

УДК 577.121

Оценка анаэробной утилизации глюкозы штаммами *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению при дыхании с внешним и внутренним акцептором электронов

© 2020 А.Ю. СКОРОХОДОВА^{1,*}, А.Ю. ГУЛЕВИЧ¹, В.Г. ДЕБАБОВ¹¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545

*e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 09.12.2019 г.

Принята к публикации 11.12.2019 г.

Исследованы характеристики анаэробной утилизации глюкозы и продукции метаболитов рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению при дыхании с пируватом в качестве внутреннего и нитратом в качестве внешнего акцептора электронов. Установлено, что процессы дыхания, использующие пирувиноградную кислоту в качестве эндогенного акцептора электронов и ведущие к образованию лактата и аланина, способны к взаимной интерференции. При исключении из состава среды ионов аммония природные уровни активности респираторных лактатдегидрогеназ Dld и LldD в штаммах *E. coli*, дефицитных по путям смешанного брожения, способны практически полностью компенсировать потерю активности респираторной аланиндегидрогеназы DadA, но недостаточны для полноценного поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса. Добавление в среду ионов нитрата подавляло продукцию штаммами аланина несмотря на доступность ионов аммония, тогда как функциональность процессов респираторного восстановления эндогенного пирувата в лактат сохранялась в исследованных штаммах даже в присутствии сильного экзогенного оксиданта. Дыхание с внешним акцептором электронов стимулировало в штаммах активность окислительного цикла трикарбоновых кислот. Анаэробное потребление глюкозы штаммом с разомкнутым циклом трикарбоновых кислот повышалось при нитратном дыхании, но лимитировалось избыточной генерацией восстановительных эквивалентов в остальных реакциях цикла.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, глюкоза, брожение, дыхание, пируват, лактат, аланин, нитрат, аммоний.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-25-33

Замена нефтехимического синтеза востребованных промышленностью органических соединений соответствующими биотехнологическими процессами является важной частью современных стратегий устойчивого развития. Многие промышленно-значимые химикаты являются более восстановленными соединениями по сравнению с сахарами, традиционными субстратами микробной биотехнологии, что предполагает необходимость их микробиологического синтеза в условиях анаэробно-анаэробно-анаэробно для обеспечения высокой эффективности конверсии субстрата в целевой продукт. Выбор перспективных микроорганизмов

для создания эффективных продуцентов восстановленных веществ ограничивается, таким образом, представителями облигатных или же факультативных анаэробов.

Широко используемая в промышленной биотехнологии факультативно анаэробная бактерия *Escherichia coli* [1, 2] при анаэробной утилизации сахаров осуществляет смешанное брожение, процесс направленный на поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса [3]. При инактивации соответствующих метаболических путей, в общем случае являющихся конкурентными по отношению к биосинтезу целевого

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГШ – глиоксилатный шунт; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

продукта [4], клетки *E. coli* теряют способность к росту в анаэробных условиях [5] и практически полностью прекращают потребление углеводов [6] в результате невозможности эффективного реокисления восстановительных эквивалентов, формирующихся в ходе катаболизма углеродного субстрата. Однако, необходимый внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс у штаммов *E. coli* с нарушенной способностью к брожению может быть в той или иной степени восстановлен за счет анаэробного дыхания с внешними [7] или внутренними акцепторами [8] электронов. В случае внутренних акцепторов электронов наиболее предпочтительными оксидантами для *E. coli* являются эндогенные пируват и фумарат, а в случае внешних – экзогенные фумарат и нитрат [7–9].

Сформированные в результате потребления источника углерода пируват и фумарат являются прямыми или опосредованными предшественниками в биосинтезе широкого спектра целевых продуктов промышленной микробной биотехнологии. Следовательно, их вовлечение в дыхание ведет к неизбежному падению эффективности микробиологического синтеза желаемого вещества в результате непродуктивного расхода субстрата. С другой стороны, присутствие в среде ионов нитрата, прямого внешнего акцептора электронов, и/или аммония, участвующего в альтернативном дыхании с пируватом в качестве внутреннего акцептора электронов, также может негативно влиять на продукцию целевых соединений, снижая внутриклеточную доступность необходимых восстановленных эквивалентов за счет активации конкурентных дыхательных процессов. Целесообразность учета соответствующих факторов при конструировании промышленных штаммов *E. coli* для эффективной продукции восстановленных соединений предполагает необходимость первичного изучения их влияния на характер потребления углеводного субстрата базовыми мутантами, дефицитными по путям смешанного брожения.

Цель работы – оценить влияние дыхания с внешним и внутренним акцептором электронов на анаэробную утилизацию глюкозы и продукцию метаболитов штаммами *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды

В работе использовали ранее сконструированные штаммы *E. coli* PA4FP (MG1655 Δ ackA-pta, Δ proxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_Lglk, P_{lac}galP, Δ frdAB, Δ pf1B) и PA4FPS (MG1655 Δ ackA-pta, Δ proxB,

Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_Lglk, P_{lac}galP, Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB) [8], обладающие модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы, делетированной пируват-формат-лиазой и инактивированными путями смешанного брожения. Бактерии выращивали в богатой среде LB или минимальной солевой среде M9 [10], содержащей 2 г/л глюкозы.

Реагенты

Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты производства «Panreac» (Испания) и «Sigma» (США).

Культивирование штаммов

Клетки штаммов 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, и в модифицированных вариантах среды M9, дополнительно содержащих 10 мМ нитрата натрия или же не содержащих хлорида аммония, в присутствии 10 г/л глюкозы. В дальнейшем культуры инкубировали в течение 24 ч. в пробирках объемом 15 мл, закрытых заворачивающимися 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+ (8%) (300 x 7,8 mm, 8 μ m, 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 mm, 5 µm, Waters, USA). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода (объемное соотношение 75:25) при скорости потока 1 мл/мин.

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

Энантиомерный состав секретированных штаммами молочной кислоты и аланина определяли методом хиральной лиганднообменной ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, как описано ранее [8].

Результаты и обсуждение

При анаэробной утилизации углеводов штаммы *E. coli* дикого типа реализуют процесс смешанного брожения, ведущий к формированию, в различных соотношениях в зависимости от конкретного источника углерода, ацетата, этанола, лактата, формиата и сукцината. В частности, в результате анаэробного потребления глюкозы клетки *E. coli* продуцируют, в общем случае, ацетат, этанол, лактат и формиат в соотношении 1:1:2:2, сукцинат является минорным продуктом с долей составляющей лишь около 5% от общего количества секретированных метаболитов [3]. Физиологической функцией брожения является поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, позволяющего потреблять субстраты той или иной степени окисления в условиях анаэробнозиса. С биохимической точки зрения брожение является способом реокисления избыточных восстановленных эквивалентов, сформированных в результате катаболизма субстрата, за счет формирования и секреции его восстановленных производных. Основные реакции образования соответствующих продуктов у *E. coli* используют в качестве предшественников ключевые интермедиаты центрального метаболизма, пируват/фосфоенолпируват, оксалоацетат, а также ацетил-КоА, и сопровождаются расходом NADH, образующегося в клетках в качестве первичного восстановленного эквивалента при катаболизме углеводов.

В настоящей работе оценивали анаэробную утилизацию глюкозы штаммами *E. coli* PA4FP и PA4FPS с нарушенной способностью к брожению. Общая схема центрального метаболизма соответствующих штаммов при утилизации глюкозы в анаэробных условиях представлена на рис. 1. Основные пути смешанного брожения, ответственные за формирование уксусной и молочной

кислот, а также этанола, были инактивированы в этих штаммах за счет делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, кодирующих ключевые ферменты, вовлекающие в соответствующие реакции пируват и ацетил-КоА. Функциональность восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), приводящей к образованию сукцината через промежуточную генерацию малата, была нарушена в штаммах в результате делеции генов *frdAB* и *sdhAB*, кодирующих компоненты фумаратредуктазы и сукцинатдегидрогеназы. При этом интерферирующий вклад реакций глиоксилатного шунта (ГШ) в биосинтез малата и сукцината у штаммов был снижен благодаря инактивации гена *pflB*, кодирующего пируват-формиат-лиазу, основной фермент, снабжающий *E. coli* ацетил-КоА в условиях анаэробнозиса. Система транспорта и фосфорилирования глюкозы в штаммах была модифицирована для снижения ингибирования первых стадий гликолиза АТФ, генерируемым на его последующих стадиях [11]. Единственной возможностью анаэробного реокисления NADH в штаммах оставалось протекание минорных реакций восстановительной ветви ЦТК, в первую очередь восстановление оксалоацетата в малат. Однако, интенсивность соответствующей реакции в штаммах снижена при отсутствии в среде внешнего источника CO₂, в результате ограниченного внутриклеточного формирования оксалоацетата. Альтернативным способом поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса при утилизации глюкозы в бескислородных условиях в подобных штаммах является анаэробное дыхание [8]. Внутренними акцепторами электронов в этом случае в первую очередь служат пируват, который превращается в лактат или аланин в результате инвертированного хинол-зависимого действия респираторных лактатдегидрогеназ Dld, LldD, и D-аланиндегидрогеназы DadA, и фумарат, трансформируемый в сукцинат под действием остаточной активности сукцинатдегидрогеназы. Хинолы, утилизируемые соответствующими реакциями, формируются NADH:хинон-оксидоредуктазами (NADH-дегидрогеназами). Предпочтительным внешним акцептором электроном для *E. coli* в отсутствие аэрации является нитрат.

Так как известно, что штаммы *E. coli*, лишенные основных путей брожения, не способны расти анаэробно [5], для оценки анаэробного потребления глюкозы рекомбинантными штаммами за счет дыхания с внутренним и внешним акцептором электронов использовали двух-стадийную аэробно-анаэробную ферментацию, которая включала стадию аэробного накопления биомассы и последующую анаэробную инкубацию полученных

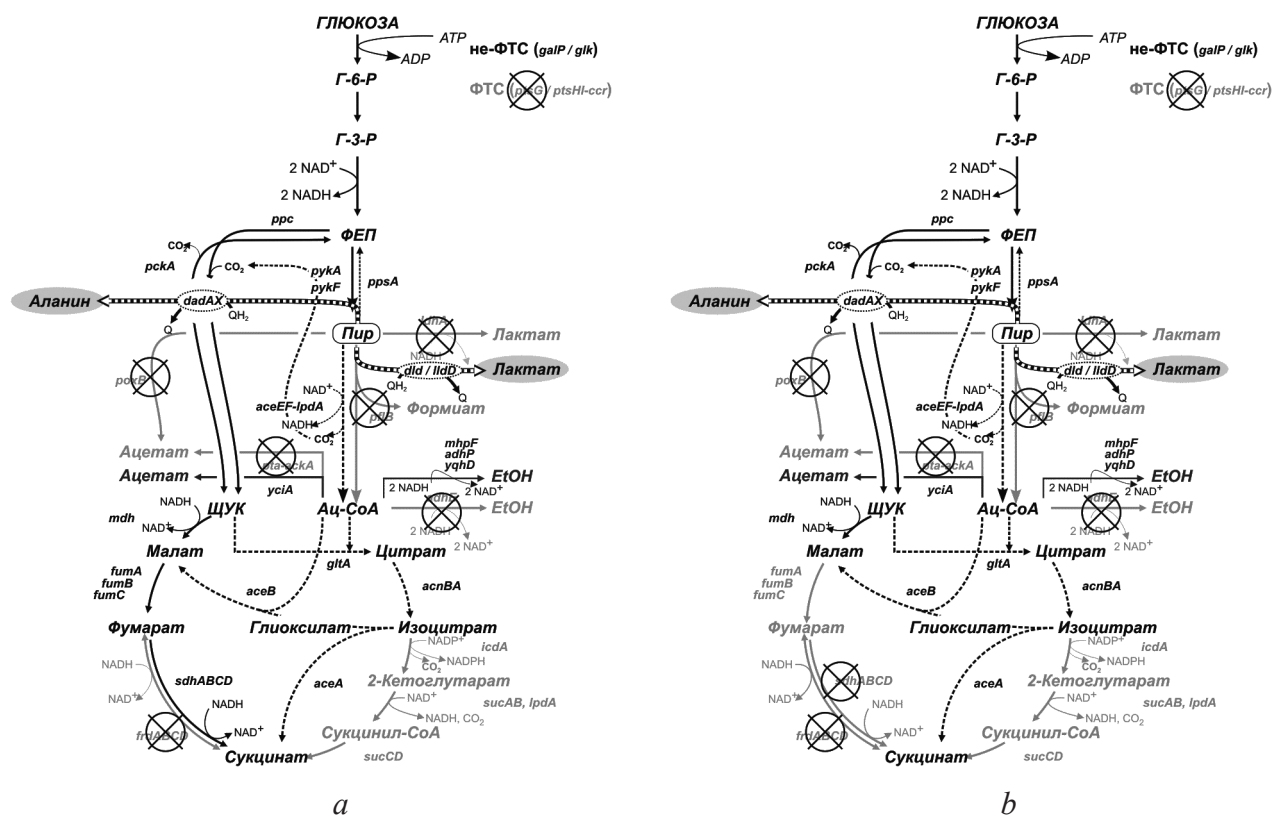


Рис. 1. Центральный метаболизм штаммов *E. coli* PA4FP (a) и PA4FPS (b) при утилизации глюкозы в анаэробных условиях. Ключевые ферменты, вовлеченные в катализ представленных реакций, обозначены наименованиями соответствующих генов: *aceA*, изоцитратлиаза; *aceB*, малатсинтаза A; *aceEF-lpdA*, пируватдегидрогеназа; *ackA*, ацетаткиназа; *acnBA*, аконитазы A и B; *adhE*, бифункциональная алкоголь/альдегид дегидрогеназа; *adhP*, ацетальдегидредуктаза; *dadA*, D-аланиндегидрогеназа; *dadX*, аланинрацемеза 2; *dld*, D-лактатдегидрогеназа; *fumA, fumB, fumC*, изоферменты фумараты; *frdABCD*, фумаратредуктаза; *galP*, H⁺-симпортер галактозы; *glk*, АТФ-зависимая глюкокиназа; *gltA*, цитратсинтаза; *icdA*, изоцитратдегидрогеназа; *ldhA*, лактатдегидрогеназа; *lldD*, L-лактатдегидрогеназа; *mdh*, малатдегидрогеназа; *mhpF*, ацетальдегиддегидрогеназа 2; *pckA*, фосфоенолпируваткарбоксихиназа; *pflB*, пируват-формат-лиаза; *poxB*, пируватоксидаза; *ppc*, фосфоенолпируваткарбоксилаза; *ppsA*, фосфоенолпируватсинтаза; *pta*, фосфотрансацетилаза; *ptsG*, пермеаза глюкозы; *pykA, pykF* изоферменты пируваткиназы; *sdhABC*, сукцинатдегидрогеназа; *sucAB, lpdA*, 2-кетоглутарат дегидрогеназа; *sucCD*, сукцинил-КоА синтаза; *yciA*, ацил-КоА тиоэстераза; *yqhD*, альдегидредуктаза. Ключевые метаболиты представлены следующими аббревиатурами: *Ac-CoA*, ацетил-КоА; *G-3-P*, глюкозо-3-фосфат; *G-6-P*, глюкозо-6-фосфат; *EtOH*, этанол; *PEP*, фосфоенолпируват; *ЩУК*, щавелевоуксусная кислота; *ФТС*, фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система. Делетированные гены отмечены перекрещенными окружностями. Пунктирные стрелки обозначают реакции со сниженной интенсивностью. Серым цветом представлены реакции, гены соответствующих ферментов, субстраты, продукты и кофакторы, которые отсутствуют или неактивны в исследованных штаммах. Змееподобными стрелками обозначены реакции альтернативного дыхания с пирувиноградной кислотой в качестве внутреннего акцептора электронов. Соответствующие продукты представлены на сером фоне.

Fig. 1. Central metabolism in *E. coli* strains PA4FP (a) and PA4FPS (b) during glucose utilization under anaerobic conditions. Key enzymes involved in the catalysis of the represented reactions are designated by the names of the corresponding genes: *aceA*, isocitrate lyase; *aceB*, malate synthase A; *aceEF-lpdA*, pyruvate dehydrogenase; *ackA*, acetate kinase; *acnBA*, aconitases A and B; *adhE*, bifunctional alcohol/aldehyde dehydrogenase; *adhP*, acetaldehyde reductase; *dadA*, D-alanine dehydrogenase; *dadX*, alanine racemase 2; *dld*, D-lactate dehydrogenase; *fumA, fumB, fumC*, fumarate isozymes; *frdABCD*, fumarate reductase; *galP*, H⁺-symporter of galactose; *glk*, ATP-dependent glucokinase; *gltA*, citrate synthase; *icdA*, isocitrate dehydrogenase; *ldhA*, lactate dehydrogenase; *lldD*, L-lactate dehydrogenase; *mdh*, malate dehydrogenase; *mhpF*, acetaldehyde dehydrogenase 2; *pckA*, phosphoenolpyruvate carboxykinase; *pflB*, pyruvate formate lyase; *poxB*, pyruvate oxidase; *ppc*, phosphoenolpyruvate carboxylase; *ppsA*, phosphoenolpyruvate synthetase; *pta*, phosphotransacetylase; *ptsG*, glucose permease; *pykA, pykF* pyruvate kinase isozymes; *sdhABC*, succinate dehydrogenase; *sucAB, lpdA*, 2-ketoglutarate dehydrogenase; *sucCD*, succinyl-CoA synthetase; *yciA*, acyl-CoA thioesterase; *yqhD*, aldehyde reductase. Abbreviations of key metabolites are: *Ac-CoA*, acetyl-CoA; *G-3-P*, glucose-3-phosphate; *G-6-P*, glucose-6-phosphate; *EtOH*, ethanol; *PEP*, phosphoenolpyruvate; *ЩУК*, oxaloacetate; *ФТС*, phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. The deleted genes are marked with the crossed circles. Dotted arrows designate reactions with decreased intensity. The reactions, as well as the genes of the respective enzymes, substrates, products, and cofactors, that are absent or inactive in the studies strains are shown in grey. Snake-like arrows indicate the reactions of alternative respiration with pyruvate as internal electron acceptor. The respective products represented on the grey background.

Таблица 1

Характеристики анаэробного потребления глюкозы и продукции метаболитов исследуемыми штаммами в присутствии и в отсутствии в среде ионов аммония и нитрата

Characteristics of anaerobic glucose consumption and metabolites production by the studied strains in the presence and in the absence in the medium of nitrate and ammonium ions

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Выход пирувата, моль/моль	Выход лактата, моль/моль	Выход ацетата, моль/моль	Выход этанола, моль/моль	Выход сукцината, моль/моль	Выход малата, моль/моль	Выход аланина, моль/моль	Углеродный баланс, %
+ NH ₄ ⁺ , -NO ₃ ⁻									
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
-NH ₄ ⁺ , -NO ₃ ⁻									
РА4FP	12,7±0,3	0,68±0,01	0,31±0,01	0,17±0,01	0,33±0,01	0,27±0,01	0,05±0,01	–	87
РА4FPS	7,5±0,2	0,90±0,02	0,41±0,01	–	0,43±0,02	0,11±0,01	0,08±0,01	–	93
+ NH ₄ ⁺ , + NO ₃ ⁻									
РА4FP	18,0±0,4	0,72 ± 0,01	0,42 ± 0,01	–	–	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,01	–	72
РА4FPS	21,3±0,4	1,11 ± 0,02	0,30 ± 0,01	–	–	0,26 ± 0,01	0,06 ± 0,01	–	92

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.

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 CO₂, ограничивающем формирование оксалоацетата и, соответственно, интенсивность протекающих остаточных реакций восстановительной ветви ЦТК, штамм РА4FP потреблял в условиях анаэробно-биоза чуть менее половины доступной глюкозы (~19,0 мМ), секретировав респираторно сформированные аланин и лактат в качестве основных восстановленных продуктов (табл. 1). Доля соответствующих соединений среди восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы, сформированных штаммом, составляла 52,6% (табл. 2), указывая на значительный вклад процессов дыхания с пируватом в качестве внутреннего акцептора электронов в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса. В то же время, штамм секретировал в виде пирувата около четверти потребленной глюкозы. Это свидетельствовало о том, что активности лактат- и аланин-дегидрогеназ в штамме были недостаточны для количественного вовлечения указанного метаболита в реакции формирования соответствующих восстановленных продуктов и,

Таблица 2

Формирование исследуемыми штаммами продуктов альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы в присутствии и в отсутствии в среде ионов аммония и нитрата

Formation of the products of alternative respiration with an internal electron acceptor by the studied strains during anaerobic glucose utilization in the presence and in the absence in the medium of nitrate and ammonium ions

Штамм	Доля аланина и/или лактата среди детектированных восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы, %	Доля аланина и/или лактата среди всех детектированных продуктов анаэробной утилизации глюкозы, %
+ NH ₄ ⁺ , -NO ₃ ⁻		
РА4FP	52,6	32,5
РА4FPS	53,8	33,9
- NH ₄ ⁺ , -NO ₃ ⁻		
РА4FP	32,7	17,2
РА4FPS	40,0	21,3
+ NH ₄ ⁺ , + NO ₃ ⁻		
РА4FP	66,1	31,0
РА4FPS	48,1	17,3

соответственно, для полного поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса. Действительно, штамм синтезировал, значительные количества иных восстановленных продуктов, в первую очередь этанола и сукцината.

Последнее, по-видимому, обусловлено сочетанием следующих факторов. Синтез этанола и остаточных количеств уксусной кислоты был, по всей вероятности, результатом проявления активности сохраняющейся в штамме на относительно высоком уровне пируватдегидрогеназы, генерирующей ацетил-КоА. В клетках *E. coli* основным ферментом, превращающим пируват в ацетил-КоА при анаэробии, является пируват-формиат-лиаза, тогда как экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих соответствующий аэробный ферментативный комплекс, пируватдегидрогеназу, в отсутствие аэрации резко снижена [12]. Однако, экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона зависит от CRP-цАМФ [13] и возрастает в штаммах с измененной функциональностью фосфоенолпируват-зависимой системы транспорта и фосфорилирования глюкозы. Кроме того, пируватдегидрогеназный комплекс довольно стабилен, что обеспечивает значительную остаточную активность аэробно экспрессированного фермента при анаэробии [14]. В отличие от пируват-формиат-лиазы, пируватдегидрогеназа окислительно декарбоксилирует пируват в ацетил-КоА с одновременным образованием NADH и CO₂. Формирование за счет действия фермента избыточного NADH могло способствовать восстановительной конверсии основного продукта соответствующей реакции в этанол. С учетом инактивации в штамме PA4FP гена основной алкоголь/альдегид дегидрогеназы, *adhE*, секреция этанола была, очевидно, обусловлена действием таких альтернативных ферментов, как ацетальдегиддегидрогеназа MhpF [15, 16] и альдегидредуктазы AdhP [17, 18] и YqhD [19, 20]. Остаточные количества ацетата формировались из ацетил-КоА под действием неспецифичной ацил-КоА тиаэстеразы YciA [21, 22]. С другой стороны, генерация пируватдегидрогеназой CO₂ могла дополнительно стимулировать реокисление восстановленных эквивалентов в остаточных реакциях восстановительной ветви ЦТК. Известно, что в штаммах *E. coli* с инактивированными генами *frdAB* аэробная сукцинатдегидрогеназа способна функционально замещать фумаратредуктазу [23]. Повышенная аэробная экспрессия генов *sdh* оперона в клетках *E. coli*, дефицитных по фумаратредуктазе [24], могла обеспечить значительную остаточную активность сукцинатдегидрогеназы у аэробно выращенного штамма PA4FP, приводя, в результате, к анаэробному синтезу последним янтарной кислоты.

Действительно, секреция янтарной кислоты штаммом PA4FPS с дополнительно инактивированной сукцинатдегидрогеназой была значительно ниже (табл. 1). Выход респираторно сформированных лактата и аланина возрастал незначительно, на фоне роста выхода этанола и снижения потребления штаммом глюкозы. Последнее вновь подтверждало неспособность систем анаэробного дыхания, использующих пируват в качестве внутреннего акцептора электронов, количественно потреблять субстрат для полноценного поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса. Тем не менее, вклад дыхательных процессов, ведущих к образованию лактата и аланина в поддержание соответствующего баланса в штамме, был довольно высок. Доля этих соединений составляла 53,8% от восстановленных продуктов и возросла до 33,9% от всех метаболитов, секретированных штаммом в ходе анаэробной утилизации глюкозы (табл. 2). Кроме того, нельзя исключить, что уровни экспрессии генов *dld*, *lldD* и *dada*, могут варьироваться в зависимости от условий культивирования рекомбинантных штаммов, а также, что в зависимости от состава сред активности респираторных лактат- и аланин-дегидрогеназ могут интерферировать между собой.

С целью проверки этой возможности, анаэробное потребление глюкозы штаммами PA4FP и PA4FPS оценивали в модифицированном варианте среды M9, не содержащем ионов аммония, необходимого для респираторного восстановления пирувата в D-аланин под действием аланиндегидрогеназы DadA.

В соответствующих условиях анаэробная секреция аланина штаммами ожидаемо отсутствовала. Потребление глюкозы обоими штаммами падало практически в два раза, тогда как продукция метаболитов несколько различалась (табл. 1). Штамм PA4FP синтезировал этанол и сукцинат с заметно возросшими выходами. Это свидетельствовало о частичной компенсации в штамме отсутствующей возможности реокисления восстановленных эквивалентов при формировании аланина за счет частичной активации дыхания с фумаратом в качестве внутреннего акцептора электронов в CO₂-зависимой восстановительной ветви ЦТК. Вместе с тем, несмотря на то, что выход лактата возрастал в 1,7 раза, доля этого респираторно сформированного соединения составляла лишь 17,2% от восстановленных продуктов и падала до 32,7% от всех метаболитов, секретированных штаммом (табл. 2). При инактивации сукцинатдегидрогеназы и, соответственно, исключении возможности анаэробного дыхания с фумаратом в качестве внутреннего акцептора электронов, штамм PA4FPS

синтезировал сукцинат с резко упавшим выходом и в количествах практически эквимолярных малату. Это указывало на то, что соответствующие дикарбоксилаты формировались в штамме по ГШ, не расходуящему восстановленных эквивалентов. Соответственно, штамм секретировал возросшее количество продуктов последних доступных реакций, способных в той или иной степени обеспечить поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, лактата и этанола. Следует отметить, что доля сформированного штаммом лактата достигала 40% от восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы. Таким образом, можно заключить, что респираторные лактатдегидрогеназы были способны практически полностью компенсировать потерю активности респираторной аланиндегидрогеназы в штамме PA4FPS. Однако, низкое потребление штаммом глюкозы, наряду с резко возросшей секрецией пирувата, демонстрировало истощение потенциала процессов анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов, независимых от наличия в среде медиаторов, для поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса у соответствующего рекомбинанта с нарушенной способностью к брожению.

Альтернативой анаэробному дыханию с внутренним акцептором электронов является дыхание с экзогенным оксидантом. В бескислородных условиях предпочтительным внешним акцептором электронов для клеток *E. coli* служит растворенный в среде нитрат.

Для оценки возможности штаммов *E. coli*, дефицитных по путям смешанного брожения, к поддержанию внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса при анаэробной утилизации глюкозы за счет комбинированного действия процессов анаэробного дыхания, оценивали утилизацию углеводного субстрата штаммами PA4FP и PA4FPS в минимальной среде M9, дополнительно содержащей 10 мМ нитрата натрия.

В присутствии в среде внешнего акцептора электронов, штамм PA4FP потреблял количество глюкозы сравнимое с таковым, продемонстрированным в немодифицированной среде. В то же время анаэробное потребление глюкозы штаммом PA4FPS несколько возрастало, превышая показатели штамма PA4FP (табл. 1). Это было вызвано, в первую очередь, различным перераспределением потоков углерода в штаммах в ответ на изменившиеся условия. Несмотря на присутствие в среде аммония, накопления аланина при культивировании штаммов не наблюдалось. Секретция прямых производных ацетил-КоА, ацетата и этанола, также отсутствовала. Вместе с тем, синтез сукцината

штаммом PA4FP заметно снизился, в то время как формирование этого соединения штаммом PA4FPS возросло (табл. 1). Неизменное значение углеродного баланса, продемонстрированное штаммом PA4FPS, и падение соответствующего значения в случае штамма PA4FP (табл. 2), свидетельствовали об интенсификации в штаммах, за счет активного дыхания с внешним акцептором электронов, окислительной ветви ЦТК. Однако, функционирование полного окислительного ЦТК так же, как и действие пируватдегидрогеназы сопряжено с генерацией восстановленных эквивалентов. В результате, именно полная оборачиваемость цикла приводила к избыточной генерации восстановленной энергии в штамме PA4FP и, как следствие, снижению потреблению глюкозы в сравнении с штаммом PA4FPS, обладающим разорванным ЦТК из-за делеции генов сукцинатдегидрогеназы и фумаратредуктазы. В связи с этим следует отметить, что продукция лактата, основного восстановленного продукта, синтезированного штаммами, была выше для штамма PA4FP. Более того, доля этого вещества составляла 66,1% от секретированных штаммом восстановленных продуктов анаэробной утилизации глюкозы. Следует подчеркнуть, что лактат был сформирован штаммами в присутствии в среде нитрата. Это указывало на то, что в определенных условиях системы альтернативного анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов могут функционировать в штаммах *E. coli*, с нарушенной способностью к брожению, даже при наличии в среде внешнего акцептора.

Результаты работы свидетельствуют о значительном потенциале процессов анаэробного дыхания как с внешним, так и с внутренним акцептором электронов для поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса при утилизации глюкозы штаммами *E. coli*, с нарушенной способностью к брожению. Продемонстрирована способность соответствующих процессов значимо влиять на характер анаэробного потребления углеводного субстрата и продукцию метаболитов мутантами в результате перераспределения потоков углерода между магистральными и латентными биохимическими путями. Установлена способность отдельных процессов альтернативного анаэробного дыхания с пируватом в качестве внутреннего акцептора электронов сохранять функциональность в рекомбинантных штаммах *E. coli*, дефицитных по путям смешанного брожения, даже при анаэробной утилизации глюкозы в присутствии в среде сильного экзогенного оксиданта. Эти факторы следует учитывать при конструировании промышленных штаммов *E. coli* для эффективной продукции восстановленных соединений.

Пировиноградная кислота – ключевой предшественник в биосинтезе множества востребованных продуктов промышленной микробной биотехнологии. Поэтому исключение возможности протекания указанных процессов поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса должно способствовать, в первую очередь, снижению ее непродуктивного расхода в рекомбинантах, и кроме того уменьшать зависимость биосинтетических показателей продуцентов от состава ферментационных сред, заметно влияющего на себестоимость получения целевых продуктов микробиологического синтеза, особенно в условиях крупнотоннажного производства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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, 2ndedn, Washington, USA, ASM Press., 1996, 2822 p.
4. 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
5. 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, 265–275. doi: 10.1007/s00253-010-2749-2
6. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. Влияние вне- и внутриклеточного источников CO₂ на анаэробную утилизацию глюкозы штаммами *Escherichia coli*, дефицитными по независимым от карбоксилирования путям брожения. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2017, 53(3), 278–284. doi: 10.7868/S0555109917030151
7. 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
8. Скороходова А.Ю., Сухоженко А.В., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. Активация альтернативного дыхания с внутренним акцептором электронов при анаэробной утилизации глюкозы у штаммов *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению. *Биотехнология*, 2019, 35(2), 16–24. doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-16-24
9. Kracke F., Vassilev I., Krömer J.O. Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Front. Microbiol.*, 2015, 6:575. doi: 10.3389/fmicb.2015.00575
10. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2ndedn. New York., USA: Cold Spring Harbor Laboratory. Press., 1989, 1659 p.
11. Koeblmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., et al. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.*, 2002, 184(14), 3909–3916. doi: 10.1128/JB.184.14.3909-3916.2002
12. 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
13. 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
14. De Graef M.R., Alexeeva S., Snoep J.L., et al. 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.
15. Ferrandez A., Garcia J.L., Diaz E. Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(8), 2573–2581.
16. Dellomonaco C., Clomburg J.M., Miller E.N., Gonzalez R. Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals. *Nature*, 2011, 476(7360), 355–359. doi: 10.1038/nature10333
17. Shafiqat J., Hoog J.O., Hjelmqvist L., et al. An ethanol-inducible MDR ethanol dehydrogenase/acetalddehyde reductase in *Escherichia coli*: structural and enzymatic relationships to the eukaryotic protein forms. *Eur. J. Biochem.*, 1999, 263(2), 305–311.
18. Rodriguez G.M., Atsumi S. Isobutyraldehyde production from *Escherichia coli* by removing aldehyde reductase activity. *Microb. Cell. Fact.*, 2012, 11:90. doi: 10.1186/1475-2859-11-90
19. Jarboe L.R. YqhD: a broad-substrate range aldehyde reductase with various applications in production of biorenewable fuels and chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 89(2), 249–257. doi: 10.1007/s00253-010-2912-9
20. Atsumi S., Wu T.Y., Eckl E.M., et al. Engineering the isobutanol biosynthetic pathway in *Escherichia coli* by comparison of three aldehyde reductase/alcohol dehydrogenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 85(3), 651–657. doi: 10.1007/s00253-009-2085-6

21. Zhuang Z., Song F., Zhao H., et al. Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily: the bacterial thioesterase YciA. *Biochemistry*, 2008, 47(9), 2789–2796. doi: 10.1021/bi702334h
22. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., et al. A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the β -oxidation cycle. *ACS. Synth. Biol.*, 2012, 1(11), 541–554. doi: 10.1021/sb3000782
23. 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.
24. Steinsiek S., Frixel S., Stagge S., et al. 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

Evaluation of anaerobic glucose utilization by *Escherichia coli* strains with impaired fermentation ability upon respiration with external and internal electron acceptor

A.Yu. SKOROKHODOVA^{1,*}, A.Yu. GULEVICH¹, V.G. DEBABOV¹

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, 117545

*e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Received December 2, 2019

Revised December 9, 2019

Accepted December 11, 2019

Abstract—The characteristics of anaerobic glucose utilization and metabolite production by recombinant *Escherichia coli* strains with impaired fermentation ability upon respiration with pyruvate as an internal and nitrate as an external electron acceptor have been studied. It was found that respiration processes utilizing pyruvic acid as an endogenous electron acceptor and leading to the lactate and alanine formation were capable of mutual interference. After elimination of ammonium ions from the medium, the native activity levels of respiratory lactate dehydrogenases Dld and LldD in *E. coli* strains deficient in the mixed acid fermentation pathways can almost completely compensate for the loss of activity of respiratory alanine dehydrogenase DadA, but are insufficient to maintain the entire intracellular redox balance. The addition of nitrate ions in the medium abolished alanine production by the strains despite the availability of ammonium ions, while the functionality of respiratory reduction of endogenous pyruvate to lactate retained in the studied strains even in the presence of a strong exogenous oxidant. Respiration with external electron acceptor provoked the activation of the oxidative tricarboxylic acid cycle in the strains. Anaerobic glucose utilization by the strain with interrupted tricarboxylic acid cycle increased during nitrate respiration, but remained restricted by the excessive generation of reducing equivalents in the residual reactions of the cycle.

Key words: *Escherichia coli*, glucose, fermentation, respiration, pyruvate, lactate, alanine, nitrate, ammonium.

Funding—The work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (project #18-04-01222).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-25-33