

УДК 577.121

Исследование потенциала обращения пути бета-окисления жирных кислот для стереоселективного биосинтеза (*S*)-1,3-бутандиола из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*

© 2019 А.Ю. ГУЛЕВИЧ^{1,*}, А.Ю. СКОРОХОДОВА¹, В.Г. ДЕБАБОВ¹

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

*e-mail: gulevich@genetika.ru

Поступила в редакцию 01.08.2019 г.

Принята к публикации 20.08.2019 г.

Исследован возможный вклад побочных ферментов в формирование ключевого метаболита-предшественника, 3-гидроксибутирил-КоА, в рекомбинантном штамме *Escherichia coli*, сконструированном для биосинтеза 1,3-бутандиола из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот. При сохранении в клетках штамма интактным жизненно важным гена *fabG*, кодирующего 3-кетоацил-АПБ редуктазу, способную катализировать превращение ацетоацетил-КоА в (*R*)-3-гидроксибутирил-КоА, инактивация гена *paah* 3-гидроксиацетил-КоА дегидрогеназы, не прекращала синтез штаммом 1,3-бутандиола при анаэробной утилизации глюкозы. Последующая инактивация в штамме гена *fadB*, кодирующего (*S*)-стереоспецифичную 3-гидроксиацетил-КоА дегидрогеназу бета-окисления жирных кислот, приводила к отмене синтеза штаммом 1,3-бутандиола. Соответствующий диол также не обнаруживался среди продуктов, секретируемых штаммом с интактными генами *fabG* и *paah* при индивидуальной делеции гена *fadB*. Установлено, что побочные ферменты не принимали участия в формировании 3-гидроксибутирил-КоА в исследованных штаммах и синтез соответствующего КоА-производного осуществлялся исключительно (*S*)-специфичным ферментом пути бета-окисления жирных кислот. Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате обращения пути бета-окисления жирных кислот в рекомбинантных штаммах *E. coli* может быть обеспечен энантиоселективный биосинтез из глюкозы (*S*)-стереоизомера 1,3-бутандиола.

Ключевые слова: 1,3-бутандиол, бета-окисление жирных кислот, *Escherichia coli*, глюкоза, метаболическая инженерия, стереоизомер.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-12-19

Современные стратегии устойчивого развития предполагают последовательный и неуклонный переход от нефтехимических процессов органического синтеза полезных соединений к соответствующим процессам, основанным на микробной биотехнологии [1]. Среди продуктов промышленной биотехнологии повышенное внимание привлечено к соединениям, способным служить гиб-

кими «строительными блоками» в последующем синтезе широкого спектра химикатов с высокой добавленной стоимостью. Особая роль среди таких «строительных блоков» отводится веществам, обладающим оптически активными центрами, что позволяет использовать их в качестве перспективных хиральных синтонов. Так, (*R*)- и (*S*)-стереоизомеры 3-гидроксикарбоксилатов

Список сокращений: АПБ – ацилпереносящий белок; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ИПТГ – изопротил β-D-тиогалактозид; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

и 1,3-дио́лов служат удобными синто́нами для получения различных видов макролидных и бета-лакта́мных антибиотиков, а также сельскохозяйственно-значимых пестицидов и инсектицидов [2, 3]. Энантиоселективный химический синтез подобных соединений не только довольно сложен, но и крайне затратен. В данной связи, биотехнологическое получение их оптически чистых предшественников представляет экологически и экономически оправданную альтернативу.

Метаболический потенциал микробной клетки предлагает довольно широкий выбор анаболических путей для реализации энантиоселективного синтеза (*R*)-стереоизомеров 3-гидроксифункционализированных карбоновых кислот, в первую очередь 3-гидроксиалканоатов и потенциально 1,3-дио́лов. Соответственно, на сегодняшний день продукция (*R*)-3-гидроксиалканоатов из различных источников углерода была многократно продемонстрирована с использованием как природных продуцентов, так и направленно сконструированных микроорганизмов [4, 5]. Однако надо отметить, что эффективный биосинтез (*R*)-стереоизомеров представителей каждого из классов соответствующих соединений, в частности (*R*)-3-гидроксимасляной кислоты и (*R*)-1,3-бутандиола, из сахаров растительной биомассы, наиболее перспективного субстрата микробной биотехнологии, был обеспечен исключительно в рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* [6–9].

3-гидроксикарбоксилаты и 1,3-дио́лы обладающие (*S*)-стереоконфигурацией не являются природными метаболитами микроорганизмов. Однако их микробиологический синтез из возобновляемого сырья также может быть достигнут в результате применения подходов синтетической биологии и направленной метаболической инженерии.

Формирование метаболитов содержащих (*S*)-3-гидроксиацильные группы сопряжено в клетке с процессами катаболизма, физиологически протекающими в направлении обратном биосинтетическому. Соответствующими интермедиатами клеточного метаболизма являются структурно схожие с 3-гидроксиалканоатами тиоэфирные производные, вовлеченные в метаболизм жирных кислот. При этом следует отметить, что *de novo* биосинтез жирных кислот протекает с формированием соответствующих (*R*)-стереоизомеров, тогда как (*S*)-производные являются промежуточными продуктами деградации высокомолекулярных липидов. Таким образом, целевые хиральные соединения потенциально могут быть получены в результате микробиологического синтеза

с использованием жиров в качестве субстратов. Вместе с тем, продукция промышленно-значимых химикатов из сахаров, получаемых зернопереработкой, представляется более экономически оправданной, нежели конверсия в целевые соединения липидов, продуктов переработки масличных культур.

Интересной особенностью процесса деградационного бета-окисления жирных кислот является его способность протекания в биосинтетическом направлении [10]. Данный факт предполагает возможность анаболического формирования интермедиатов пути и, соответственно, последующей продукции их ценных производных направленно сконструированными микроорганизмами при использовании в качестве источников углерода гликолитических субстратов, в том числе сахаров растительной биомассы. Действительно, в ряде недавно опубликованных работ с использованием рекомбинантных штаммов *E. coli* был продемонстрирован биосинтез из глюкозы и глицерина различных коротко-, средне- и длинноцепочечных карбоновых кислот и спиртов в результате функционального обращения пути бета-окисления жирных кислот [11–14]. В случае производных хирального интермедиата цикла (3-гидроксиацил-КоА) были показаны как стереоселективный синтез (*S*)-3-гидроксимасляной кислоты [15], так и принципиальная возможность биосинтеза клетками *E. coli* 1,3-бутандиола [16] из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот. Однако в последнем случае низкие уровни накопления целевого вещества, синтезированного штаммом BOX-3 Δ3 P_L-*atoB* (MG1655 *lacI*^q P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*adhE*(Glu568Lys), P_L-SD_{phi10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*fadB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*fadE*, Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*), не позволяли напрямую оценить энантиомерную чистоту полученного продукта. Вместе с тем, потенциально, в клетках *E. coli* формирование ключевого предшественника в биосинтезе 1,3-бутандиола (3-гидроксибутирил-КоА) может катализироваться различными ферментами, конвертирующими ацетоацетил-КоА в соответствующее (*S*)- или (*R*)-гидроксипроизводное. Помимо (*S*)-специфичной 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы (КФ 1.1.1.35) бета-окисления жирных кислот, *FadB*, к этим ферментам относятся также (*R*)-специфичная 3-кетоацетил-АПБ редуктаза (КФ 1.1.1.100) биосинтеза жирных кислот, *FabG*, и обладающая неизвестной стереоспецифичностью 3-гидроксиацетил-КоА дегидрогеназа (КФ 1.1.1.–) пути деградации фенилацетата, *PaanH* [17–20].

Цель работы – оценить вклад побочных ферментов в формирование целевого продукта штаммом *E. coli*, сконструированным для синтеза 1,3-бутандиола по обращенному пути бета-окисления жирных кислот, и охарактеризовать потенциал пути для обеспечения энантиоселективного синтеза (*S*)-стереоизомера соответствующего диола.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды

Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Штамм *E. coli* К-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструирован-

ный штамм *E. coli* MG1655 *lacI*^Q P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*adhE*(Glu568Lys), P_L-SD_{phi10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*fadB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*fadE*, Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA* [16], обозначенный как BOX-3.2 Δ 3, с измененной регуляцией генов, кодирующих ферменты аэробного β -окисления жирных кислот, и с 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, SOC, а также в минимальной солевой среде M9 [21], с добавлением, при необходимости, 100 мкг/мл ампициллина («Синтез», Россия) или 30 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, США).

Таблица 1

Использованные штаммы, плазмиды и олигонуклеотидные праймеры

Strains, plasmids, and oligonucleotide primers used in this study

Объект	Генотип / последовательность	Источник
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
BOX-3.2 Δ 3	MG1655 <i>lacI</i> ^Q P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>adhE</i> (Glu568Lys), P _L -SD _{phi10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadE</i> , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i>	[16], коллекция лаборатории
BOX-3.2 Δ 3 Δ <i>praaH</i>	MG1655 <i>lacI</i> ^Q P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>adhE</i> (Glu568Lys), P _L -SD _{phi10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadE</i> , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>praaH</i>	» »
BOX-3.2 Δ 3 Δ <i>fadB</i>	MG1655 <i>lacI</i> ^Q P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>adhE</i> (Glu568Lys), P _L -SD _{phi10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadE</i> , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>fadB</i>	» »
BOX-3.2 Δ 3 Δ <i>praaH</i> Δ <i>fadB</i>	MG1655 <i>lacI</i> ^Q P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>adhE</i> (Glu568Lys), P _L -SD _{phi10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadE</i> , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>praaH</i> , Δ <i>fadB</i>	» »
Плазмида		
pMW118-(<i>lattL</i> -Cm- <i>lattR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>lattL-cat-lattR</i>	[22]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - <i>lgam-bet-exo</i>	[23]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - <i>laxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[24]
Праймер		
P1	5'-catgatgataaatgtgcaaacctgtggcagtgattggcgctcaagtagtataaaaa-gctgaac-3'	Данная работа
P2	5'-ttatgactcataaccgctctccagaagcggcgttggaagcctgctttttataactaagttgg-3'	» »
P3	5'-catgctttacaaggcgacaccctgtaccttgactgcgctcaagtagtataaaaa-gctgaac-3'	» »
P4	5'-ttaagccgttttcagtgcccaaccggacgggctggtgaagcctgctttttatact-aagttgg-3'	» »
P5	5'-cgtgaaggtgtcagtcgcttc-3'	» »
P6	5'-gtgacggctcatggtcactacagc-3'	» »
P7	5'-cgtgatcagatcgccatttc-3'	» »
P8	5'-cttctgcacgcagcttacg-3'	» »

Реагенты

В работе использовали *Taq* ДНК полимеразу и олигонуклеотидные праймеры (табл. 1) от компании «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 были произведены Panreac (Испания) и Sigma.

Конструирование штаммов и плазмид

Все хромосомные модификации осуществляли с использованием модифицированной [22] методики, разработанной Даценко и Ваннером [23]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *paaN* и *fadB*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1, P2 и P3, P4 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [22] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46 [23]. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *paaN* и *fadB*, подтверждали ПЦР анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P5, P6 и P7, P8.

Штаммы ВОХ-3.2 Δ3 Δ*paaN*, ВОХ-3.2 Δ3 Δ*fadB* и ВОХ-3.2 Δ3 Δ*paaN* Δ*fadB* были получены при введении соответствующих индивидуальных модификаций в хромосому штамма ВОХ-3.2 Δ3 с помощью P1-зависимой трансдукции [21]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [24].

Культивирование штаммов

Клетки рекомбинантных штаммов 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 мкМ FeSO₄. Полученные культуры растили в колбах объемом 750 мл при 37 °С на роторной качалке при 250 об/мин в течение 6 ч. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и 4 °С. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы в присутствии 10 мкМ FeSO₄. В дальнейшем культуры инкубировали в течение 24 ч в пробир-

ках 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. 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 (300 × 7,8 мм, 8 мкм), Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (Phenomenex, США) с детекцией при длине волны 210 нм. Подвижной фазой служил водный 2,5 мМ раствор серной кислоты со скоростью потока 0,5 мл/мин. Идентификацию и количественный анализ спиртов и 3-гидроксимасляной кислоты в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным и масс-селективным детектированием как было описано ранее [13, 15, 25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки потенциального вклада побочных ферментов в биосинтез 1,3-бутандиола из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот в качестве базового использовали ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655 *lacI*^o P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*adhE*(Glu568Lys), P_L-SD_{phi10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*fadB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{phi10}-*fadE*, Δ*ackA-pta*, Δ*proxB*, Δ*ldhA*, обозначенный как ВОХ-3.2 Δ3. Данный штамм был способен синтезировать 1,3-бутандиол в результате замены нативных регуляторных областей генов, кодирующих ферменты аэробного бета-окисления жирных кислот и основную алкоголь/альдегиддегидрогеназу клеток *E. coli*, искусственными регуляторными элементами и инактивации основных путей смешанно-кислотного брожения, конкурирующих с целевым путем биосинтеза за прямые метаболиты предшественники (пируват и ацетил-КоА). В отсутствие в среде специфического индуктора, штамм секретировал в составе продуктов анаэробной утилизации глюкозы заметные количества 3-гидроксимасляной кислоты и детектируемые количества 1,3-бутандиола. Биосинтез штаммом

соответствующих соединений в указанных условиях являлся следствием низкого уровня базальной транскрипции с промотора $P_{trc-ideal-4}$ генов *fadB* и *adhE*, кодирующих 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназу и бифункциональную алкоголь/альдегиддегидрогеназу (КФ 1.1.1.1/1.2.3.1), на фоне сильной конститутивной экспрессии гена *atoB* ацетил-КоА С-ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.9), обеспечивающей эффективное формирование из ацетил-КоА ацетоацетил-КоА для его последующей конверсии в 3-гидроксибутирил-КоА. В присутствии ИПТГ продукция производных интермедиатов бета-окисления жирных кислот штаммом прекращалась, и основным продуктом брожения ожидаемо становился этанол. Это объяснялось тем, что высокая субстратная специфичность алкоголь/альдегиддегидрогеназы AdhE способствовала предпочтительному синтезу этанола при индукции экспрессии гена *adhE* и, соответственно, снижению доступности ацетил-КоА для конкурентного формирования ацетоацетил-КоА и, следовательно, 3-гидроксибутирил-КоА. Соответственно, в настоящем исследовании характеристики продукции метаболитов сконструированными штаммами производными ВОХ-3.2 Δ3 оценивали при отсутствии в среде ИПТГ.

Клетки *E. coli* обладают единственной 3-кетонацил-АПБ-редуктазой FabG, участвующей в биосинтезе жирных кислот. Поэтому, соответствующий ген *fabG*, кодирующий фермент, способный катализировать превращение ацетоацетил-КоА в (R)-3-гидроксибутирил-КоА, является жизненно важным для *E. coli* [26] и, следовательно, был оставлен интактным в исследуемых штаммах.

Реакции терминальных стадий пути деградации фенилацетата протекают в бактериях с участием КоА-производных структурно схожих с

интермедиатами бета-окисления жирных кислот [27]. В данной связи, отдельные ферменты соответствующего пути также могут обеспечивать, в определенных условиях, формирование в клетке 3-гидроксибутирил-КоА. Таким образом, для оценки потенциального вклада ферментов пути деградации фенилацетата в формирование 3-гидроксибутирил-КоА в штамме ВОХ-3.2 Δ3, сконструированном для биосинтеза 1,3-бутандиола из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот, первоначально был инактивирован ген *raaH*, кодирующий 3-гидроксиацетил-КоА дегидрогеназу. Полученный штамм ВОХ-3.2 Δ3 Δ*raaH* при анаэробной утилизации глюкозы формировал спектр метаболитов аналогичный таковому штамму ВОХ-3.2 Δ3 (табл. 2).

При этом, штамм ВОХ-3.2 Δ3 Δ*raaH* продолжал секретировать 1,3-бутандиол и 3-гидроксимасляную кислоту, и накопление этих метаболитов оставалось неизменным, по сравнению с родительским штаммом. Данный факт указывал на то, что иные ферменты, помимо 3-гидроксиацетил-КоА дегидрогеназы RaaH, участвовали в штамме в формировании 3-гидроксибутирил-КоА. Можно было предположить, что в первую очередь именно 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа бета-окисления жирных кислот FadV должна была быть ответственна за синтез соответствующего интермедиата цикла. Действительно, при последующей делеции гена *fadB* соответствующий штамм ВОХ-3.2 Δ3 Δ*raaH* Δ*fadB* прекращал синтез производных 3-гидроксибутирил-КоА – 3-гидроксимасляной кислоты и 1,3-бутандиола, в то время как, наряду с возросшим накоплением этанола, среди секретированных штаммом метаболитов обнаруживалась уксусная кислота (табл. 2). Уксусная кислота и этанол являются производными

Таблица 2

Концентрации метаболитов (мМ), продуцируемых сконструированными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы

Concentrations of metabolites produced by constructed strains during anaerobic glucose utilization

Штамм	Пировиноградная кислота	Уксусная кислота	Янтарная кислота	Этанол	3-гидроксимасляная кислота	1,3-бутандиол
ВОХ-3.2 Δ3	3,0±0,3	–	2,0±0,1	3,7±0,3	2,0±0,2	0,30±0,02
ВОХ-3.2 Δ3 Δ <i>raaH</i>	2,9±0,2	–	2,2±0,2	3,5±0,2	2,1±0,1	0,30±0,03
ВОХ-3.2 Δ3 Δ <i>raaH</i> Δ <i>fadB</i>	4,1±0,3	1,5±0,1	2,4±0,2	4,8±0,5	–	–
ВОХ-3.2 Δ3 Δ <i>fadB</i>	3,9±0,3	1,7±0,1	2,2±0,2	4,6±0,4	–	–

Примечание: Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

Note: Standard deviations for three independent experiments are given.

ацетил-КоА и синтезировались в штамме, как и 3-гидроксимасляная кислота и 1,3-бутандиол, из соответствующего КоА-предшественника, под действием аналогичных тиоэстераз и основной алкоголь/альдегиддегидрогеназы AdhE.

Таким образом, повышенная продукция указанных двухуглеродных соединений при инактивации 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы FadB свидетельствовала о перераспределении в штамме потока углерода через ацетил-КоА в сторону предпочтительного формирования его прямых производных в результате прекращения его конкурентного вовлечения в последовательный биосинтез ацетоацетил-КоА и 3-гидроксibuтирил-КоА. Это подтверждало вовлеченность соответствующего фермента в формирование 3-гидроксibuтирил-КоА в ВОХ3-производных штаммах и потенциально предполагало преимущественное формирование именно (*S*)-стереоизомера целевого интермедиата. Более того, отсутствие продукции 3-гидроксимасляной кислоты и 1,3-бутандиола штаммом ВОХ-3.2 Δ3 *ΔpaaH ΔfadB* с одновременно инактивированными 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназой и 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназой однозначно указывало на то, что (*R*)-специфичная 3-кетоацил-АПБ-редуктаза биосинтеза жирных кислот, FabG, способная к катализу реакций с участием соответствующих КоА-тиоэфиров, не принимала участия в биосинтезе 3-гидроксibuтирил-КоА в штамме ВОХ-3.2 Δ3 и его сконструированных производных.

Тем не менее, полученные данные все еще не позволяли полностью исключить вклада 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназы в формирование хирального предшественника 3-гидроксимасляной кислоты и 1,3-бутандиола, синтезируемых штаммом ВОХ-3.2 Δ3. Действительно, высокая субстратная специфичность 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы FadB к ацетоацетил-КоА могла компенсировать отсутствие в штамме ВОХ-3.2 Δ3 *ΔpaaH* 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназы, обеспечивая наблюдаемый уровень синтеза 3-гидроксимасляной кислоты и 1,3-бутандиола, сравнимый с показателями родительского штамма, за счет сохранения интенсивности формирования 3-гидроксibuтирил-КоА. Однако интактная 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназа PaaH могла обеспечивать фоновый уровень конкурентного образования 3-гидроксibuтирил-КоА в базовом штамме, обуславливая возможность хиральной контаминации целевых продуктов.

С целью точной оценки потенциального вклада 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназы в формирование 3-гидроксibuтирил-КоА в штамме

ВОХ-3.2 Δ3, сконструированном для биосинтеза 1,3-бутандиола из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот, ген *fadB* 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы был инактивирован в штамме при сохранении интактного гена *paaH*. Соответствующий штамм ВОХ-3.2 Δ3 *ΔfadB* при анаэробной утилизации глюкозы формировал спектр секретированных метаболитов, сходный с таковым штамма ВОХ-3.2 Δ3 *ΔpaaH ΔfadB* и четко отличающийся от демонстрируемых штаммами ВОХ-3.2 Δ3 и ВОХ-3.2 Δ3 *ΔpaaH* (табл. 2). Так же как и штамм ВОХ-3.2 Δ3 *ΔpaaH ΔfadB*, штамм ВОХ-3.2 Δ3 *ΔfadB*, лишенный 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы аэробного бета-окисления жирных кислот, но сохраняющий интактную 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназу пути деградации фенилацетата, не синтезировал детектируемых количеств производных 3-гидроксibuтирил-КоА – 3-гидроксимасляной кислоты и 1,3-бутандиола. При этом штамм ВОХ-3.2 Δ3 *ΔfadB*, аналогично штамму ВОХ-3.2 Δ3 *ΔpaaH ΔfadB*, демонстрировал тенденцию к повышенному накоплению прямых производных ацетил-КоА – уксусной кислоты и этанола.

Таким образом, наличие в штамме ВОХ-3.2 Δ3 *ΔfadB* интактной 3-гидроксиадипил-КоА дегидрогеназы не обеспечивало уровня формирования предшественника достаточного для достоверно детектируемой продукции целевых соединений, и синтез 3-гидроксимасляной кислоты и 1,3-бутандиола исследованными штаммами напрямую зависел лишь от наличия/отсутствия в них активности 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы.

В совокупности результаты исследования позволили заключить, что синтез 3-гидроксibuтирил-КоА в штамме ВОХ-3.2 Δ3, сконструированном для биосинтеза 1,3-бутандиола из глюкозы по обращенному пути бета-окисления жирных кислот, осуществлялся исключительно (*S*)-специфичным ферментом соответствующего метаболического пути, 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназой FadB, тогда как ни 3-кетоацил-АПБ-редуктаза FabG, ни 3-гидроксиадипил-КоА-дегидрогеназа PaaH не принимали участия в формировании соответствующего КоА-производного.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате обращения пути бета-окисления жирных кислот в рекомбинантных штаммах *E. coli* может быть обеспечен энантиоселективный биосинтез из глюкозы (*S*)-стереоизомера 1,3-бутандиола. Эффективная продукция целевого соединения потребует обеспечения в клетке

оптимального окислительно-восстановительного баланса и экспрессии высокоспецифичных терминальных альдегид- и алкоголь- дегидрогеназ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-29-08059).

ЛИТЕРАТУРА

- Aguilar A., Twardowski T., Wohlgemuth R. Bioeconomy for Sustainable Development. *Biotechnol J.*, 2019, 14(8):e1800638, doi: 10.1002/biot.201800638
- Patel R.N. (Ed.). Stereoselective biocatalysis. New York: Marcel Dekker Inc, 2000.
- Rosen T.C., Daussmann T., Stohrer J. Bioreduction forms optically active 3-hydroxyesters. *Spec. Chem. Mag.*, 2004, 24(4), 39–40.
- Chen G.Q., Wu Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67(5), 592–599. doi: 10.1007/s00253-005-1917-2
- Ren Q., Ruth K., Thöny-Meyer L., Zinn M. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 87(1), 41–52. doi: 10.1007/s00253-010-2530-6
- Lee S.Y., Lee Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)(–)-hydroxycarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(6), 3421–3426. doi: 10.1128/aem.69.6.3421-3426.2003
- Park S.J., Lee S.Y., Lee Y. Biosynthesis of (R)-3-hydroxyalkanoic acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2004, 113–116, 373–379.
- Kataoka N., Vangnai A.S., Tajima T., et al. Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, 115(5), 475–480. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.025
- Kataoka N., Vangnai A.S., Ueda H., et al. Enhancement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli* using a bioreactor system with strict regulation of overall oxygen transfer coefficient and pH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014, 78(4), 695–700. doi: 10.1080/09168451.2014.891933
- Nandedkar A.K., Kumar S. Biosynthesis of fatty acids in mammary tissue. II. Synthesis of butyrate in lactating rabbit mammary supernatant fraction by the reversal of beta-oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, 134(2), 563–571.
- 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, 355–359. doi: 10.1038/nature10333
- 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, 541–554. doi: 10.1021/sb3000782
- Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol biosynthesis through the inverted aerobic fatty acid β -oxidation pathway. *Biotechnol. Lett.*, 2012, 34(3), 463–469. doi: 10.1007/s10529-011-0797-z
- Kim S., Clomburg J.M., Gonzalez R. Synthesis of medium-chain length (C6–C10) fuels and chemicals via β -oxidation reversal in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 42, 465–475. doi: 10.1007/s10295-015-1589-6
- Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Debabov V.G. Biosynthesis of enantiopure (S)-3-hydroxybutyrate from glucose through the inverted fatty acid β -oxidation pathway by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 2017, 244, 16–24. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.009
- Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., и др. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для биосинтеза 1,3-бутандиола по обращенному пути β -окисления жирных кислот. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2016, 52(1), 21–29. doi: 10.7868/S0555109916010050
- Taguchi K., Aoyagi Y., Matsusaki H., et al. Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 176, 183–190. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13660.x
- Zhang Y.M., Wu B., Zheng J., Rock C.O. Key residues responsible for acyl carrier protein and beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) interaction. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 52935–52943. doi: 10.1074/jbc.M309874200
- Park S.J., Lee S.Y. Identification and characterization of a new enoyl coenzyme A hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2003, 185, 5391–5397. doi: 10.1128/JB.185.18.5391-5397.2003
- Babu T., Yun E.J., Kim S., et al. Engineering *Escherichia coli* for the production of adipic acid through the reversed β -oxidation pathway. *Process. Biochem.*, 2015, 50, 2066–2071. doi: 10.1016/j.procbio.2015.09.018
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ndedn. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory. Press., 1989, 1659 p.
- 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.
- 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

24. 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.
25. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Моржакова А.А., и др. Синтез 1-бутанола клетками *Escherichia coli* при формировании бутирил-КоА гетерологичными ферментами клостридий и нативными ферментами β -окисления жирных кислот. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2012, 48(4), 383–388.
26. Zhang Y., Cronan J.E. Jr. Transcriptional analysis of essential genes of the *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous *Salmonella typhimurium* gene cluster. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(13), 3295–3303.
27. Teufel R., Mascaraque V., Ismail W., et al Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, 107(32), 14390–14395. doi: 10.1073/pnas.1005399107

Study of the Potential of Reversal of the Fatty Acid Beta-Oxidation Pathway for Stereoselective Biosynthesis of (*S*)-1,3-Butanediol from Glucose by Recombinant *Escherichia coli* Strains

A.Yu. GULEVICH^{1,*}, A.Yu. SKOROKHODOVA¹, and V.G. DEBABOV¹

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

*e-mail: gulevich@genetika.ru

Received August 01, 2019

Accepted August 20, 2019

Abstract—A possible contribution of collateral enzymes to the formation of key precursor metabolite, 3-hydroxybutyryl-CoA, in a recombinant *Escherichia coli* strain engineered for 1,3-butanediol biosynthesis from glucose through the inverted fatty acid beta-oxidation pathway has been evaluated. The inactivation of the 3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase gene, *paaH*, did not prevent the 1,3-butanol biosynthesis during anaerobic glucose utilization by the strain with the intact essential gene *fabG* coding for 3-ketoacyl-ACP reductase, which can catalyze the conversion of acetoacetyl-CoA to (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. The subsequent inactivation in the strain of *fadB* gene coding for (*S*)-stereospecific 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase of the fatty acid beta-oxidation led to the abolishment of the 1,3-butanediol synthesis. The respective diol was also not found among the products secreted by the strain possessing the intact *fabG* and *paaH* genes upon an individual deletion of *fadB* gene. It was established that the collateral enzymes did not participate in the formation of 3-hydroxybutyryl-CoA in the studied strains and the respective CoA-derivative was synthesized solely by the (*S*)-specific enzyme of the fatty acid beta-oxidation pathway. The obtained results indicate that the reversal of the fatty acid beta-oxidation pathway can ensure the enantioselective biosynthesis of the (*S*)-stereoisomer of 1,3-butanediol in engineered *E. coli* strains.

Key words: 1,3-butanediol, fatty acid beta-oxidation, *Escherichia coli*, glucose, metabolic engineering, stereoisomer.

Funding—The work was carried out with financial support Russian Foundation for Fundamental Research (No.18-29-08059).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-12-19