоенолпируват; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; ЩУК – щавелевоуксусная кислота; NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

При утилизации углеводов в условиях анаэробно-кислотного брожения, основной целью которого является поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, обеспечивающего возможность потребления окисленных субстратов [3]. Иными словами, брожение является способом реокисления избыточных восстановленных эквивалентов, сформированных в результате катаболизма субстрата. В качестве основных предшественников пути смешанно-кислотного брожения у *E. coli* используют пировиноградную кислоту, ЩУК и ацетил-КоА – ключевые интермедиаты центрального метаболизма клетки. С другой стороны, эти же метаболиты являются основными предшественниками в нативных или же искусственных путях биосинтеза целевых продуктов промышленной микробной биотехнологии [4, 5]. В данной связи их вовлечение в процессы брожения ведет к нецелевому расходу субстрата и, как следствие, неизбежному снижению эффективности процесса микробиологического синтеза желаемого вещества. Поэтому, общим правилом создания анаэробных продуцентов промышленно значимых химикатов на основе клеток *E. coli* является сокращение числа путей, участвующих в смешанно-кислотном брожении. Однако клетки *E. coli*, лишённые возможности брожения, не только не способны расти в условиях анаэробно-кислотного брожения, что решается реализацией двухстадийного аэробно-анаэробного процесса биосинтеза целевого продукта, включающего фазу аэробного накопления биомассы и последующую продуктивную стадию, но и практически полностью прекращают потребление углеводных субстратов в отсутствие аэрации. Последнее обусловлено резким нарушением внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, в результате невозможности эффективного реокисления у подобных рекомбинантов гликолитически сформированных восстановленных эквивалентов.

Альтернативным способом поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в бескислородных условиях может служить анаэробное дыхание. При этом, в отсутствие в среде внешнего акцептора электронов, окисление восстановленных эквивалентов путем дыхания сопровождается, как и в случае брожения, непродуктивным расходом тех или иных эндогенных акцепторов, сформированных при катаболизме углеводного субстрата. В клетках *E. coli* существует ряд систем анаэробного дыхания, потенциально способных обеспечить поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного

баланса используя внутренние акцепторы электронов [6]. Компенсаторная активация подобных систем у штаммов с нарушенной способностью к брожению может снижать их биосинтетический потенциал для анаэробной продукции целевых восстановленных химикатов за счет конкурентной утилизации ключевых метаболитов-предшественников. Целесообразность направленной инактивации таких путей альтернативного анаэробного дыхания в перспективных штаммах продуцентов предполагает необходимость первичной оценки их функциональности в базовых мутантах, дефицитных по путям смешанно-кислотного брожения.

Цель работы – активация альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы у штаммов *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактериальные штаммы, плазмиды и среды

Использованные в работе штаммы и плазмиды приведены в табл. 1. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ proxB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ ptsG, P<sub>Lglk</sub>, P<sub>lacgalP</sub> [7], обозначенный как РА4, обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы и инактивированными основными путями смешанно-кислотного брожения, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB и SOC [8] с добавлением, при необходимости, 100 мкг/мл ампициллина («Синтез», Россия) или 30 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, США).

### Реагенты

Использовали ДНК полимеразу Taq (Thermo Scientific, Литва). Олигонуклеотидные праймеры (табл. 1) синтезировали в ООО «Евроген» (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и выделяли, используя QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты производства Panreac (Испания) и Sigma.

### Конструирование штаммов и плазмид

Все хромосомные модификации осуществляли с использованием модифицированной [9] методики, разработанной Даценко и Ваннером [10].

**Использованные штаммы, плазмиды и олигонуклеотидные праймеры**

**Strains, plasmids, and oligonucleotide primers used in this study**

Объект	Генотип/последовательность	Источник
<b>Штамм</b>		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> K-12 дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
РА4	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pt a$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , $P_{lglk}$ , $P_{tacgalP}$	[7], коллекция лаборатории
РА4F	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pt a$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , $P_{lglk}$ , $P_{tacgalP}$ , $\Delta frdAB$	» »
РА4FP	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pt a$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , $P_{lglk}$ , $P_{tacgalP}$ , $\Delta frdAB$ , $\Delta pflB$	» »
РА4FPS	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pt a$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , $P_{lglk}$ , $P_{tacgalP}$ , $\Delta frdAB$ , $\Delta pflB$ , $\Delta sdhAB$	» »
<b>Плазмиды</b>		
pMW118-( $\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$ )	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , $\lambda attL$ - <i>cat</i> - $\lambda attR$	[9]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , $P_{araB}$ - $\lambda gam$ - <i>bet-exo</i>	[10]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , $P_R$ - $\lambda xis$ - <i>int</i> , <i>cIts857</i>	[11]
<b>Праймеры</b>		
P1	5'-cgtgcaaacctttcaagccgatcttgccattgtaggcgtcaagttagat aaaaaagctgaac-3'	Данная работа
P2	5'-ttagcgtggtttcagggtcgcgataagaaagcttttgaagcctgcttttta tactaagttgg-3'	То же
P3	5'-catgtccgagcttaaatgaaaagttagccacagcctgcgctcaagttagat aaaaaagctgaac-3'	» »
P4	5'-ttacatagattgagtgaaggtagcagtaataacgtctgaagcctgcttttta tactaagttgg-3'	» »
P5	5'-gatgaaattgccagtcagagaattgatgcagttgctgctcaagttagata aaaaaagctgaac-3'	» »
P6	5'-ttacgcattcgttgaacaacatcgacttgatgatggaagcctgctttttat actaagttgg-3'	» »
P7	5'-ggagcagtggaatagcgttc-3'	» »
P8	5'-cgtcattggcctgacatacg-3'	» »
P9	5'-gtcatttacctgcgtgaaaacg-3'	» »
P10	5'-gacattgcggtgtttctccag-3'	» »
P11	5'-gtgttgaccgactacgttaaac-3'	» »
P12	5'-ctgatgcgctgcgcttatcag-3'	» »

Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *frdAB*, *pflB* и *sdhAB*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1–P2, P3–P4, P5–P6 и плазмиды pMW118-( $\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$ ) [9] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощника pKD46 [10]. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально

инактивированными генами *frdAB*, *pflB* и *sdhAB*, подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P7–P8, P9–P10, P11–P12.

Штаммы РА4F, РА4FP и РА4FPS были получены при введении соответствующих индивидуальных модификаций в хромосому штамма РА4 с помощью P1-зависимых трансдукций [8]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага  $\lambda$ , из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [11].

### Культивирование штаммов

Клетки штаммов PA4, PA4F, PA4FP и PA4FPS выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37 °С. К 5 мл ночных культур добавляли 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл при 37 °С на роторной качалке при 250 об/мин в течение 8 ч. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин. при 2000 g при 4 °С. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы. В дальнейшем культуры инкубировали в течение 24 ч. в пробирках объемом 15 мл, закрытых завинчивающимися крышками при 37 °С на роторной качалке при 250 об/мин.

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

### Аналитические методы

Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы Waters HPLC system (Waters, США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) (300 × 7,8 мм, 8 мкм, Phenomenex, США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2,5 мМ) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы система была укомплектована рефрактивным детектором Waters 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Waters). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил–вода (объемное соотношение 75:25) при скорости потока 1 мл/мин.

Соотношение энантиомеров молочной кислоты и аланина определяли методом хиральной лиганднообменной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. Для разделения энантиомеров соответствующих соединений система была укомплектована хроматографической колонкой, упакованной сорбентом Nucleosil Chiral-1 (Macherey-Nagel, Германия) с размером частиц 5 мкм, размером пор 12 нм и геометрическими размерами 250×4,0 мм. Термостатирование хроматографической колонки осуществлялось при

60 °С. Водный 0,5 М раствор сульфата меди (II) (CuSO<sub>4</sub>) был использован в качестве элюента, который подавался в хроматографическую колонку с постоянной объемной скоростью 0,8 мл/мин. Длина волны спектрофотометрического детектирования составляла 240 нм. Для калибровки аналитической системы, контроля качества измерений и идентификации энантиомеров были использованы растворы L-молочной кислоты и L-аланина, а также растворы соответствующих рацемических смесей. Обработка данных и расчет соотношения энантиомеров целевых аналитов осуществлялся методом нормализации в программном обеспечении Empower 3 (Waters).

Концентрации этанола в культуральных жидкостях определяли методом газовой хроматографии на колонке OmegaWax (30 м, 0,25 мм в.д., 0,25 мкм толщина пленки, Supelco, США). Использовали хроматограф GC-17A (Shimadzu, Япония), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и автосамплером АОС-20i.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования возможной активации альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы у штаммов *E. coli* с нарушенной способностью к брожению, в качестве базового использовали ранее сконструированный множественно модифицированный штамм *E. coli* MG1655  $\Delta$ ackA-pta,  $\Delta$ poxB,  $\Delta$ ldhA,  $\Delta$ adhE,  $\Delta$ pptsG, P<sub>lglk</sub>, P<sub>lacgalP</sub>, обозначенный как PA4. В этом штамме основные пути смешанно-кислотного брожения, ответственные за формирование уксусной и молочной кислот, а также этанола, были инактивированы делецией генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, кодирующих ключевые ферменты, вовлекающие в соответствующие реакции пировиноградную кислоту и ацетил-КоА. Единственной возможностью анаэробного реокисления NADH в штамме оставалось протекание минорных реакций восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) с участием ЩУК. Внутриклеточная доступность фосфоенолпирувата (ФЕП), прямого метаболита-предшественника для анаэробного формирования ЩУК, была повышена в штамме путем обеспечения ФЕП-независимого транспорта и фосфорилирования глюкозы.

Поскольку известно, что клетки *E. coli* с инактивированными генами *pta*, *ldhA* и *adhE* не способны расти анаэробно [12], для характеристики анаэробного потребления глюкозы рекомбинантными

штаммами использовали двухстадийную аэробно-анаэробную ферментацию, которая включала стадию аэробного накопления биомассы и последующую анаэробную инкубацию полученных культур в присутствии глюкозы. Эффективность утилизации глюкозы и вклад процессов брожения и дыхания в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса оценивали по конверсии углеродного субстрата в секретированные метаболиты.

При отсутствии в среде внешнего источника CO<sub>2</sub>, в условиях анаэробноза, ограничивающих интенсивность формирования ЦУК, штамм РА4 потреблял лишь незначительное количество глюкозы (~11,5 мМ), синтезируя янтарную кислоту в качестве основного восстановленного продукта (табл. 2).

Анаэробный биосинтез этого соединения по восстановительной ветви ЦТК или в реакциях, вовлекающих глиоксилатный шунт (ГШ), требовал участия ЦУК в качестве исходного субстрата серии последующих превращений и, таким образом, зависел от карбоксилирования предшественника – ФЕП. В отсутствие внешних источников CO<sub>2</sub> его анаэробное внутриклеточное образование могло обеспечиваться форматдегидрогеназой H. Синтез субстрата для этого фермента, очевидно, происходил в штамме под действием пируват-формиат-лиазы, катализирующей конверсию пировиноградной кислоты в муравьиную кислоту и ацетил-КоА. Действительно, штамм секретировал значительную часть потребленной глюкозы именно в качестве продуктов, производных ацетил-КоА, уксусной кислоты и этанола (табл. 2). С учетом инактивации в штамме РА4 генов, ко-

дирующих основные ферменты, ответственные за образование уксусной кислоты и этанола, секреция этих метаболитов была обусловлена действием таких альтернативных ферментов, как ацил-КоА тиоэстераза YciA, ацетальдегиддегидрогеназа MhpF, альдегидредуктазы AdhP и YqhD. Интересно отметить, что общее количество секретированных штаммом уксусной кислоты и этанола было сравнимо с таковым яблочной и янтарной кислот. Это указывало на то, что синтез соответствующих четырехуглеродных дикарбоксилатов, требующий участия эквивалентных количеств CO<sub>2</sub>, предпочтительно протекал в штамме по восстановительной ветви ЦТК. При этом, если синтез яблочной кислоты и этанола штаммом был обусловлен активностью остаточных реакций брожения, формирование янтарной кислоты в восстановительной ветви ЦТК могло рассматриваться как результат анаэробного фумаратного дыхания с эндогенным акцептором электронов, сформированным из яблочной кислоты изоферментами фумараза.

В качестве примеров альтернативного анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов могло быть рассмотрено обращенное действие респираторных лактатдегидрогеназ Dld, LctD, и D-аланиндегидрогеназы DadA. В норме соответствующие ферменты катализируют хинон-зависимую конверсию D-молочной кислоты, L-молочной кислоты и D-аланина в пировиноградную кислоту [6, 13–15]. Однако в условиях анаэробноза их инвертированное хинол-зависимое действие, ведущее к образованию из пировиноградной кислоты соответствующих восстановленных продуктов, могло способствовать поддержанию

Таблица 2

**Характеристики анаэробного потребления глюкозы и продукции метаболитов сконструированными штаммами**

**Characteristics of anaerobic glucose consumption and metabolites production by the engineered strains**

Штамм	Потребление глюкозы, мМ	Выход метаболитов, моль/моль							Углеродный баланс, %
		пируват	лактат	ацетат	этанол	сукцинат	малат	аланин	
РА4	11,4±0,1	0,01±0,00	0,14±0,01	0,80±0,02	0,20±0,01	0,85±0,02	0,05±0,01	-	99
РА4F	11,6±0,2	0,06±0,01	0,15±0,01	0,38±0,01	0,21±0,01	0,18±0,01	0,09±0,01	0,29±0,01	63
РА4FP	19,0±0,4	0,55±0,01	0,18±0,01	0,15±0,01	0,27±0,01	0,23±0,01	0,03±0,01	0,41±0,01	89
РА4FPS	15,3±0,3	0,61±0,02	0,22±0,01	0,11±0,01	0,35±0,01	0,17±0,01	0,05±0,01	0,44±0,02	93

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

*Note:* carbon recovery was calculated as the ratio of total moles of carbon in the secreted products per moles of carbon in total glucose consumed and expressed in percentage basis. Standard deviations for three independent experiments are given.

внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса при утилизации глюкозы штаммом РА4 с нарушенной способностью к брожению. Действительно, штамм РА4, лишенный основной ферментативной лактатдегидрогеназы LdhA, в ходе анаэробной утилизации глюкозы синтезировал молочную кислоту с выходом 0,14 моль/моль (табл. 2), что указывает на формирование этого соединения за счет действия респираторных лактатдегидрогеназ. Анализ энантиомерного состава синтезированной штаммом молочной кислоты показал, что D- и L-стереоизомеры соответствующего вещества формировались в процентном соотношении 70:30 (табл. 3). Это указывало на участие как D-специфичной лактатдегидрогеназы Dld, так и L-специфичной лактатдегидрогеназы LctD в респираторной конверсии пировиноградной кислоты в соответствующее гидроксипроизводное. Вместе с тем аланин не был обнаружен среди продуктов анаэробной утилизации глюкозы штаммом РА4. Таким образом, вклад процессов альтернативного анаэробного дыхания, использующих пировиноградную кислоту в качестве внутреннего акцептора электронов, в формирование восстановленных продуктов утилизации глюкозы и, тем самым в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, составлял у штамма РА4 лишь ~11,1% (табл. 3).

С целью дальнейшей оценки потенциала соответствующих систем альтернативного анаэробного дыхания для поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в утилизирующих глюкозу штаммах *E. coli* дефицитных по основным путям брожения, способность штамма РА4 к окислению восстановленных эквивалентов в реакциях восстановительной ветви ЦТК была снижена в результате делеции генов *frdAB*, кодирующих компоненты фумаратредуктазы.

При инактивации фумаратредуктазы анаэробный синтез янтарной кислоты из глюкозы соответствующим штаммом РА4F резко снижался, хотя и не прекращался полностью (см. табл. 2). Одновременно резко падала секреция штаммом уксусной кислоты. Тем не менее данное соединение становилось основным продуктом анаэробной утилизации глюкозы сформированным штаммом. В то же время на фоне снижения общего количества синтезированных штаммом уксусной кислоты и этанола, доля восстановленного продукта, этанола, среди прямых производных ацетил-КоА сформированных штаммом, существенно возрастала. Это указывало на падение в штамме интенсивности реакций восстановительной ветви ЦТК и на избыточную конверсию пировиноградной кислоты в ацетил-КоА, превышающую потребности штамма в эндогенном CO<sub>2</sub>. Результатом такой избыточной генерации ацетил-КоА могла являться активация ГШ, приводящая к наблюдаемому анаэробному синтезу янтарной кислоты штаммом лишенным фумаратредуктазы. Однако формирование янтарной кислоты через реакции ГШ, в отличие от реакций восстановительной ветви ЦТК, не сопряжено с расходом восстановленных эквивалентов. Таким образом, вклад альтернативных путей их реокисления в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса должен был возрастать в штамме РА4F. Действительно, вторым по показателю молярного выхода продуктом, сформированным в ходе анаэробной утилизации глюкозы штаммом РА4F, являлся аланин (см. табл. 2). Соответствующая аминокислота была представлена смесью D- и L-стереоизомеров, сформированных в процентном соотношении 30/70 (см. табл. 3). Это указывало на то, что аланин был синтезирован штаммом в результате анаэробного дыхания с использованием

Таблица 3

**Формирование исследуемыми штаммами продуктов альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы**

**Formation of the products of alternative respiration with an internal electron acceptor by the studied strains during anaerobic glucose utilization**

Штамм	Доля лактата и аланина среди детектированных восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы, %	Соотношение D- и L-стереоизомеров, %	
		Аланин	Лактат
РА4	11,1	-	70/30
РА4F	48,0	30/70	70/30
РА4FP	52,6	30/70	70/30
РА4FPS	53,8	30/70	70/30

пировиноградной кислоты в качестве внутреннего акцептора электронов при последовательном действии респираторной D-аланиндегидрогеназы DadA и аланинрацемазы DadX, чьи гены составляют в *E. coli* единый *dadAX* оперон. В итоге, доля молочной кислоты и аланина, респираторно образованных штаммом PA4F, составляла 48% от восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы (см. табл. 3). Данный факт свидетельствует о способности процессов альтернативного анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов вносить значительный вклад в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса у штаммов *E. coli* с нарушенной способностью к брожению при утилизации глюкозы в бескислородных условиях.

Чтобы предотвратить туннелирование пировиноградной кислоты – субстрата соответствующих систем альтернативного анаэробного дыхания – в ацетил-КоА и одновременно снизить вклад ферментативного восстановления последнего в этанол в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, ген *pflB*, кодирующий пируват-формиат-лиазу, был инактивирован в штамме PA4F.

В результате, суммарная секреция прямых производных ацетил-КоА (уксусная кислота и этанол) при анаэробной утилизации глюкозы штаммом PA4FP заметно снижалась, на фоне возросшего накопления в среде пировиноградной кислоты (см. табл. 2). Однако, молярные выходы синтезированных штаммом этанола и, более того, янтарной кислоты возрастали по сравнению с родительским штаммом PA4F. Данный факт, по-видимому, был обусловлен сочетанием двух факторов. Синтез этанола и остаточных количеств уксусной кислоты был, по всей вероятности, обусловлен сохраняющейся в штамме базальной активностью ацетил-КоА, генерирующей пируватдегидрогеназы. В клетках *E. coli* основным ферментом, ответственным за анаэробную конверсию пировиноградной кислоты в ацетил-КоА, является пируват-формиат-лиаза, тогда как экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих соответствующий аэробный фермент, пируватдегидрогеназу, в отсутствие аэрации резко снижена [16]. Тем не менее экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона контролируется не только транскрипционными регуляторами ArgA и Fnr, но и зависит от CRP-цАМФ [17], и, следовательно, возрастает в штаммах с измененной функциональностью ФЕП-зависимой системы транспорта и фосфорилирования глюкозы. Кроме того, известно, что пируватдегидро-

геназный комплекс обладает высокой стабильностью, которая обеспечивает значительную остаточную активность аэробно экспрессированного фермента в условиях анаэробнозиса [18].

Пируватдегидрогеназа окислительно декарбоксилирует пировиноградную кислоту в ацетил-КоА с одновременным образованием NADH и CO<sub>2</sub>. Формирование за счет действия фермента, избыточного NADH, могло способствовать восстановительной конверсии основного продукта соответствующей реакции в этанол, тогда как сопряженная генерация CO<sub>2</sub> могла дополнительно стимулировать реокисление восстановленных эквивалентов в реакциях восстановительной ветви ЦТК. Ранее было показано, что в штаммах *E. coli* с инактивированными генами *frdAB* аэробная сукцинатдегидрогеназа способна функционально замещать отсутствующую фумаратредуктазу [19]. Высокий уровень аэробной экспрессии генов *sdh* оперона в клетках *E. coli*, дефицитных по фумаратредуктазе [20], мог обеспечить значительную остаточную анаэробную активность сукцинатдегидрогеназы у аэробно выращенного штамма PA4FP, приводя к анаэробному синтезу последним янтарной кислоты. Таким образом, активность латентных биохимических путей в значительной степени способствовала поддержанию внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в штамме PA4FP. Вместе с тем выход синтезированного штаммом аланина повышался до 0,41 моль на 1 моль потребленной глюкозы, и суммарный вклад альтернативного анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов в формирование восстановленных продуктов возрастал до 52,6% (см. табл. 3). В итоге поддержание окислительно-восстановительного баланса в штамме достигалось скорее за счет анаэробного дыхания, нежели за счет остаточных реакций брожения. В данной связи необходимо отметить, что анаэробное потребление глюкозы штаммом даже несколько возрастало, в сравнении с родительским (табл. 2).

Тем не менее сохраняющаяся продукция штаммом янтарной кислоты могла расцениваться как конкурентный дыхательный процесс по отношению к таковым, использующим пировиноградную кислоту в качестве внутреннего акцептора электронов. Поэтому, гены *sdhAB*, кодирующие каталитические компоненты сукцинатдегидрогеназы, были инактивированы в штамме PA4FP.

В результате данной модификации продукция янтарной кислоты штаммом PA4FPS значительно снижалась, при одновременном росте продукции

яблочной кислоты и этанола, указывая на остаточный биосинтез четырехуглеродных дикарбоксилатов именно через реакции ГШ, спровоцированные базальной активностью пируватдегидрогеназы (табл. 2). Одновременно наблюдался рост молярного выхода молочной кислоты и аланина, респираторно синтезированных штаммом (см. табл. 2 и табл. 3). Хотя вклад процессов альтернативного анаэробного дыхания с пировиноградной кислотой в качестве внутреннего акцептора электронов достигал у штамма PA4FPS ~54%, возросшая секреция соответствующего метаболита рекомбинантным штаммом, наряду с чуть снизившимся анаэробным потреблением глюкозы, указывала на неспособность соответствующих систем количественно использовать субстрат для полноценного поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса. По всей видимости, это было связано с недостаточностью нативных уровней экспрессии генов *dadA*, *dld* и *lctD* для обеспечения адекватной анаэробной активности соответствующих ферментов в клетках рекомбинантного штамма. Однако нельзя исключать, что уровни экспрессии соответствующих генов могут варьироваться как в зависимости от условий культивирования рекомбинантных штаммов, так и от конкретного набора генетических модификаций, глобально изменяющих функционирование их биохимического аппарата. Поэтому вклад выявленных процессов альтернативного анаэробного дыхания, использующих пировиноградную кислоту в качестве внутреннего акцептора электронов в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в клетках перспективных рекомбинантных продуцентов, может быть существенно выше даже того уровня, который продемонстрирован в настоящем исследовании с использованием модельных штаммов. Это свидетельствует о рациональности инактивации соответствующих биохимических путей в ходе конструирования промышленных рекомбинантных продуцентов восстановленных хмикатов на основе клеток *E. coli*.

В результате проведенного исследования выявлена роль альтернативных систем анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов в штаммах *E. coli* с нарушенной способностью к брожению при анаэробной утилизации ими глюкозы. Процессы анаэробного дыхания, использующие пировиноградную кислоту в качестве внутреннего акцептора электронов, могут вносить большой вклад в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в со-

ответствующих рекомбинантных штаммах, чем остаточные реакции брожения. Активность соответствующих систем может оказывать значительное влияние на координацию процессов утилизации углеводного субстрата с протеканием внутриклеточных окислительно-восстановительных реакций в условиях анаэробноза у штаммов *E. coli*, дефицитных по путям смешанно-кислотного брожения.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-04-01222).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Becker J., Wittmann C. From systems biology to metabolically engineered cells-an omics perspective on the development of industrial microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2018, 45, 180–188. doi: 10.1016/j.mib.2018.06.001
2. Chen X., Zhou L., Tian K., et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol. Adv.*, 2013, 31(8), 1200–1223. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.02.009
3. Neidhardt F., Curtiss R. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup>edn., Washington, USA, ASM Press., 1996, 2822.
4. Sauer U., Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29(4), 765–794. doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.002
5. Matsumoto T., Tanaka T., Kondo A. Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a “microbial chassis” for biochemical production. *Bioresour Technol.*, 2017, 245(B), 1362–1368. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.008
6. Uden G., Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 1320, 217–234. doi: 10.1016/S0005-2728(97)00034-0
7. Моржакова А.А., Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. Рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения, способные к быстрому аэробному росту на глюкозе при сниженном эффекте Крэбтри. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2013, 49(2), 136–143. doi: 10.7868/S0555109913020116
8. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup>edn. New York., USA: Cold Spring Harbor Laboratory. Press., 1989, 1659.
9. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В. и др. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме. *Мол. биология.*, 2005, 39(5), 823–831.

10. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97(12), 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
11. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., и др. Новый метод конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами в бактериальной хромосоме. *Мол. биология.*, 2009, 43(3), 547–555.
12. Fischer C.R., Tseng H.C., Tai M., et al. Assessment of heterologous butyrate and butanol pathway activity by measurement of intracellular pathway intermediates in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 88, 1 265–275. doi: 10.1007/s00253-010-2749-2
13. Dong J.M., Taylor J.S., Latour D.J., et al. Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1993, 75(20), 6671–6678.
14. Wallace B.J., Young I.G. Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA-menA* double quinone mutant. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1977, 461(1), 84–100.
15. Jones H., Venables W.A. Effects of solubilisation on some properties of the membrane-bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 1983, 151(2), 189–192.
16. Soini J., Falschlehner C., Liedert C., et al. Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110. *Microb. Cell. Fact.*, 2008 7(30). doi: 10.1186/1475-2859-7-30
17. Zhang Z., Gosset G., Barabote R., et al. Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2005, 187(3), 980–990. doi: 10.1128/JB.187.3.980-990.2005
18. De Graef M.R., Alexeeva S., Snoep J.L., Teixeira de Mattos M.J. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1999, 181(8), 2351–2357.
19. Maklashina E., Berthold D.A., Cecchini G. Anaerobic expression of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: functional replacement of fumarate reductase in the respiratory chain during anaerobic growth. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(22), 5989–5996.
20. Steinsiek S., Frixel S., Stage S., SUMO, Bettenbrock K. Characterization of *E. coli* MG1655 and *frdA* and *sdhC* mutants at various aerobiosis levels. *J. Biotechnol.*, 2011, 154(1), 35–45. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.015

## Activation of Alternative Respiration with Internal Electron Acceptor upon Anaerobic Glucose Utilization in *Escherichia coli* strains with Impaired Fermentation Ability

A.Yu. SKOROKHODOVA<sup>1,\*</sup>, A.V. SUKHOZHENKO<sup>1</sup>, A.Yu. GULEVICH<sup>1</sup>, and V.G. DEBABOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute», 117545, Moscow Russia

\*e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Received December 3, 2018

Accepted December 10, 2018

**Abstract**—The activation of alternative respiration with an internal electron acceptor upon anaerobic utilization of glucose in *Escherichia coli* strains with the impaired fermentation ability has been studied. It was found out that the respiration processes utilizing pyruvic acid as an endogenous electron acceptor can markedly contribute to the maintenance of the anaerobic redox balance in *E. coli* strains deficient in mixed acid fermentation pathways. The sequential inactivation of the pathways of anaerobic dissimilation of pyruvate and impairment of the functionality of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle led to the increase in the contribution of the respiratory formation of lactic acid and alanine to the biosynthesis of the reduced products of anaerobic glucose utilization by the strains from 11 to 54%. The analysis of the enantiomeric composition of the lactic acid and alanine secreted by the strains demonstrated that D-lactate dehydrogenase (Dld), L-lactate dehydrogenase (LctD), and D-alanine dehydrogenase (DadA) participated in the biosynthesis of the respective compounds.

**Key words:** *Escherichia coli*, glucose, fermentation, respiration, metabolic engineering, pyruvate, lactate, alanine.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-2-16-24