

УДК: 579.66

Использование альтернативного пути синтеза изолейцина в штаммах *Escherichia coli* – продуцентах треонина

© 2019 Т.В. ВЫБОРНАЯ^{1,*}, Т.В. ЮЗБАШЕВ¹, А.С. ФЕДОРОВ¹, Д.М. БУБНОВ¹, С.С. ФИЛИППОВА¹, Ф.В. БОНДАРЕНКО¹, С.П. СИНЕОКИЙ¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика), Москва, 117545

*e-mail: tatyana-vybornaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.06.2019 г.

После доработки 05.07.2019 г.

Принята к публикации 22.07.2019 г.

Сконструирован штамм *Escherichia coli*, в котором инактивированы все известные пути катаболизма треонина: Δdh , $\Delta ltaE$, $\Delta ilvA$, $\Delta tdcB$, $\Delta yiaY$. В штамме ауксотрофе по изолейцину продемонстрирована возможность альтернативного пути синтеза изолейцина посредством экспрессии гетерологичной цитрамалатсинтазы из *Leptospira interrogans*. Отмечено, что сверхэкспрессия гена *cimA* негативно влияет на продукцию треонина. Разработана система для регулируемой экспрессии генов на основе индуцируемого промотора $P_{LtetO-1}$ репрессора *tetR* тетрациклинового оперона. Получен штамм продуцент треонина В-1201, в котором ген *cimA* экспрессирован под регулируемым промотором. В ходе культивирования штамма В-1201 в ферментере показана корреляция продуктивности треонина и уровня экспрессии гена *cimA* определена концентрация индуктора, при которой достигается максимальная продукция треонина.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, продуцент, треонин, цитрамалатсинтаза.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-42-54

Важнейшей задачей при конструировании штаммов продуцентов является инактивация путей деградации целевого продукта. На сегодняшний день известны три пути деградации треонина в клетках *E. coli*. Катаболизм треонина осуществляется тремя группами ферментов: треониндегидрогеназами, треонинальдолазами и треониндеаминазами. Главную роль в деградации треонина играет треониндегидрогеназа, кодируемая геном *tdh*. Показано, что инактивация гена оказывает положительный эффект на продукцию треонина [1, 2]. Предположительно существует еще один ген, кодирующий НАД-зависимую треониндегидрогеназу, – *yiaY* [3]. В литературе встречаются противоречивые данные о фенотипе штаммов с делецией по гену *yiaY* [3, 4]. Инактивация

гена *ltaE*, кодирующего треонинальдолазу, также приводит к увеличению продукции треонина [5]. Активностью треонинальдолазы обладает фермент серингидроксиметилтрансфераза, кодируемый геном *glyA* [6]. Однако инактивировать *glyA* в штамме продуценте нецелесообразно, так как в отсутствие *glyA* штамм становится ауксотрофом по глицину [7]. В клетках *E. coli* синтезируются две треониндеаминазы, кодируемые генами *ilvA* и *tdcB*. Делеция гена *tdcB* способствует повышению продукции треонина так же, как и инактивация других генов пути – деградации треонина [8]. К сожалению, блокировать полностью все пути деградации треонина невозможно. Штамм, несущий делецию гена *ilvA*, является ауксотрофом по изолейцину, что делает невозможным его

Список сокращений: Атс – ангидротетрацилин; ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; н.о. – нуклеотидные остатки; пн – пары нуклеотидов; ОП₆₆₀ – оптическая плотность, измеренная при длине волны 660 нм; SD-последовательность – последовательность Шайна-Дальгарно; отн. ед. – относительные единицы; 5'UTR – 5'-нетранслируемая область.

применение в крупном производстве. Успешным подходом по конструированию продуцентов является поиск мутаций, приводящих к неполной инактивации треониндеаминазы.

В настоящей работе с целью повышения уровня продукции треонина было предложено инактивировать все возможные пути деградации аминокислоты, а именно конструировать штамм, несущий делеции Δtdh , $\Delta yiaY$, $\Delta ltaE$, $\Delta tdcB$, $\Delta ilvA$. После введения делеции $\Delta ilvA$ штамм потерял способность синтезировать изолейцин. Для восстановления прототрофности по изолейцину без потери конверсии треонина было предложено экспрессировать в штамме продуценте гетерологичный ген *cimA* из *Leptospira interrogans*, кодирующий цитрамалатсинтазу [9]. Фермент CimA способствует реакции превращения пирувата в цитрамалат. Несмотря на то, что в клетках *E. coli* данный фермент не синтезируется, цитрамалат может быть превращен в альфа-кетобутират ферментами изопропилмалатизомеразой и изопропилмалатдегидрогеназой, кодируемыми генами биосинтеза пути лейцина, *leuCD* и *leuB*, соответственно (рис. 1). Далее из альфа-кетобутирата синтезируется изолейцин. Таким образом, посредством экспрессии гетерологичного гена *cimA* *L. interrogans* в клетках *E. coli*, несущих делецию $\Delta ilvA$, изолейцин синтезируется по альтернативному пути, не из треонина, а из пирувата.

Использование «цитрамалатного пути» синтеза альфа-кетобутирата в *Escherichia coli* нашло широкое применение для синтеза пропанола, бутанола, а также бета-оксимасляной кислоты и ее полимеров [10]. Однако, несмотря на очевидное преимущество синтеза изолейцина из альфа-кетобутирата по «цитрамалатному пути», в литературе не освещена возможность его использования при конструировании штаммов-продуцентов аминокислот.

Цель работы – использование «цитрамалатного пути» синтеза изолейцина в штаммах-продуцентах треонина *E. coli*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы и среды

Культивирование штаммов проводили в жидкой питательной среде LB, г/л: бакто-триптон, 10; дрожжевой экстракт, 5; NaCl, 10. Для приготовления агаризованной LB в среду добавляли агар-агар (Panreac, Испания), 20 г/л. Отбор штаммов прототрофных по изолейцину проводили на

чашках с агаризованной средой M9 [11]. Для выращивания ауксотрофных штаммов в среду M9 добавляли L-изолейцин, 50 мг/л (Sigma, США).

При необходимости в среды вносили антибиотики (AppliChem, Германия): ампициллин, 50 мкг/мл; тетрациклин 12,5 мкг/мл; канамицин 100 мкг/мл; хлорамфеникол, 10 мкг/мл; спектиномицин (Кирин) (Медокеми Лтд, Кипр), 75 мкг/мл. Штаммы, полученные на основе MG1655, растили на средах с увеличенной концентрацией ампициллина (250 мкг/л) и хлорамфеникола (25 мкг/мл).

Штаммы и плазмиды, используемые в работе, указаны в табл. 1 и 2.

В работе использовали реактивы и ферменты для молекулярной биологии: эндонуклеазы рестрикции, T4 лигазу, Pfu ДНК полимеразу (Thermo Fisher Scientific, США).

Используемые в работе олигонуклеотиды были синтезированы компанией «Евроген» (Россия) и центром коллективного пользования ГосНИИгенетика (табл. 3).

Подготовку компетентных клеток и трансформацию методом электропорации проводили согласно [12]. Конструирование плазмид выполняли в штамме XL1-Blue, если не указано иное.

Трансдукцию фагом P1 осуществляли согласно методике [11].

Для интеграции ДНК-фрагментов в хромосому *E. coli* по гомологичной рекомбинации использовали хелперную плазмиду pKD46.

Ферментация в пробирках

Штаммы выращивали на чашках с агаризованной средой LB в течение 24 ч при 37 °С. Для приготовления инокулята использовали посевную среду следующего состава, г/л: дрожжевой экстракт (Biospringer, Франция) – 35; глюкоза – 2,5; NaCl – 2,5; KH_2PO_4 – 2,5. В пробирки объемом 50 мл, с рабочим объемом 2 мл посевной среды вносили биомассу клеток до стартового значения ОП₆₆₀ 0,1 ед. Пробирки инкубировали на роторной качалке в течение 5 ч. при 37 °С и скоростью перемешивания 220 об./мин.

Для основного процесса ферментации использовали среду следующего состава, г/л: глюкоза (Roquette Freres, Франция) – 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Химмед, Россия) – 30; кукурузный экстракт (Roquette Freres, Франция) – 10; KH_2PO_4 (Химмед) – 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Химмед) – 2; лимонная кислота (Sigma, США) – 0,192; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Химмед) – 0,03; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Химмед) – 0,021; CaCO_3 (Sigma) – 20; pH 7,0. Растворы глюкозы с концентрацией 400 г/л, раствор $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

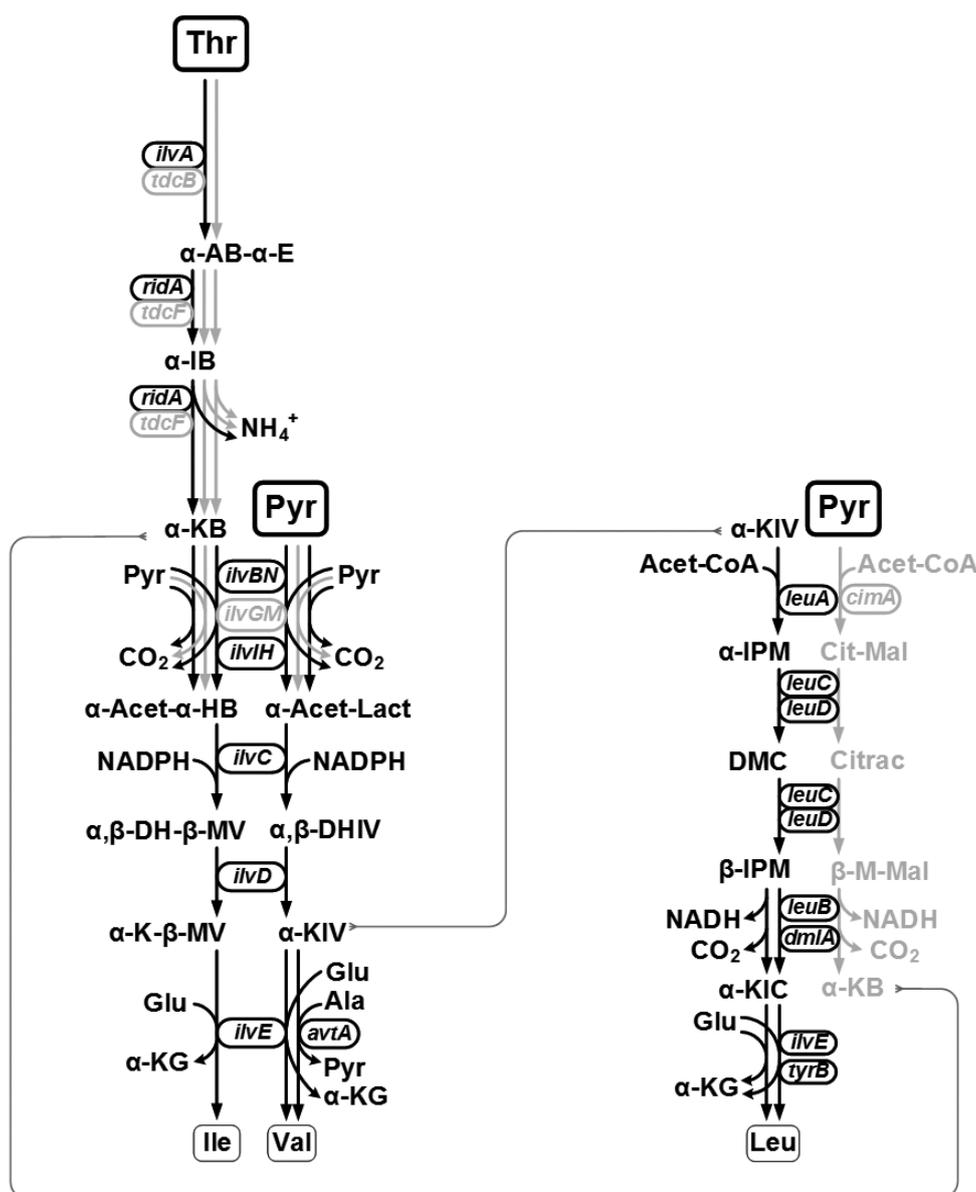


Рис. 1. Схема биосинтеза разветвленных аминокислот. Названия ферментов заменены обозначениями кодирующих генов. Черным цветом обозначены реакции, проходящие в штаммах дикого типа в условиях аэробного роста на среде с глюкозой; серым цветом – реакции, не протекающие в этих условиях. Ген *cimA* является гетерологичным (см. комментарии в тексте). Acet-CoA – ацетил-кофермент; Ala – аланин; Cit-Mal – цитратмалат; Citrac – цитраконат; DMC – диметилцитраконат; Glu – глютамат; Ile – изолейцин; Leu – лейцин; NADH – никотинамидадениндинуклеотид; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; Pyr – пируват; Thr – треонин; Val – валин; α,β -DH-IV – α,β -дигидрокси-изовалерат; α,β -DH- β -MV – α,β -дигидрокси- β -метилвалерат; α -AB- α -E – α -аминобутеноат; α -Acet-Lact – α -ацетолактат; α -Acet- α -HB – α -ацето- α -гидроксибутират; α -IB – α -иминобутаноат; α -IPM – α -изопропилмалат; α -KB – α -кетобутират; α -K- β -MV – α -кето- β -метилвалерат; α -K-IV – α -кето-изовалерат; α -K- β -MV – α -кето- β -метилвалерат; β -IPM – β -изопропилмалат; β -M-Mal – β -эритро-метилмалат

Fig. 1. The scheme of branched amino acids biosynthesis. Black color indicates reactions occurring in wild-type strains under aerobic growth conditions on a medium with glucose. Gray color indicates reactions that do not occur under these conditions. The *cimA* gene is heterologous (see comments in the text). Acet-CoA – acetyl coenzyme A; Ala – alanine; Cit-Mal – citramalate; Citrac – citraconate; DMC – dimethyl citraconate; Glu – glutamate; Ile – isoleucine; Leu – leucine; NADH – Nicotinamide adenine dinucleotide; NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; Pyr – pyruvate; Thr – threonine; Val – valine; α,β -DH-IV – α,β -dihydroxy-isovalerate; α,β -DH- β -MV – α,β -hydroxy- β -methylvalerate; α -AB- α -E – α -aminobut- α -enoate; α -Acet-Lact – α -acetolactate; α -Acet- α -HB – α -aceto- α -hydroxybutyrate; α -IB – α -iminobutanoate; α -IPM – α -Isopropylmalate; α -KB – α -ketobutyrate; α -KG – α -ketoglutarate; α -K-IC – α -keto-isocaproate; α -K-IV – α -keto-isovalerate; α -K- β -MV – α -keto- β -methylvalerate; β -IPM – β -isopropylmalate; β -M-Mal – β -erythro-methylmalate

Таблица 1

Штаммы, используемые в работе

Strain used in the work

Штамм	Генотип	Источник
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR1,7 supE4,4 relA,1 lac, [F'proAB, lacIqZAM15, Tn10 (Tet^r)]</i>	ВКПМ
MG1655	<i>ilvG-, rfb-50, rph-1,</i>	ВКПМ
MG1655Z1	<i>rph-1, lacI^q, P_{N25}-tetR, Sp^R</i>	[15]
B-632	<i>supE, ΔlacI, Δtdh, P_{tac}-thrA^{fb}BC, ΔpoxB-ltaE(MGF-016), ΔybiV, ΔsstT, ΔtdcBCDE, ΔytfG-P_{trc}-pysA</i>	ВКПМ
B-849	<i>supE, P_{tac}-thrA^{fb}BC, ΔilvA::ΔilvA::λattL-Sp^R-λattR</i>	ВКПМ
B-926	<i>supE, ΔlacI, Δtdh, P_{tac}-thrA^{fb}BC, ΔpoxB-ltaE(MGF-016), ΔybiV, ΔsstT, ΔtdcBCDE, ΔytfG-P_{trc}-pysA, ΔilvA::λattL-Sp^R-λattR</i>	Настоящая работа
B-1044	<i>supE, ilvA⁴⁴², tdh::Tn5, P_{thr}-thrAΔBC, ΔtdcBCDE, ΔsstT</i>	ВКПМ
B-1091	<i>supE, ilvA⁴⁴², tdh::Tn5, P_{thr}-thrAΔBC, ΔtdcBCDE, ΔsstT, ΔyiaY::λattL-Sp^R-λattR -P_{trc}-cimA-TrrnB</i>	Настоящая работа
B-1122	<i>supE, ΔlacI, Δtdh, P_{tac}-thrA^{fb}BC, ΔpoxB-ltaE(MGF-016), ΔybiV, ΔsstT, ΔtdcBCDE, ΔytfG-P_{trc}-pysA, ΔilvA::λattB</i>	То же
B-1127	<i>supE, ΔlacI, Δtdh, P_{tac}-thrA^{fb}BC, ΔpoxB-ltaE(MGF-016), ΔybiV, ΔsstT, ΔtdcBCDE, ΔytfG-P_{trc}-pysA, ΔilvA::λattB, ΔyiaY::λattL-Sp^R-λattR-P_{trc}(phi10)-cimA-TrrnB</i>	» »
B-1201	<i>supE, ΔlacI, Δtdh, P_{tac}-thrA^{fb}BC, ΔpoxB-ltaE(MGF-016), ΔybiV, ΔsstT, ΔtdcBCDE, ΔytfG-P_{trc}-pysA, ΔilvA::λattB, ΔyiaY::cat-sacB-tetR-P_{LtetO-1}(phi10)-cimA-TrrnB</i>	» »

Таблица 2

Плазмиды, используемые в работе

Plasmids used in the work

Плазмида	Длина плазмиды, тпн, (маркеры устойчивости к антибиотикам)	Репликон	Основные элементы	Источник
pKD46	6,3 (Amp ^R Ts)	pSC101	<i>araC, bla, Para-gamma, beta,exo</i>	[13]
pZE21lux	9,5 (Km ^R)	colE1	<i>aphA, T(0), P_{LtetO-1}-lux operon</i>	[14]
pICA	5,8 (Amp ^R Cm ^R SacB ^S)	pMB1	<i>bla, λattR-cat-λattL</i>	[16]
pMW118-λattR-cat-λattL	5,8 (Amp ^R Cm ^R)	pSC101	<i>bla, cat, sacB</i>	[16]
pMW118-λattL-cat-λattR-TrrnB	5,6 (Amp ^R Cm ^R)	pSC101	<i>bla, λattR-cat-λattL- TrrnB</i>	[17]
pINT-xis	5,9 (Amp ^R)	pSC101 ts	<i>Bla, P_{tm}.xis,-int</i>	[18]
pZA31MCS	2,1 (Cm ^R)	p15A	<i>P_{LtetO-1}, TrrnB T1, cat-T(0)</i>	Expresssys, Германия
pZE21	2,2 (Km ^R)	colE1	<i>aphA, T(0), P_{LtetO-1}</i>	» »
p-cimA-1	4,4 (Amp ^R)	pMB1	<i>bla, cimA</i>	IDT Integrated DNA Technologies, США
pMW118	4,2 kb (Amp ^R)	pSC101	<i>bla</i>	Nippon Gene, Япония
pACYC184	4,2 (Tc ^R Cm ^R)	p15A	<i>cat, tetA</i>	ВКПМ

Таблица 2 (Окончание)

Плазмида	Длина плазмиды, тпн, (маркеры устойчивости к антибиотикам)	Репликон	Основные элементы	Источник
pBTB-1	3,8 kb (Amp ^R)	pMB1	<i>araC</i> , <i>P_{BAD}</i> , <i>bla</i>	» »
pUC19	2,7 kb (Amp ^R)	pMB1	<i>bla</i>	» »
pISA	6,1 (Amp ^R Sp ^R)	pSC101	<i>bla</i> , <i>aadA</i>	Настоящая работа
pMW- λ attL-Sp ^R - λ attR-P _{trc} (phi10)- <i>cimA</i> -TrrnB	7,5 (Amp ^R Sp ^R)	pSC101	<i>bla</i> , λ attL- <i>aadA</i> -T(0)- λ attR-TrrnB, P _{trc} (phi10)- <i>cimA</i> -TrrnB	» »
pMW- λ attL-Sp ^R - λ attR-TrrnB	5,8 (Amp ^R Sp ^R)	pSC101	<i>Bla</i> , λ attL- <i>aadA</i> -T(0)- λ attR-TrrnB	» »
pUC19-T _{soxR}	2,8 (Amp ^R)	pMB1	<i>bla</i> , T _{soxR}	» »
pUC-cat	3,4 (Amp ^R Cm ^R)	pMB1	<i>bla</i> , <i>cat</i>	» »
pLtet1	4,1 (Sp ^R)	pSC101	P _{N25} - <i>tetR</i> , <i>aadA</i> -T(0)	» »
pLtet2	4,3 (Sp ^R)	pSC101	P _{N25} - <i>tetR</i> , <i>aadA</i> -T(0), P _{LtetO-1} , TrrnB T1	» »
pLtet9	2,6 (Km ^R)	colE1	<i>aphA</i> , T(0), P _{LtetO-1} - <i>cat</i> (EcoRI/BamHI)	» »
pLtet10	2,9 (Km ^R Cm ^R)	colE1	<i>aphA</i> , T(0), P _{LtetO-1} - <i>cat</i>	» »
pLtet11	4,0 (Sp ^R)	pSC101	P _{N25} - <i>tetR</i> , T _{soxR} , <i>aadA</i> -T(0), TrrnB T1	» »
pLtet12	4,1 (Sp ^R Cm ^R)	colE1	P _{N25} - <i>tetR</i> -T _{soxR} , <i>aadA</i> -T(0), TrrnB T1, P _{LtetO-1} - <i>cat</i>	» »
pLtet13	3,4 (Sp ^R)	colE1	P _{N25} - <i>tetR</i> -T _{soxR} , <i>aadA</i> -T(0), TrrnB T1, P _{LtetO-1}	» »
pLtet14	5,4 (Cm ^R SacB ^S)	colE1	P _{N25} - <i>tetR</i> -T _{soxR} , <i>cat</i> - <i>sacB</i> -T(0), TrrnB T1, P _{LtetO}	» »

с концентрацией 2,1 г/л, и 1М раствор MgSO₄·7H₂O стерилизовали отдельно автоклавированием при 121 °С в течение 40 мин. Отдельно готовили водный раствор FeSO₄·7H₂O с концентрацией 2 г/л. Для полного растворения сульфата железа в раствор вносили серную кислоту до рН 2,0. Полученный раствор стерилизовали фильтрованием через мембрану диаметром пор 22 мкм. Навески CaCO₃ по 40 мг стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течение 40 мин в стеклянных пробирках объемом 50 мл. Непосредственно перед ферментацией в стерильной емкости смешивали все компоненты среды и разливали по 2 мл в пробирки с навесками мела.

Затем в пробирки с ферментационной средой засеивали инокулят до ОП₆₆₀ 0,1 ед. Клетки культивировали в течение 24 ч при 37 °С на роторной качалке со скоростью 220 об./мин. По окончании

ферментации концентрацию накопленного в среде L-треонина определяли методом ВЭЖХ с помощью прибора Waters 2695 (Alliance, США).

Ферментация штаммов в ферментерах

Культуру клеток выращивали на чашках с агаризованной LB-средой течение 24 ч при 37 °С. Для приготовления инокулята использовали посевную среду такую же, как для выращивания посевного материала для пробирочной ферментации. В качалочные колбы объемом 750 мл с рабочим объемом 15 мл посевной среды вносили суспензию клеток до получения ОП₆₆₀ 0,1 ед. Колбы инкубировали на качалке при скорости 220 об./мин и при температуре 37 °С до достижения ОП₆₆₀ 5–6 ед.

Для выращивания посевного материала в ферментере КФ-103 (объем 3 л) («Проинтех», Россия) готовили посевную среду следующего состава, г/л:

Праймеры, используемые в работе

Primers used in the work

Праймер	Последовательность 5' - >3'
SpecmycF	AACAGACATCGATGCTAGCGGCGCTTTAGTTTTGTTCCG
SpecmycR	ACAAGCCCATGGGATTTTGGTCATGACTAGTGC
yiaYinsF-new	ATCCTCAGTAAGCTGCCCCGCCSTTTTTTACACTTTCAGGAGTGTGTTATGTCCCT GCAGGTCGACTAGA
yiaYinsR-new	AGTTGAAAAAGCGGCTAACAAATTTGCCAGCCGTTGTGGAAATGATGATTACCAA GCTGCAAAAAGAGTTT
NotPn25f	AACGCGGCCGCTGTAAGTTAGCGCGAATTGTC
Pn25r	СТААТСТАГАСАТАТСТАТТССГСССГСССГАТТ
TetRf	GCCCCGAATAGATATGTCTAGATTAGATAAAAAGT
TetRaatR	CATCCGGATATCGACGTCTAAGAGCGCAAGGTGATTTTTGTCTT
aadAaatF	CTTAGACGTCGATATCCGGATG
t0-3resR	GTTAGCGGCCGCATTAATCTTACTGTACAAGTGCTTGGATTCTCACCAATAA
BspLtetFnew	GAATGTACACTTTTCGTCTTCACCTCGAGT
VspTrmR	GCATTAATATAAAAACGAAAGGCCAGTCTT
RBScatF	GACCGAATTCATTAAGAGGAGAGGTCTCAAATGGAGAAAAAATCACTGG ATATAC
catXmaR	TAGCACGCGTCTTAGGTCTCGCTTACGCCCCGCCCTG
Sox-F	AGTCAGACGTCGATATCATTCAGGACGAGCC
Sox-R	ATGCAGACGTCCCGCGGAACAAAATAAAGC
tetunioF	GCCCAGTAGTAGGTTGAGGTAGTGCTTGGATTCTCACC
tetunioR	ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTAATTTCTAGAGGGAAACCGTTGT GGTCTCCCTTGCTCAGTATCTCTATCACT
cimAuniR *(phi10)	CTCTCAAAGTTACGTCTAAAATTTCCAATCGGGTTTCCACTTTCGTATATGTATA TCTCCTTCTTAAA
cimAtetF	ATCCTCAGTAAGCTGCCCCGCCSTTTTTTACACTTTCAGGAGTGTGTTATGTAGTG CTTGGATTCTCACC

глюкоза – 60; кукурузный экстракт – 12; KH_2PO_4 – 1,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; пеногаситель Бреокс (Волгохимнефть) – 0,5; лимонная кислота – 0,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,021. Смешивали все компоненты среды, за исключением глюкозы, стерилизовали в ферментере автоклавированием в течение 40 мин при 121 °С. Отдельно стерилизовали раствор моногидрата глюкозы с концентрацией 770 г/л. После остывания среды в ферментер вносили 92 мл стерильного раствора моногидрата глюкозы. Засевали инокулят, выращенный в колбах, до стартового значения ОП_{660} 0,003 ед.

Культивирование проводили в ферментере с рабочим объемом 1 л при 39 °С, при перемешивании 700 об./мин, при аэрации 1,0 л/мин, при pH 6,9 с титрованием 25% (об.) водным аммиаком. Культивирование проводили до достижения ОП_{660} 25 ед.

Биосинтез L-треонина

Основной процесс биосинтеза выполняли в среде следующего состава, г/л: глюкоза – 15; кукурузный экстракт – 10; KH_2PO_4 – 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,03; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; пеногаситель Бреокс – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,021. Смешивали в ферментере все компоненты, кроме глюкозы, и стерилизовали автоклавированием в течение 40 мин при 121 °С. После остывания среды вносили в ферментер 23 мл стерильного раствора моногидрата глюкозы с концентрацией 770 г/л. Посевную культуру, выращенную в посевном ферментере, вносили до расчетного значения ОП_{660} 2 ед.

Культивирование проводили при 33 °С с начальным рабочим объемом среды 1 л, при начальной скорости перемешивания 500 об./мин,

аэрации 1,0 л/мин, при рН 6,9 с титрованием 25% (масс.) водным аммиаком. Значение pO_2 поддерживали на уровне 20% с использованием каскадной регулировки скорости вращения мешалки до 1200 об./мин.

Для подпитки готовили раствор моногидрата глюкозы с концентрацией 51,1% (мас.), раствор стерилизовали автоклавированием отдельно в течение 30 мин при 121 °С. По исчерпанию глюкозы в ферментационной среде начинали подпитку со скоростью 3,47 г глюкозы/(ч·л нач. объема), далее непрерывно увеличивали скорость до 13,8 г глюкозы/(ч·л нач. объема) в течение 14 ч. Затем скорость подачи поддерживали на уровне 13,8 г глюкозы/(ч·л нач. объема) до окончания процесса. Культивирование продолжали в течение 36 ч. По окончании процесса количество накопленного в среде L-треонина определяли методом ВЭЖХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интеграция гена *cimA* *Leptospira interrogans* в хромосому *E. coli* с одновременной инактивацией в ней гена *yiaY*

Нуклеотидная последовательность гена *cimA* *L. interrogans* serovar Lai (Genebank DQ 978311.1 GI: 1166646701) была синтезирована вместе с промотором P_{trc} и 5'-UTR *phi10* (IDT Integrated DNA Technologies, США) и клонирована в составе плазмиды p-*cimA*-1. Конструкция ограничена сайтами для клонирования *Bam*HI и *Acc*65I.

Ген устойчивости к спектиномицину *aadA* был амплифицирован по праймерам *Spec*mycF, *Spec*mycR, матрицей послужила хромосома штамма MG1655Z1. ПЦР продукт рестрицировали по *Bsu*I5I и *Nco*I и лигировали с плазмидой pMW118- λ attR-cat- λ attL, обработанной сходным образом. В результате была получена плазида pISA.

Ранее описанная в литературе плазида pMW118- λ attR-cat- λ attL-TrnB была рестрицирована по *Bg*III и *Xba*I, липкие концы были зачищены Pfu полимеразой. В полученный вектор клонирован фрагмент рестрикции плазмиды pISA, обработанной по *Acc*65I, *Pae*I и Pfu полимеразой для удаления липких концов, несущий маркер устойчивости к спектиномицину, фланкированный λ attL и λ attR сайтами. Результирующая плазида pMW- λ attL-Sp^R- λ attR-TrnB была обработана эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI / *Acc*65I и лигирована с продуктом рестрикции плазмиды p-*cimA*-1, обработанной сходным образом. Сконструированная плазида была названа pMW- λ attL-Sp^R- λ attR - P_{trc} (ϕ i10)-*cimA*-TrnB.

Интегративную конструкцию для одновременной инактивации гена *yiaY* и сверхэкспрессии гена *cimA* получали путем амплификации методом ПЦР с плазмиды pMW- λ attL-Sp^R- λ attR- P_{trc} (ϕ i10)-*cimA*-TrnB по праймерам: *yiaY*insF-new, *yiaY*insR-new. Праймеры содержат на 5'-конце по 50 н.о., комплементарных последовательностям выше и ниже положения гена *yiaY*, включая старт- и стоп-кодоны. Полученной кассетой, размером 3970 пн, трансформировали компетентные клетки штамма B1044/pKD46. Трансформантов отбирали на чашках с добавлением канамицина и спектиномицина. Присутствие целевой вставки подтверждали методом ПЦР. Клон с подтвержденным генотипом был обозначен B-1091. После интеграции кассеты от ORF гена *yiaY* в хромосоме оставались старт- и стоп-кодоны. Схема локуса гена *yiaY* после интеграции кассеты Δ *yiaY*:: λ attL-Sp^R- λ attR- P_{trc} (ϕ i10)-*cimA*-TrnB приведена на рис. 2.

Инактивация гена *ilvA* в хромосоме штамма-продуцента треонина

Ранее в ГосНИИГенетика был сконструирован штамм продуцент L-треонина *E. coli* B-632 (табл. 1). В указанном штамме инактивированы три гена, участвующие в деградации треонина, кодирующие треониндегидрогеназу (Δ *tdh*), треонинальдолазу (Δ *ltaE*) и треониндеаминазу (Δ *tdcB*). Также в штамме сверхэкспрессированы гены треонинового оперона с десенсибилизирующей мутацией под сильным конститутивным промотором (*P*_{lac-thrA^{br}BC}), экспрессирована пируваткарбоксилаза (Δ *ytfG*-*P*_{trc}-*pusA*), инактивированы пути транспорта треонина внутрь клетки (Δ *sstT*, Δ *tdcC*) и удален ген, кодирующий пируватоксидазу (Δ *proxB*). Все перечисленные модификации были направлены на повышение биосинтеза треонина, инактивацию боковых путей метаболизма и блокирование транспорта аминокислоты внутрь клетки. Благодаря их наличию штамм является продуцентом и перспективным штаммом хозяином для дальнейших модификаций.

Для повышения продуктивности в штамме был инактивирован основной путь деградации L-треонина, осуществляемый треониндеаминазой *IlvA*. В геном штамма была внесена интегративная кассета *ilvA*:: λ attL-Sp^R- λ attR посредством трансдукции фагом P1. В качестве донора ДНК использовали клетки штамма B-849. Трансдуктантов отбирали на агаризованной среде с добавлением спектиномицина. Высев трансформантов на минимальную среду M9 подтвердил наличие ауксотрофности по изолейцину. Отобранный штамм был обозначен как B-926. Для удаления

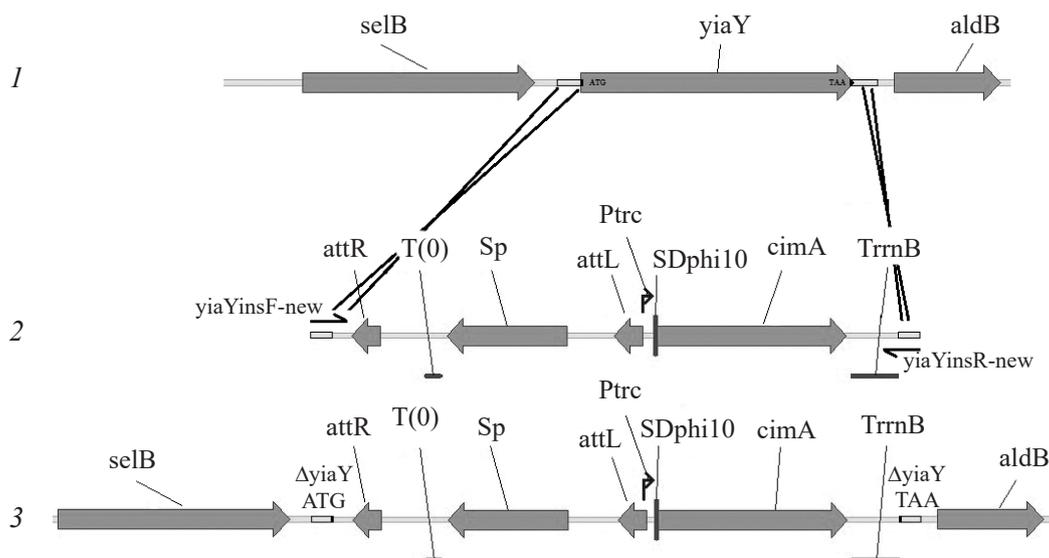


Рис. 2. Схема интеграции гена *cimA* *L. interrogans* в хромосому *E. coli* с одновременной инактивацией в ней гена *yiaY*: 1 – схема нативного локуса *yiaY*; 2 – схема интегративной конструкции для экспрессии *cimA* под конститутивным промотором P_{trc} ; 3 – схема делеции локуса *yiaY* ($\Delta yiaY::\lambda attL-Sp^R-\lambda attR-P_{trc}(\phi 10)-cimA-TrnB$). Стрелки – сайты отжига праймеров, незакрашенные области – гомологичные последовательности ДНК, по которым прошла рекомбинация

Fig. 2. The scheme of *cimA* *L. interrogans* integration into *E. coli* chromosome with simultaneous inactivation of *yiaY*: (1), the scheme of the native *yiaY* locus; (2), the scheme of an integrative construction for expressing *cimA* under constitutive promoter P_{trc} ; (3), scheme of deletion *yiaY* locus ($\Delta yiaY::\lambda attL-Sp^R-\lambda attR-P_{trc}(\phi 10)-cimA-TrnB$). The arrows indicate the sites of primer annealing, the open areas indicate homologous DNA sequences

кассеты с селективным маркером, компетентные клетки штамма В-926 трансформировали плазмидой pINT-xis. Трансформантов отбирали по устойчивости к ампициллину, затем высевали методом реплик на среду с добавлением и без добавления спектиномицина. В клонах, чувствительных к спектиномицину, произошло выщепление маркера устойчивости по att-сайтам фага λ . Потерю маркеров также подтверждали методом ПЦР.

Элиминацию плазмиды pINT-xis проводили рассевом клонов на среде без добавления антибиотиков при 37 °С. Отобранный клон, чувствительный к ампициллину и спектиномицину, был назван В-1122. В нем инактивированы четыре гена, участвующие в деградации треонина: *Δtdh*, *ΔtdcB*, *ΔltaE*, *ΔilvA*. Полный генотип штамма В-1122 – [*supE*, *ΔlacI*, *Δtdh*, $P_{tac}-thrA^{fbr}BC$, *ΔpoxB-ltaE(MGF-016)*, *ΔybiV*, *ΔsstT*, *ΔtdcBCDE*, *ΔytfG-P_{trc}-pucA*, *ΔilvA::λattB*, *ΔyiaY::λattL-Sp^R-λattR-P_{trc}(\phi 10)-cimA-TrnB*].

Экспрессия гена *cimA* под конститутивным промотором в штамме-производителе L-треонина

Для сверхэкспрессии гена *cimA* под регуляцией конститутивного промотора P_{trc} в штамме В-1122 конструкция $\Delta yiaY::attL-Sp^R-attR-P_{trc}(\phi 10)-cimA-TrnB$ была перенесена трансдукцией фагом P1 из хромосомы выше описанного штамма В-1091. Отбор трансдуктантов проводи-

ли на чашках со средой LA с добавлением спектиномицина. Подтверждение генотипа отобранных клонов проводили методом ПЦР.

Таким образом, был получен штамм-производитель, обозначенный как В-1127 (см. табл. 1), у которого были инактивированы все известные гены, участвующие в деградации треонина, в том числе ген *ilvA*, а в хромосому был интегрирован ген *cimA*, экспрессирующий под конститутивным промотором цитрамалатсинтазу из *Leptospira interrogans* [*supE*, *ΔlacI*, *Δtdh*, $P_{tac}-thrA^{fbr}BC$, *ΔpoxB-ltaE(MGF-016)*, *ΔybiV*, *ΔsstT*, *ΔtdcBCDE*, *ΔytfG-P_{trc}-pucA*, *ΔilvA::λattB*, *ΔyiaY::λattL-Sp^R-λattR-P_{trc}(\phi 10)-cimA-TrnB*].

Клоны были посеяны методом реплики на чашках с агаризованной минимальной средой М9 с добавлением (50 мг/л) и без добавления изолейцина. Все проверенные клоны оказались прототрофами по изолейцину; подтверждено, что экспрессия гена *cimA* комплементирует ауксотрофность по изолейцину, вызванную делецией гена *ilvA*.

В пробирках была проведена сравнительная ферментация полученных штаммов В-632, В-926 и В-1127, как описано в разделе Условия эксперимента (рис. 3).

Как видно из рис. 3, делеция гена *ilvA* значительно увеличивает продукцию треонина с 11,5 до 14,4 г/л при культивировании в ферментационной

среде без добавления изолейцина, и с 10,9 до 15,1 г/л при внесении изолейцина в концентрации 50 мг/л. Однако при сверхэкспрессии гена *cimA* в штамме с делецией гена *ilvA* наблюдалось значительное снижение уровня биосинтеза аминокислоты. Можно предположить, что сверхэкспрессия гена цитрамалатсинтазы под контролем сильно-го конститутивного промотора приводит к излишнему оттоку пирувата на синтез изолейцина, что уменьшает общую конверсию глюкозы в треонин. Для проверки этого предположения были сконструированы штаммы, в которых транскрипция гена *cimA* осуществлялась под контролем регулируемого промотора.

Конструирование матричной плазмиды для регулируемой экспрессии генов

Для регулируемой экспрессии гена *cimA* был выбран промотор $P_{LtetO-1}$, ввиду его хорошо изученного механизма регуляции транскрипции [19]. Промотор характеризуется строгой зависимостью количества синтезируемой мРНК от концентрации индуктора. В качестве индуктора применяют ангидротетрациклин (АТс), который связывается с белком-репрессором TetR. В отсутствие или при низкой концентрации АТс в клетке белок-репрессор обратимо соединяется с оператором *tetO1* и препятствует транскрипции с промотора $P_{LtetO-1}$. Таким образом, конструирование штаммов, в которых транскрипция гена *cimA* осуществляется под контролем регулируемого промотора, предполагает не только замену нативного промотора на $P_{LtetO-1}$, а также введение в геном *tetR*. Была разработана универсальная матричная плазмида pLtet14 для регулируемой экспрессии различных генов *E. coli* (рис. 4), схема конструирования которой приведена в электронном виде в дополнительном материале к статье (рис. S1 (Дополнительный материал)).

Кассету SC-tetR- $P_{LtetO-1}$ для индуцируемой экспрессии генов получали посредством ПЦР-амплификации с матричной плазмиды по праймерам, гомологичным промоторной области исследуемого гена. Праймеры подбирали таким образом, чтобы кассета встраивалась непосредственно перед старт-кодоном исследуемого гена. При необходимости в последовательность праймера, комплементарного промотору $P_{LtetO-1}$, добавляли различные SD-последовательности. Ген *cat*, обеспечивающий устойчивость к хлорамфениколу, позволил отобрать трансформанты, несущие интегративную кассету SC-tetR- $P_{LtetO-1}$. Кассета могла быть удалена из хромосомы посредством гена *sacB* – маркера негативной селекции.

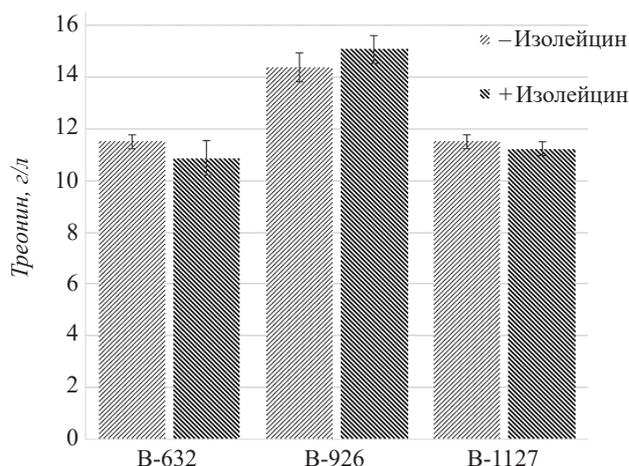


Рис. 3. Результаты ферментации треонина в пробирках штаммов B-632, B-926 и B-1127 с добавлением (50 мг/л) и без добавления изолейцина в ферментационную среду. По результатам пяти независимых повторностей определены средние значения и стандартное отклонение продукции треонина

Fig. 3. The results of threonine fermentation of strains B-632, B-926 and B-1127 in test tubes with and without addition (50 mg/L) of isoleucine. Based on the results of five independent replications, the mean and standard deviation of threonine production was determined

Экспрессия гена *cimA* под контролем регулируемого промотора в штамме продуценте L-треонина

Для оптимизации уровня экспрессии гена *cimA* были сконструированы штаммы, в которых перед старт-кодоном гена *cimA* была интегрирована кассета, содержащая промотор $P_{LtetO-1}$, 5'-нетранслируемую область гена *phi10* фага T7, репрессор *tetR* и два селективных маркера – *cat*, *sacB*. Схема делеции локуса $\Delta yiaY::SC-tetR-P_{LtetO-1}$ (*phi10*)-*cimA*- T_{tmB} показана на рис. 4 (ч. 3). Первичную матрицу для экспрессии гена *cimA* получили амплификацией по паре праймеров *tetunioF* и *tetunioR*, в качестве матрицы для ПЦР использовали ДНК плазмиды pLtet14.

Вторым раундом ПЦР по праймерам *cimAuniR*(phi10)* и *cimAtetF* были добавлены к кассете участки гомологии длиной по 50 пн выше и ниже гена *yiaY*. Полученным ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки штамма B-1127/pKD46. Трансформантов отбирали на чашках с агаризованной средой LB с добавлением хлорамфеникола. В результате трансформации были отобраны три клона, которые проверены ферментацией треонина в пробирках при концентрациях АТс 0, 10, 200 нг/мл (рис. 5).

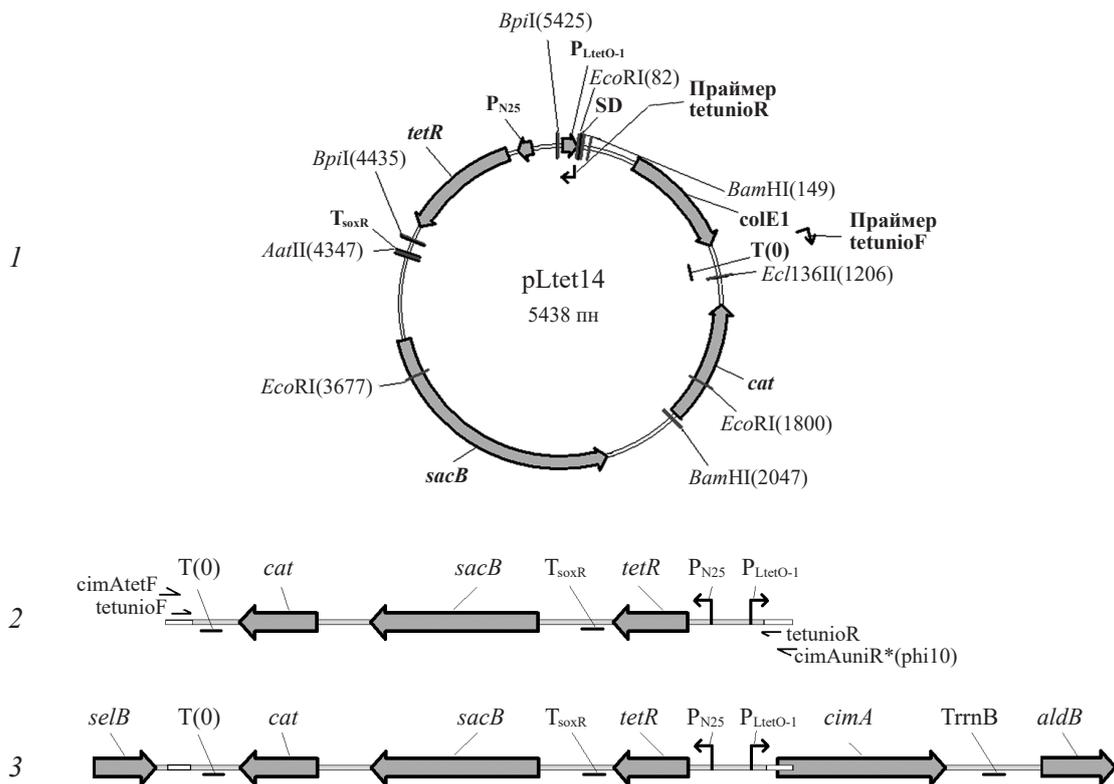


Рис. 4. Схема интеграции гена *cimA* *L. interrogans* под регулируемым промотором в хромосому *E. coli* с одновременной инактивацией в ней гена *yiaY*. 1 – схема плазмиды pLtet14. *BpiI/EcoRI* (95 пн) – фрагмент плазмиды pZE21, несущий промотор $P_{LtetO-1}$; *EcoRI/BamHI* – фрагмент плазмиды pUC-cat, содержащий SD-последовательность гена *cat*; *BamHI/EclI36II* (1057 пн) – фрагмент плазмиды pZE21, содержащий репликон *colE1* и терминатор T(0), *EclI36II/AatII* (3141 пн) – фрагмент, несущий маркеры прямой и обратной селекции, гены *cat* и *sacB*, соответственно; *AatII/BpiI* (88 пн) – фрагмент, несущий терминатор транскрипции T_{soxxR} ; *BpiI/BpiI* (990 пн) – фрагмент содержит репрессор *terR* под промотором P_{N25} ; 2 – схема интегративной конструкции для экспрессии *cimA* под регулируемым промотором $P_{LtetO-1}$; 3 – схема делеции локуса *yiaY* ($\Delta yiaY::SC-tetR-P_{LtetO-1}(\phi 10)-cimA-T_{rmB}$). Стрелки – сайты отжига праймеров, незакрашенные области – гомологичные последовательности ДНК, по которым прошла рекомбинация

Fig. 4. The scheme of integration of *cimA* *L. interrogans* under regulated promoter into the *E. coli* chromosome with simultaneous inactivation of the *yiaY*. (1), the scheme of plasmid pLtet14 the plasmid includes the following elements: *BpiI/EcoRI* (95 bp) – a fragment of plasmid pZE21 carrying the $P_{LtetO-1}$ promoter; *EcoRI/BamHI* – fragment of the plasmid pUC-cat containing the SD sequence of the *cat* gene; *BamHI/EclI36II* (1057 bp) – a fragment of plasmid pZE21 containing replicon *colE1* and terminator T(0); *EclI36II/AatII* (3141 bp) – fragment carrying markers of direct and negative selection, *cat* and *sacB* genes, respectively; *AatII/BpiI* (88 bp) – fragment carrying the T_{soxxR} transcription terminator; *BpiI/BpiI* (990 bp) – the fragment contains the *terR* repressor under the P_{N25} promoter; (2), the scheme of an integrative construction for expressing *cimA* under regulated promoter $P_{LtetO-1}$; (3), the scheme of deletion *yiaY* locus ($\Delta yiaY::SC-tetR-P_{LtetO-1}(\phi 10)-cimA-T_{rmB}$). The arrows indicate the sites of primer annealing, the open areas indicate homologous DNA sequences

В зависимости от степени индукции экспрессии гена *cimA* продукция треонина менялась: при низкой концентрации индуктора она была повышена, но при внесении высокой его концентрации (200 нг/мл) она могла оставаться прежней (клон 1) или немного снижаться (клон 2), или немного повышаться (клон 3).

Именно клон 2 выбран для дальнейшей работы, ему присвоен номер В-1201. Генотип штамма – [*supE*, $\Delta lacI$, Δtdh , $P_{tac}-thrA^{br}BC$, $\Delta proxB-ltaE(MGF-016)$, $\Delta ybiV$, $\Delta sstT$, $\Delta tdcBCDE$, $\Delta ytfG-P_{trc}-pucA$, $\Delta ilvA::\lambda attB$, $\Delta yiaY::cat-sacB-tetR-P_{LtetO-1}(\phi 10)-cimA-T_{rmB}$].

Результаты ферментации штамма В-1201 в ферментере приведены на рис. 6. Согласно полученным данным при концентрации индуктора 25–50 нг/мл достигается максимальное значение продукции треонина (рис. 6b). Максимальный уровень конверсии треонина получен при АТс 25 нг/мл (рис. 6c). При увеличении концентрации индуктора, продукция треонина снижается, при этом возрастает оптическая плотность культуры (рис. 6a, 6b). Полученные данные коррелируют с результатами пробирочной ферментации штамма В-1127, в котором ген цитрамалатсинтазы был экспрессирован под сильным конститутивным промотором P_{trc} .

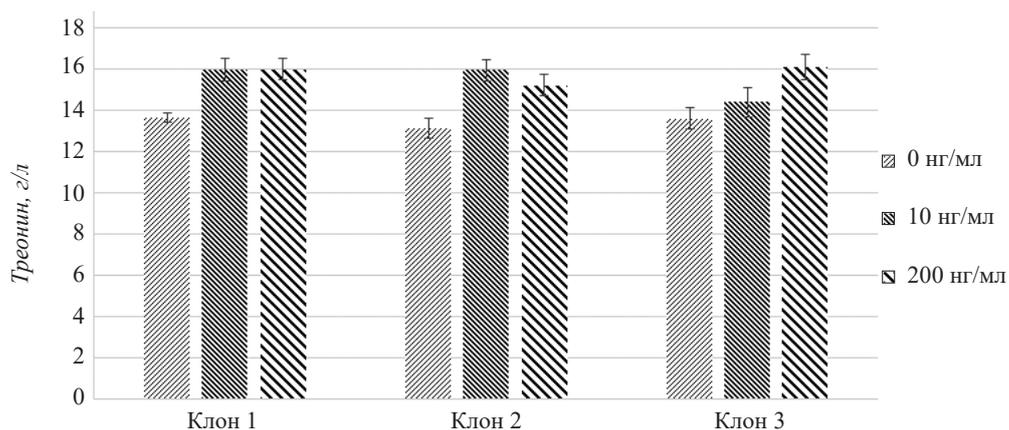


Рис. 5. Результаты ферментации в пробирках трансформантов с регулируемой экспрессией гена *cimA* при различных концентрациях индуктора ангидротетрациклина (АТс, нг/мл)

Fig. 5. The results of fermentation of transformants with regulated expression of the *cimA* gene in tubes at various concentrations of the anhydrotetracycline inducer (ATc, ng/mL)

Полученные результаты не дают точного ответа на вопрос, каким образом сверхэкспрессия гена *cimA* снижает продукцию треонина, и связано ли уменьшение продукции с оттоком пирувата на синтез изолейцина или оно вызвано другими механизмами в клетке.

Итак, в настоящей работе успешно продемонстрирована возможность использования альтернативного пути синтеза изолейци-

на в штаммах-продуцентах треонина. С целью повышения продуктивности в штамме продуценте В-926 были инактивированы основные пути биodeградации треонина *ΔtdcB*, *Δtdh*, *ΔltaE*, *ΔilvA*. Несмотря на то, что В-926 является ауксотрофом по изолейцину, при культивировании в пробирках для роста и продукции треонина штамму достаточно того количества изолейцина, который присутствует в среде на основе кукурузного экстракта. Однако при

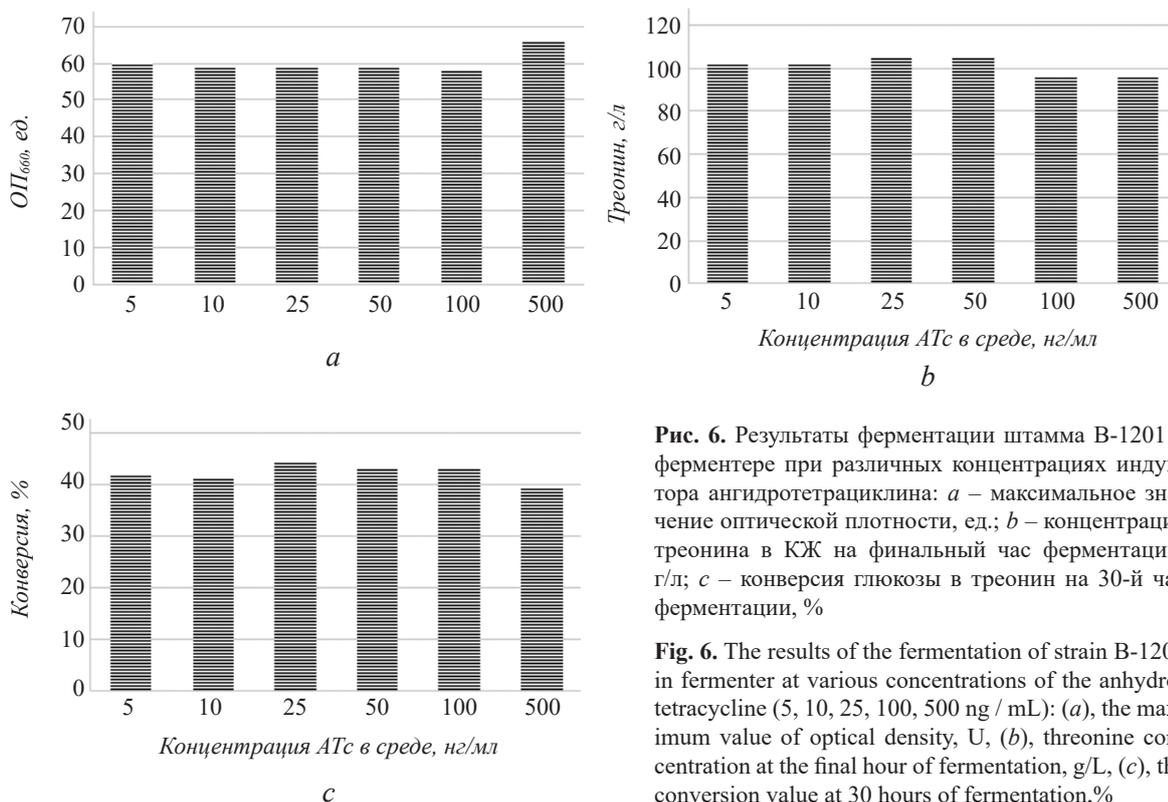


Рис. 6. Результаты ферментации штамма В-1201 в ферментере при различных концентрациях индуктора ангидротетрациклина: *a* – максимальное значение оптической плотности, ед.; *b* – концентрация треонина в КЖ на финальный час ферментации, г/л; *c* – конверсия глюкозы в треонин на 30-й час ферментации, %

Fig. 6. The results of the fermentation of strain B-1201 in fermenter at various concentrations of the anhydrotetracycline (5, 10, 25, 100, 500 ng / mL): (*a*), the maximum value of optical density, U, (*b*), threonine concentration at the final hour of fermentation, g/L, (*c*), the conversion value at 30 hours of fermentation, %

культивировании в ферментере, когда титр клеток возрастает более чем в 10 раз по сравнению с ферментацией в пробирках, для роста клеток не хватает аминокислот, присутствующих в среде. При культивировании штамма В-926 в ферментере для комплементации ауксотрофности в среду вносили 0,5 г/л изолейцина (данные не представлены).

Для возвращения прототрофности по изолейцину в геном штамма был интегрирован гетерологичный ген *cimA*. С целью подбора оптимального уровня экспрессии гена *cimA* была разработана система для регулируемой экспрессии генов на основе промотора P_{LtetO-1}. Данная система является универсальной и не требует специальной подготовки штамма. Регуляция экспрессии целевого гена происходит посредством добавления в среду индуктора, ангидротетрациклина. По результатам ряда ферментаций проведен подбор концентрации индуктора, при которой достигается максимальная продукция треонина, а именно свыше 100 г/л при концентрации АТс 25 нг/мл в ферментере. Показано, что увеличение уровня сверхэкспрессии гена *cimA* приводит к увеличению уровня компенсации ауксотрофности и к переключению метаболизма с синтеза треонина на синтез биомассы.

Дальнейшие исследования предполагают скрининг ферментов цитрамалатсинтаз из различных источников и направленную модификацию ферментов с целью уменьшения сродства к пирувату, а также подбор конститутивных промоторов с оптимальным уровнем экспрессии, обеспечивающим, максимальное накопление треонина в ферментационной среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI61017X0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Манухову И.В. за предоставление штамма MG1655Z1 и плазмиды pZE21-lux и за помощь в освоении методики измерения биолуминесценции.

Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

ЛИТЕРАТУРА

1. Биндер Т.П., Брэдшоу Д.С., Ванг М.Д., Лио Х.Д., Свишер С.Л., Хэнк П.Д. Штамм микроорганизма *Escherichia coli* -продуцент L-треонина, способ получения продуцирующего L-треонин штамма *E.coli* и способ получения L-треонина (варианты). Патент РФ RU2212448, C12N15/52, C12N1/21, C12P13/08, C12N1/21, C12R1/19 2003.
2. Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3(1), 1349. doi: 10.1038/msb4100196
3. Ma F., Wang T., Ma X., et al. Identification and characterization of protein encoded by orf382 as L-threonine dehydrogenase. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 24, 748–755. doi: 10.4014/jmb.1312.12030
4. Baba T., Ara T., Hasegawa M., et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2(1), doi: 10.1038/msb4100050
5. Рыбак К.В., Сливинская Е.А., Саврасова Е.А. и др. Способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован ген *ltaE*. Патент РФ RU2304166, C12N1/21, C12P13/08, C12R1/19 2007.
6. Schirch L.V., Gross T. Serine transhydroxymethylase identification as the threonine and allothreonine aldolases. *J. Biol. Chemistry*, 1968, 243(21), 5651–5655.
7. Pizer L.I. Glycine synthesis and metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*, 1965, 89(4), 1145–1150.
8. Пак Д.У., Ли Б.Ч., Ким Д.Ч. и др. Способ получения L-треонина. Патент РФ RU2288265, C12N15/00, C12N15/11, C12N1/21, C12P13/08, C12R1/19 2006.
9. Xu H., Zhang Y., Guo X., et al. Isoleucine biosynthesis in *Leptospira interrogans* serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine-independent pathway. *J. Bacteriology*, 2004, 186(16), 5400–5409. doi: 10.1128/JB.186.16.5400-5409.2004
10. Wang Q., Liu X., Qi Q. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose with elevated 3-hydroxyvalerate fraction via combined citramalate and threonine pathway in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(9), 3923–3931. doi: 10.1007/s00253-013-5494-5
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

12. Bubnov D.M., Yuzbashev T.V., Vybornaya T.V., et al. Development of new versatile plasmid-based systems for λ Red-mediated *Escherichia coli* genome engineering. *J. Microbiological Methods*, 2018, 151, 48–56. doi: 10.1016/j.mimet.2018.06.001
13. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, 2000, 97(12), 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
14. Zavilgelsky G., Kotova V.Y., Rastorguev S. Antirestriction and antimodification activities of T7 Ocr: Effects of amino acid substitutions in the interface. *Mol. Biol.*, 2009, 43(1), 93–100. doi: 10.1134/S0026893309010130
15. Zavilgelsky G., Kotova V.Y., Rastorguev S. Comparative analysis of anti-restriction activities of ArdA (ColIb-P9) and Ocr (T7) proteins. *Biochemistry (Moscow)*. 2008, 73(8), 906–11. doi: 10.1134/S0006297908080087
16. Derbikov D., Novikov A., Gubanova T., et al. Aspartic acid synthesis by *Escherichia coli* strains with deleted fumarase genes as biocatalysts. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2017, 53(9), 859–866. doi: 10.1134/S0003683817090046
17. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В. и др. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме. *Молекулярная биология*. 2005, 39(5), 823–831.
18. Hasan N., Koob M., Szybalski W. *Escherichia coli* genome targeting I. Cre-Zox-mediated *in vitro* generation of ori⁻ plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval. *Gene*, 1994, 150(1), 51–56. doi: 10.1016/0378-1119(94)90856-7
19. Lutz R., Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25(6), 1203–1210. doi: 10.1093/nar/25.6.1203

Use of an Alternative Pathway for the Synthesis of Isoleucine in *Escherichia coli* Threonine-Producing Strains

T.V. VYBORNAYA^{1,*}, T.V. YUZBASHEV¹, A.S. FEDOROV¹, D.M. BUBNOV¹, S.S. FILIPPOVA¹, F.V. BONDARENKO¹, S.P. SINEOKY¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

*e-mail: tatyana-vybornaya@yandex.ru

Received 06 June, 2019

Revised 05 July, 2019

Accepted 22 July, 2019

Abstract – An *E. coli* strain in which all known pathways of threonine catabolism were inactivated (*Δtdh*, *ΔltaE*, *ΔilvA*, *ΔtdcB*, *ΔyiaY*) has been constructed. The possibility of an alternative pathway for the isoleucine synthesis by expressing heterologous citramalate synthase from *Leptospira interrogans* in an *E. coli* strain carrying the *ΔilvA* deletion was demonstrated. It was observed that the *cimA* overexpression has a negative effect on the threonine production. We developed a system for regulated gene expression based on the inducible promoter P_{LtetO} and *TetR* repressor of the tetracycline operon. A threonine producing strain B-1201 in which the *cimA* gene is expressed under the control of the regulated promoter was constructed. A correlation of the threonine productivity and the expression level of the *cimA* gene was shown by culturing the B-1201 strain in fermenter. The optimal inductor content for the maximum threonine accumulation was also determined.

Key words: *Escherichia coli*, strain, threonine, citramalate synthase.

Funding – This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project code RFMEFI61017X0011), and it was carried out using the equipment of the National Bio-Resource Center «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms», NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA.

Acknowledgement – The authors are grateful to Dr. I. V. Manukhov for providing the MG1655Z1 strain and pZE21-lux plasmid, and for teaching techniques of bioluminescence measuring.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-42-54