

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66; 573.6

Экспрессия гена НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* повышает продукцию лизина в *Corynebacterium glutamicum*© 2019 Л. Е. РЯБЧЕНКО^{1,*}, Т. Е. ЛЕОНОВА¹, Т. Е. ШУСТИКОВА¹, Т. В. ГЕРАСИМОВА¹, Т. А. ИВАНКОВА¹, К. В. СИДОРЕНКО¹, А. С. ЯНЕНКО¹¹ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), Москва, 117545

*e-mail: ryabchenko@genetika.ru

Поступила в редакцию 12.11.2019 г.

После доработки 20.11.2019 г.

Принята к публикации 27.11.2019 г.

В клетках штаммов *Corynebacterium glutamicum*, продуцирующих лизин, был экспрессирован ген *psefdh_D221Q* мутантной формиатдегидрогеназы (ПсеФДГ_D221Q) из *Pseudomonas*, которая катализирует окисление формиата с одновременным образованием НАДФН. Ген *psefdh_D221Q* был введен в штаммы *C. glutamicum* в составе автономной плазмиды, или интегрирован в хромосому с одновременной инактивацией хозяйских генов формиатдегидрогеназы. Результаты изучения штаммов *C. glutamicum* с НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназой показали, что такие штаммы в случае инактивации собственной формиатдегидрогеназы обладают повышенным уровнем синтеза L-лизина в присутствии формиата.

Ключевые слова: L-лизин, формиатдегидрогеназа, НАДФН, *Corynebacterium glutamicum*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-21-29

Уровень синтеза аминокислот аспарагинового семейства (треонина, метионина, лизина, изолейцина) в клетках бактерий в значительной степени зависит от доступности кофактора НАДФН (рис. 1). Наличие в клетках достаточного количества НАДФН особенно важно для биосинтеза L-лизина, на синтез одной молекулы которого расходуется четыре молекулы НАДФН (рис. 1) [1, 2]. Известно, что в клетках *C. glutamicum* – ключевого продуцента аминокислот [3–5], НАДФН синтезируется в окислительной ветви пентозофосфатного пути с помощью двух ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.44) [6], в цикле трикарбоновых кислот с помощью изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) [7] и малик-фер-

мента (КФ 1.1.1.40), превращающего малат в пируват [8] (рис. 1). В результате анализа метаболических потоков было показано, что в клетках *C. glutamicum*, продуцирующих L-лизин, НАДФН преимущественно образуется в окислительной ветви пентозофосфатного пути [9]. Однако синтез двух молекул НАДФН в пентозофосфатном пути сопровождается потерей одного атома углерода из молекулы глюкозы в виде CO₂ (рис. 1). В связи с этим представляется перспективным использование других метаболических реакций синтеза НАДФН для повышения уровня синтеза лизина.

Одним из подходов, позволяющих повысить доступность НАДФН в клетках *C. glutamicum* и увеличить уровень продукции лизина, является замена НАДФ⁺-зависимой глицеральдегид-3-фосфат

Список сокращений: ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов; НАДФН – никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат восстановленный, ФДГ – формиатдегидрогеназа, ПсеФДГ_D221Q – НАДФ⁺-зависимая формиатдегидрогеназа с мутацией D221Q, ФС – ферментационная среда, РФ – ферментационная среда для рабочего ферментера, КЖ – культуральная жидкость.

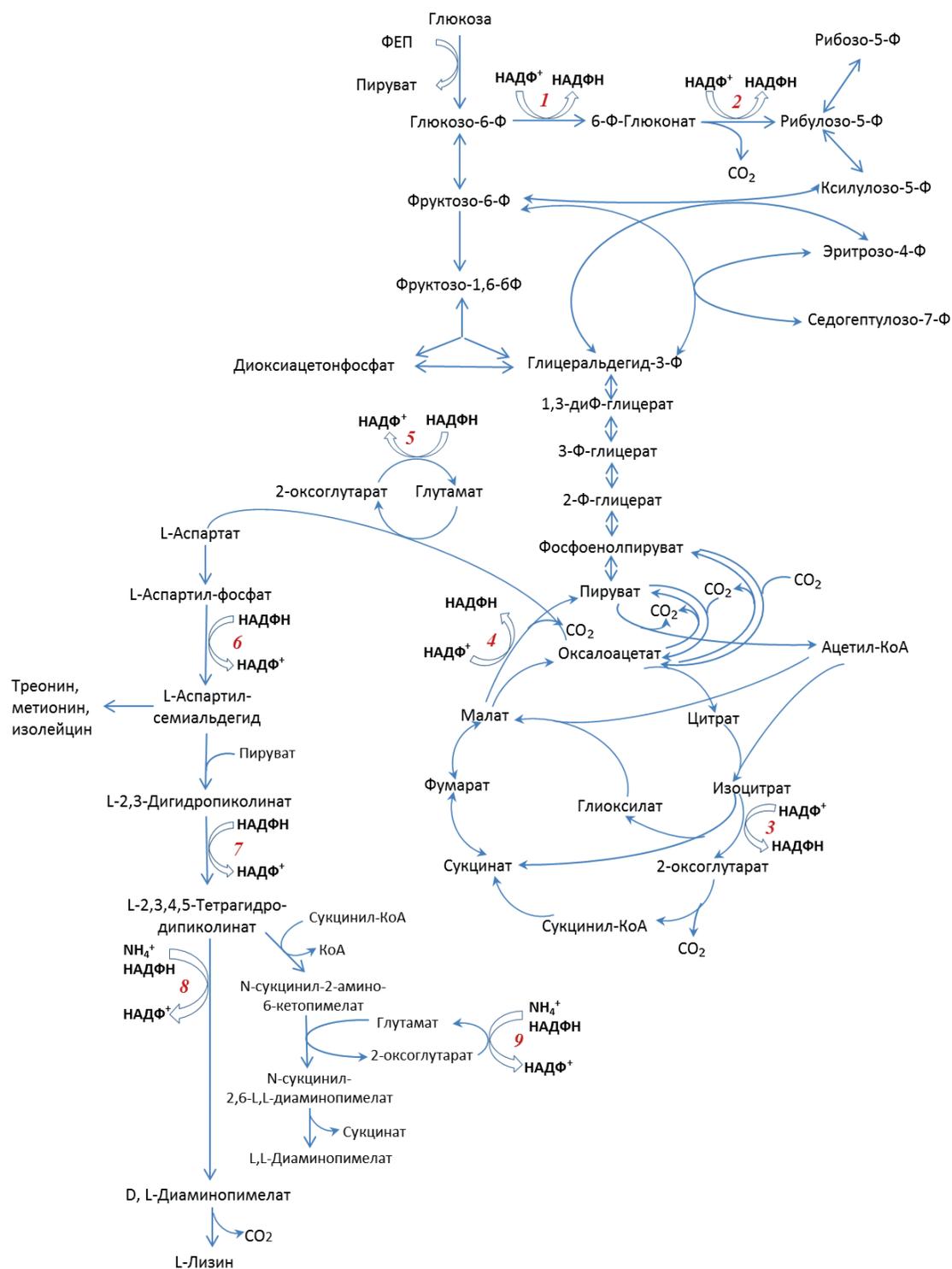


Рис. 1. Биосинтез L-лизина и других аминокислот аспарагинового семейства из глюкозы в клетках *C. glutamicum*. Синтез НАДФН (1–4) с помощью ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) (1), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.44) (2), изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) (3), малик-фермента (КФ 1.1.1.40) (4); потребление НАДФН (5–9) с помощью ферментов: аспаратаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1) (5), аспарат-β-полуальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.11) (6), 4-гидрокси-тетрагидропикколинат редуктазы (КФ 1.17.1.8) (7), диаминопимелатдегидрогеназы (КФ 1.4.1.16) (8), сукцинилдиаминопимелаттрансаминазы (КФ 2.6.1.17) (9)

Fig. 1. Biosynthesis of L-lysine and other amino acids of the asparagine family from glucose in *C. glutamicum* cells. The numbers indicate 1 to 4 reactions of NADPH synthesis using enzymes: 1 – glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49), 2 – 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44), 3 – isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42), 4 – malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP⁺) (EC 1.1.1.40); 5–9 reactions of NADPH consumption with the help of enzymes: 5 – aspartate transaminase (EC 2.6.1.1), 6 – aspartate semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.11), 7 – 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase (EC 1.17.1.8), 8 – diaminopimelate dehydrogenase (EC 1.4.1.16), 9 – succinyl diaminopimelate transaminase (EC 2.6.1.17)

дегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) (в природном штамме) на НАДФ⁺-зависимый фермент из других видов бактерий, либо полученный с помощью рационального дизайна [10, 11].

Другим подходом повышения доступности НАДФН является экспрессия в клетках *C. glutamicum* генов трансгидрогеназы (КФ 1.6.1.5) из *E. coli*, которая катализирует превращение НАДН в НАДФН и обратно [12]. Этот подход также позволяет повысить уровень синтеза лизина [13].

Известно, что штаммы *C. glutamicum* способны метаболизировать формиат благодаря наличию собственной формиатдегидрогеназы (КФ 1.17.1.9, ФДГ), которая не использует в качестве кофактора НАД⁺ или НАДФ⁺ [14].

Цель настоящей работы – повышение доступности НАДФН в клетках *C. glutamicum*, продуцирующих лизин, с помощью мутантной формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101, катализирующей окисление формиата до углекислого газа с одновременным образованием НАДФН [15, 16].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы и плазмиды (табл. 1)

Штамм *C. glutamicum* A1 является производным штамма *C. glutamicum* DSM 1412 (или ATCC13869), в котором мутация в гене *lysC* приводит к замене треонина на изолейцин в позиции 311 и обеспечивает устойчивость аспартокиназы к ретроингибированию лизином и треонином. Для замены дикой копии гена на мутантную использовали нереплицирующуюся суицидную плазмиду pIKA-sac13 [18], способную встраиваться в хромосому *C. glutamicum* по гомологичной рекомбинации. На ее основе получен вектор pIKA-sac13-lysC311.

Штамм *C. glutamicum* H215 – производный от штамма продуцента L-лизина *C. glutamicum* ВКПМ В-12771 [17] (прародитель – штамм *C. glutamicum* ATCC 13869) – был получен путем замещения нативных аллелей ряда генов (табл. 1) на мутантные аллели с использованием сконструированных на основе плазмиды pIKA-sac13 [17, 18] векторов, содержащих участки гомологии с генами-мишенями.

Таблица 1

Штаммы и плазмиды, используемые в работе

Strains and plasmids

Название	Характеристика	Источник получения
Штаммы		
<i>E. coli</i>		
XL1	Штамм дикого типа	ВКПМ
<i>C. glutamicum</i>		
DSM 1412 (ATCC13869)	Штамм дикого типа	Немецкая коллекция микроорганизмов (DSMZ)
A1	<i>C. glutamicum</i> DSM 1412 <i>lysC</i> ^{T311}	Данная работа
A1-30	A1 $\Delta fdhD-fdhF::Pef tu-psefdh_D221Q$	То же
ВКПМ В-12771	Штамм <i>C. glutamicum</i> (ранее <i>Brevibacterium flavum</i>) ВКПМ В-12771 продуцент лизина	[17]
H215	Производный от штамма <i>C. glutamicum</i> ВКПМ В-12771, содержащий модификации в генах: <i>murE81</i> , $\Delta alaT$, $\Delta lysI$, Δodx , Δldh , $\Delta sugR$, <i>Psod-ptsI</i>	Данная работа
H217	H215 $\Delta fdhD-fdhF::Pef tu-psefdh_D221Q$	То же
Плазмиды		
pJET1	Вектор для клонирования	Thermo Scientific
pJET1- <i>psefdh</i>	pJET1 с <i>psefdh_D221Q</i> из <i>Pseudomonas</i> sp.	Данная работа
pIKA-sac13	pUC19 + Km ^R из pUC4K + <i>sacB</i> из <i>B. subtilis</i> 168	[18]
pIKA-sac13- <i>lysC311</i>	pIKA-sac13 + <i>lysC311</i> ^{T311}	Данная работа
pNS- <i>Pef tu-psefdh</i>	pNS2- <i>Pef tu-psefdh_D221Q</i>	То же
pJET1- <i>fdh</i>	pJET1 с генами <i>fdhDF</i> <i>C. glutamicum</i>	» »
pJET1- Δfdh	pJET1- <i>fdh</i> с делецией SmaI-SmaI в генах <i>fdhDF</i>	» »
pJET1- $\Delta fdh::Pef tu-psefdh$	pJET1- Δfdh со встройкой <i>Pef tu-psefdh_D221Q</i>	» »
pIKA- $\Delta fdh::Pef tu-psefdh$	pIKA- Δfdh со встройкой <i>Pef tu-psefdh_D221Q</i>	» »

Штаммы *E. coli* выращивали на среде LB при 37°C. При необходимости в среду добавляли антибиотики: канамицин – 50 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл. Штаммы *C. glutamicum* выращивали на среде 2×LB с 1% мальтозой при 30°C. Для трансформации *C. glutamicum* использовали BHIS-среду, следующего состава, г/л: сердечно-мозговой бульон (brain heart infusion, BHI) (Difco, USA) – 37,0; сорбит – 30,0; агар – 15,0 (в случае твердой среды). Для определения уровня продукции L-лизина штаммами *C. glutamicum* ферментации проводили в пробирках на ферментационной среде (ФС) и в 3 л лабораторных ферментерах (B.Braun Biotech Co, Германия) на среде РФ с подпиткой (табл. 2) при 30 °C.

В качестве подпитки использовали раствор, содержащий 65% глюкозы, а также при необходимости добавляли другие компоненты.

Конструирование плазмид и штаммов

Введение мутации ACC→ATC (Thr311Ile) в последовательность гена *lysC*, кодирующего аспараткиназу, проводили с помощью ПЦР с мутантными праймерами. Левый фланг гена размером около 0,5 тпн амплифицировали с хромосомной ДНК штамма ATCC13869 с помощью праймеров F *lysC1* и мутантного R *lysC311m*. Правый фланг гена размером около 0,5 тпн амплифицировали с хромосомной ДНК штамма ATCC13869 с помощью праймеров мутантного F *lysC311m* и R *lysC2* (табл. 3). Оба фрагмента объединяли с помощью ПЦР за счет гомологичных последовательностей, находящихся в составе мутантных праймеров. Полученный фрагмент размером 0,98 тпн, содержащий в середине мутацию Thr311Ile клонировали в вектор pKA-sac13 по уникальным сайтам рестрикции SalI и BamHI.

Последовательность нуклеотидов с мутацией проверяли с помощью секвенирования. Полученную плазмиду назвали pKA-sac13-lysC311 (6,9 тпн).

Для конструирования штамма *C. glutamicum* ATCC13869 с мутацией в *LysC* полипептиде ACC→ATC (Thr311Ile), провели трансформацию штамма ATCC13869 плазмидой pKA-sac13-lysC311. У Km^R трансформанта индуцировали выщепление плазмиды на среде BHI с 10% сахарозы, и среди выросших колоний искали Km^S по отсутствию роста на среде BHI с канамицином (10 мкг/мл). Из таких штаммов выделяли хромосомную ДНК и проводили ПЦР с двух пар праймеров F *lysC311mseq/R lysC2* и F *lysC311/R lysC2* (табл. 3) с использованием SNPdetect полимеразы («Евроген», Россия). Данная полимеразы используется для выявления однонуклеотидных полиморфизмов. При наличии мутации в гене *lysC* ACC→ATC, ПЦР сигнал с пары праймеров F *lysC311mseq/R lysC2* был более интенсивный, чем с пары праймеров F *lysC311/R lysC2*. В качестве контроля ставили ПЦР с хромосомной ДНК штамма ATCC13869. В результате скрининга отобран штамм *C. glutamicum* A1 с мутацией *lysC*^{Thr311Ile}. Наличие мутаций подтвердили секвенированием фрагмента, амплифицированного с хромосомной ДНК штамма *C. glutamicum* A1 с праймеров F *lysC1* и R *lysC2* (табл. 3).

Такую же схему применяли при конструировании плазмид для введения мутаций в гены *mur*, *alaT*, *lysI*, *odx*, *ldh*, *sugR* и замены нативного промотора гена *ptsI* на *Psod* при получении штамма *C. glutamicum* H215.

Для клонирования гена *psefdh_D221Q* использовали автономную плазмиду pNS-Peftu-cat [18]. Ген *psefdh_D221Q* амплифицировали с помощью ПЦР с ДНК, полученной от В.И. Тишкова, имеющего

Таблица 2

Состав сред для ферментации со штаммами *C. glutamicum*
Fermentation media for *C. glutamicum* strains

Компонент	Среда, г/л	
	ФС	РФ
Глюкоза моногидрат	100,0	46,0
Аммоний сернокислый	19,0	55,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1,0	9,0
Магний сернокислый 7-водный	1,0	3,15
Кальций углекислый	25,0	–
d-биотин/дестиобиотин	1·10 ⁻⁴ / –	– / 4,5·10 ⁻³
Тиамин гидрохлорид (витамин B1)	2·10 ⁻⁴	4,5·10 ⁻⁴
Железо сернокислое 7-водное	–	4,5·10 ⁻²
Марганец хлористый 4-водный	–	4,5·10 ⁻²
Экстракт кукурузный	–	7,3
Гидролизат пшеничного глютена 50%-ный нейтрализованный аммиаком водным	100,0 мл	–
Пенегаситель	–	1,0
pH	7,0–7,2	

ДНК-специфические праймеры, использованные в работе
DNA-specific primers used in the work

Праймер	Последовательность	Назначение
F lysC1	CCGTCGACTGGGTCGTGGTGGTTCTGACACCACTGC	Клонирование гена <i>lysC</i> ^{T311}
R lysC311m	CGGCCGTCAGCACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGG	То же
F lysC311m	CCGACATCATCTTTCACCTGCCCTCGTGCTGACGGCCGC	» »
R lysC2	GCGGATCCCGGAATCAATCTTACGGCCTGCGGAACG	» »
F lysC311mseq	TGCTTCTGTAGAAGACGGCACCACCGACATCAT	Тестирование мутации <i>lysC</i> ^{T311}
lysC311	TGCTTCTGTAGAAGACGGCACCACCGACATCAC	То же
F-psefdh	TTGGATCCGCAAAGGTCCTGTGCGTT	Клонирование гена <i>psefdh</i> _D221Q из <i>Pseudomonas</i>
R-psefdh	<i>TTGATATCGAATTCTCAGACCGCCTTCTT</i>	То же
F fdhD–Coryn	GATATCTTATCCGAGCTCGCCCCGAT	Клонирование генов <i>fdhF</i> , <i>fdhD</i> , cg0617 из <i>C. glutamicum</i>
R fdhF–Coryn	GATATCATGACAACCCCTCCAACCTGA	То же
F _{M13/pUC(-40)}	GTTTCCCAGTCACGAC	Клонирование генов Δ <i>fdhD</i> – <i>fdhF</i> :: <i>Peftu-psefdh</i> _D221Q
14-Km20sqrev	CTACCTTCTTACGAGGCAGACCTC	То же

Примечание: выделены сайты рестрикции.

Note: restriction sites are shown in bold.

коллекцию бактериальных мутантных формиатдегидрогеназ [15], используя праймеры F-psefdh и R-psefdh (табл. 3). 1,2 тпн ПЦР фрагмент лигировали с вектором pJET1, отбирали клоны, несущие вставку. После секвенирования плазмидную ДНК pJET1-psefdh рестрицировали ферментами BamHI и EcoRV (сайты для этих рестриктаз присутствуют на концах праймеров F-psefdh и R-psefdh) и лигировали с вектором pNS2-*Peftu*-cat, рестрицированным ферментами BamHI и Ecl136I. В результате рестрикции ферментами BamHI и Ecl136I из векторной плазмиды pNS2-*Peftu*-cat вырезается ген хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*cat*), а на его место под промотор гена фактора элонгации (*Peftu*) встраивается ген *psefdh*_D221Q. Полученная плаزمида названа pNS-*Peftu*-psefdh.

Для интеграции гена *psefdh*_D221Q в хромосому штаммов *C. glutamicum* использовали плазмиду pKA-Δ*fdh*, полученную в данной работе. Кластер *fdh*-генов *C. glutamicum* – *fdhF* (cg0618), *fdhD* (cg0616) и cg0617 (3630 п.о.) был амплифицирован с хромосомы штамма *C. glutamicum* DSM 1412, используя праймеры F *fdhD*-Coryn. и R *fdhF*-Coryn. (табл. 3). ПЦР фрагмент лигирован с вектором pJET1. Внутренний SmaI-SmaI фрагмент вставки, размером 2324 п.о. был вырезан из полученной плазмиды pJET1-*fdh*, а на его место встроены 1,4 тпн ПЦР фрагмент *Peftu-psefdh*_D221Q, полученный с помощью ПЦР, используя праймеры F_{M13/pUC(-40)} и 14-Km20sqrev и плазмиду pNS-*Peftu*-psefdh_D221Q как матрицу. Далее ген

*Peftu-psefdh*_D221Q с плечами коринебактериальных генов *fdhD* и *fdhF* вырезали по EcoRV сайтам, введенным в плазмиду с праймерами F *fdhD*-Coryn. и R *fdhF*-Coryn., и клонировали в pKA-sac13.

Генно-инженерные методы

Выделение плазмид и трансформацию *E. coli* проводили по стандартным методикам [19]. Рестрикцию и лигирование ДНК проводили в условиях, рекомендованных изготовителем ферментов (Thermo Scientific). Амплификацию проводили с использованием Mastercycler gradient (Eppendorf), с помощью полимеразы Phusion High-Fidelity (#F-503L, Thermo Scientific) или Taq-полимеразы (#EP0404 Fermentas, Литва) в условиях, рекомендованных изготовителем. Олигонуклеотиды были синтезированы ЦКП ГосНИИгенетика. Приготовление компетентной культуры *C. glutamicum* и электропорацию проводили в соответствии с методом Van der Rest [20]. Условия электропорации: 2500 В, 25 мкФ, 200 Ом. Длительность электроимпульса составляла 4,5–5,5 мс, в зависимости от качества клеток и чистоты ДНК.

Культивирование штаммов для биосинтеза L-лизина

При проведении лизиновых ферментаций в пробирках с 3 мл среды ФС без/с формиатом аммония (8,0 г/л) посевной материал вносили в количестве 10% от начального объема среды. Культивирование осуществляли на шейкер-инкубаторе

Multitron 2 (Infors, США) в течение 72 ч при 30 °С и 300 об/мин. При необходимости вносили канамицин (10 мкг/мл). Ферментации в 3 л лабораторных ферментерах проводили при 34 °С, pH 7,0–7,1 в течение 50 ч. Посевной материал вносили в количестве 25% от начального объема среды. В процессе ферментации pH среды поддерживали аммиаком водным. Подпитку подавали периодически в зависимости от содержания глюкозы в среде. При необходимости в среду РФ вносили формиат аммония до 5 г/л и в подпитку на 1 ферментацию – 12 г.

Аналитические методы

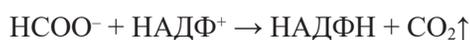
Оптическую плотность выращенных культур измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при 600 нм в 1-см кювете. Концентрацию L-лизина и формиата определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа UltiMate 3000 с детектором Fluorescence Detector FLD-3100 и автосемплером WPS-3000TSL ANALYTICAL (Thermo Scientist). Прием и обработку данных производили с использованием компьютерной программы Chromeleon Dionex Version 7.2.3.755. Активность ФДГ определяли при 25 °С на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu) по поглощению образующегося НАДФН при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [15]. Измерения проводили в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем НАДФ⁺ (1 мг/мл) и формиат аммония (0,4 М). Активность НАДФ⁺-зависимой ФДГ рассчитывали исходя из коэффициента поглощения НАДФН как нмоль НАДФН, образующегося в 1 мин в расчете на 1 мг общего белка (ед/мг белка).

По окончании культивирования рассчитывали конверсию как отношение количества синтезированного L-лизина (по лизин гидрохлориду) к затраченной глюкозе (при культивировании без формиата) и к сумме затраченных глюкозы и формиата (в присутствии формиата).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние НАДФ⁺-зависимой ФДГ из *Pseudomonas* sp. 101 на синтез лизина в клетках низкопродуктивных штаммов *C. glutamicum*

Синтез аминокислот аспарагинового семейства, в т.ч. лизина и треонина, в клетках *C. glutamicum* зависит от доступности кофактора НАДФН. С целью повышения доступности НАДФН, в клетках *C. glutamicum* был экспрессирован ген *psefdh_D221Q* мутантной формиатдегидрогеназы (PseФДГ_D221Q) из *Pseudomonas* sp. 101, которая катализирует окисление формиата с одновременным образованием НАДФН,



и исследован уровень синтеза лизина в рекомбинантных штаммах.

Ген *psefdh_D221Q*, кодирующий НАДФ⁺-зависимую ФДГ, вводили в штаммы *C. glutamicum* с разным уровнем продукции лизина либо в составе автономной плазмиды pNS-Peftu-psefdh, либо интегрировали в хромосому с одновременной инактивацией собственных генов формиатдегидрогеназы как описано в разделе «Условия эксперимента».

На первом этапе были сконструированы производные штамма А1 с низким уровнем продукции лизина, содержащие ген *psefdh_D221Q* под сильным промотором фактора элонгации (*Peftu*) как в составе плазмиды (штамм А1 (pNS2-Peftu-psefdh)), так и в хромосоме с инактивацией собственной ФДГ (штамм А1-30). Ростовые характеристики и уровень продукции лизина при выращивании полученных штаммов с/без формиата аммония приведены в табл. 4. Штаммы выращивали на среде ФС в пробирках как описано в «Условиях эксперимента». Прирост количества лизина за счет формиата рассчитывали по формуле: $(\text{Л2}-\text{Л1})/\Phi$, где Л2 – конечная концентрация лизина в КЖ в присутствии формиата, г/л; Л1 – конечная концентрация лизина в КЖ без формиата, г/л; Φ – израсходованный формиат, г/л

Можно видеть, что введение гена *psefdh_D221Q* приводило к появлению активности НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназы, тогда как в исходном штамме А1 такая активность не определялась. Причем, уровень активности НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназы не зависел от присутствия в среде формиата. Штамм А1 (pNS2-Peftu-psefdh), содержащий ген *psefdh_D221Q* в составе плазмиды, обладал более высокой НАДФ⁺-зависимой ФДГ активностью, чем штамм А1-30, что, по-видимому, связано с разной копийностью гена в разных штаммах.

Следует отметить, что все штаммы, в том числе А1 – родительский штамм и его производные А1 (pNS2-Peftu-psefdh) и А1-30, метаболизировали формиат совместно с глюкозой в процессе культивирования. Причем, родительский штамм А1 и штамм А1 с плазмидой pNS2-Peftu-psefdh, у которых синтез собственной не НАДФ⁺-зависимой ФДГ [16] не был нарушен, утилизировали формиат быстрее, чем штамм А1-30, у которого собственная ФДГ была инактивирована за счет встройки *psefdh_D221Q*. К 72-му часу культивирования первые два штамма полностью утилизировали формиат, в то время как в культурах А1-30 оставалась почти половина внесенного формиата. При этом добавление формиата приводило к снижению роста культур, причем в наибольшей степени (13–16%) подавлялся рост исходного штамма А1 и его плазмид-содержащего производного.

При отсутствии формиата в среде культивирования уровень продукции лизина варьировался от 14 до 24 г/л для разных штаммов, при этом

Влияние гена *psefdh_D221Q* на уровень биосинтеза L-лизина штаммами *C. glutamicum*

The effect of the *psefdh_D221Q* gene on the level of biosynthesis of L-lysine by *C. glutamicum* strains

Штамм	Локализация гена <i>psefdh</i>	Показатели ферментации при культивировании					Прирост лизина, г/г	PseФДГ
		без формиата		с 8 г/л формиата				
		ОП	Л1	ОП	Л2	Ф		
A1	–	89,0±2,0	17,8±1,0	78,0±2,0	27,1±1,0	8,0	1,16	НД
A1(pNS2- <i>Peflu</i> -cat)	–	78,0±2,0	16,1±1,0	68,0±2,0	19,8±1,0	8,0	0,46	НД
A1 (pNS2- <i>Peflu</i> - <i>psefdh</i>)	Плаزمида	75,0±2,0	14,2±1,0	72,0±2,0	17,2±1,0	8,0	0,38	1,65
A1-30	Хромосома Δ <i>fdhD</i> - <i>fdhF</i> :: <i>Peflu</i> - <i>psefdh_D221Q</i>	82,0±2,0	24,1±1,0	81,0±2,0	30,4±1,0	4,25	1,48	0,65
H215	—	56,0±2,0	43,2±1,0	49,6±2,0	48,0±1,0	8,0	0,6	НД
H217	Хромосома Δ <i>fdhD</i> - <i>fdhF</i> :: <i>Peflu</i> - <i>psefdh_D221Q</i>	57,0±2,0	42,8±1,0	44,1±2,0	52,1±1,0	3,7	2,5	1,4

Примечания: ОП – оптическая плотность, ед; PseФДГ – активность НАДФ⁺-зависимой ФДГ, ед/мг белка; Л1 – конечная концентрация лизина в КЖ без формиата, г/л; Л2 – конечная концентрация лизина в КЖ в присутствии формиата, г/л; Ф – израсходованный формиат, г/л; НД – не детектировалась.

Notes: ОП – optical density (OD), units; PseФДГ – activity of NADP⁺-dependent FDG, units/mg of protein; Л1 – final concentration of lysine in CM without formate, g/L; Л2 – final concentration of lysine in CM with formate, g/L; Ф – spent formate, g/L; НД – not detected.

максимальный уровень (24,1 г/л) наблюдался у штамма А1-30, содержащего ген *psefdh_D221Q* в хромосоме. При добавлении формиата (8 г/л) в среду, для всех штаммов наблюдалось повышение продукции лизина. Однако в случае плазмид-содержащих штаммов уровень продукции лизина не превышал уровень родительского штамма А1, что, по-видимому, объясняется значительным снижением роста таких штаммов. В то же время штамм А1-30, содержащий ген *psefdh_D221Q* в хромосоме, демонстрировал максимальный уровень продукции лизина (30,4 г/л). Если сравнить прирост продукции лизина на грамм утилизованного формиата, то в этом случае максимальный прирост (1,48 г/г против 1,16 г/г) наблюдался также для штамма А1-30, у которого инактивирована собственная ФДГ и экспрессируется НАДФ⁺-зависимая ФДГ.

Влияние НАДФ⁺-зависимой ФДГ из *Pseudomonas* sp. 101 на синтез лизина в клетках высокопродуктивного штамма *C. glutamicum*

Учитывая ухудшение ростовых характеристик плазмид-содержащих штаммов, на следующем этапе был сконструирован штамм Н217, производный штамма Н215 с высоким уровнем продукции лизина, в хромосому которого был введен ген *psefdh_D221Q* под сильным промотором фактора элонгации (*Peflu*) с инактивацией собственной ФДГ. В штамме Н215 повышена продукция лизина благодаря модификации путей биосинтеза, в том числе усилению экспрессии генов пентозофосфатного пути [17]. Ростовые характеристики и уровень продукции лизина при выращивании

этих штаммов на средах, не содержащих и содержащих формиат аммония представлены в табл. 4.

Введение гена *psefdh_D221Q* в штамм Н215 путем его интеграции в состав хромосомы приводило к появлению в клетках активности НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназы. Рекомбинантный штамм Н217 с НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназой медленнее, чем исходный штамм Н215, утилизировал формиат (за 72 ч культивирования исходный штамм Н215 полностью утилизировал добавленный формиат, тогда как штамм Н217 – только около 50%). Как и в случае штамма А1 и его производных, рост штаммов Н215 и Н217 снижался на 17–22% при добавлении формиата в среду культивирования. При этом штамм Н217 синтезировал 52,1 г лизина в 1 л культуральной жидкости за 72 ч культивирования, что на 8,5% превышало продуктивность исходного штамма Н215. Прирост продукции лизина в расчете на израсходованный формиат в случае штамма Н217 был в 4 раза выше (2,5 г/г против 0,6 г/г), по сравнению с исходным штаммом.

Влияние НАДФ⁺-зависимой ФДГ из *Pseudomonas* sp. 101 на синтез лизина при ферментации штамма-производителя *C. glutamicum* Н217 в больших объемах

Для того, чтобы оценить перспективы применения штамма Н217 с НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназой в промышленных условиях, были изучены ростовые характеристики штамма и его продуктивность по лизину при культивировании в 3-литровых ферментерах (см. «Условия эксперимента»).

Оказалось, что добавление формиата аммония в среду культивирования приводит к незначительному снижению роста штамма H217 в 3-литровом ферментере (с $111,5 \pm 2,0$ до $106,5 \pm 2,0$ ед. ОП). Однако при этом значительно улучшались показатели биосинтеза лизина: конечная концентрация лизина в культуральной жидкости увеличилась с $173 \pm 1,0$ до $181 \pm 1,0$ г/л, а конверсия возросла с 43,5% до 53,6%.

Таким образом, результаты изучения штаммов *C. glutamicum* с НАДФ⁺-зависимой формиатдегидрогеназой показали, что такие штаммы в случае инактивации собственной формиатдегидрогеназы обладают повышенным (на 7–8%) уровнем синтеза L-лизина в присутствии формиата. Одной из возможных причин повышения продукции лизина могло быть повышение доступности НАДФН в клетках *C. glutamicum* за счет функционирования мутантной НАДФ⁺-зависимой ФДГ из *Pseudomonas* sp. 101, которая катализирует окисление формиата с одновременным образованием НАДФН. Следует отметить, что активность НАДФ⁺-зависимой PseФДГ_D221Q в клетках штаммов *C. glutamicum* была невысокой. Перспективным представляется получение коринебактериальных штаммов-продуцентов L-лизина с более высокой активностью НАДФ⁺-зависимой ФДГ, что, как ожидается, будет способствовать улучшению процесса биосинтеза L-лизина в присутствии формиата. Ранее отмечалось, что мутантная НАДФ⁺-зависимая PseФДГ_Asp221Ser была менее стабильна, чем исходная НАДФ⁺-зависимая ФДГ, но замена Ala198Gly в PseФДГ_Asp221Ser значительно увеличивала ее термостабильность [15]. ФДГ из *Mycobacterium vaccae* N10 с аминокислотной заменой D221Q (как в нашем случае) и той же дополнительной заменой Ala198Gly также имела повышенную каталитическую НАДФ⁺-активность, а замещение двух цистеинов (C145S/C255V) увеличивало активность в 6 раз [21]. Возможно, введение дополнительных мутаций, повышающих каталитическую активность известных НАДФ⁺-зависимых ФДГ, позволит повысить активность используемой нами PseФДГ_D221Q.

Такой подход может оказаться полезным и для усиления синтеза других аминокислот аспарагинового семейства, в частности треонина, в синтезе которого также участвуют НАДФН-зависимые ферменты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникаль-

ный идентификатор проекта – RFMEFI61017X0011) с использованием УНУ – БРЦ ВКПМ и ЦКП НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kjeldsen K. and Nielsen J. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(2), 583–597. doi: 10.1002/bit.22067
2. Melzer G., Esfandabadi M.E., Franco-Lara E., Wittmann C. Flux Design: In silico design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties. *BMC Syst Biol.*, 2009, 3, 120. doi: 10.1186/1752-0509-3-120
3. Becker J. and Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production - the heartbeat of industrial strain development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23(5), 631–640. doi: 10.1016/j.copbio.2011.12.025
4. Eggeling L. and Bott M. A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99(8), 3387–3394. doi: 10.1007/s00253-015-6508-2
5. Becker J., Giebelmann G., Hoffmann S.L., Wittmann C. *Corynebacterium glutamicum* for sustainable bioproduction: from metabolic physiology to systems metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2018, 162, 217–263. doi: 10.1007/10_2016_21
6. Moritz B., Striegel K., de Graaf A.A., Sahn H. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267(12), 3442–3452. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01354.x
7. Eikmanns B.J., Rittmann D., Sahn H. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.*, 1995, 177(3), 774–782. doi: 10.1128/jb.177.3.774-782.1995
8. Gourdon P., Baucher M.F., Lindley N.D., Guyonvarch A. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(7), 2981–2987. doi: 10.1128/aem.66.7.2981-2987.2000
9. Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., et al. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49(2), 111–129. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<111::AID-BIT1>3.0.CO;2-T
10. Takeno S., Murata R., Kobayashi R., Mitsuhashi S., Ikeda M. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(21), 7154–7160. doi: 10.1128/AEM.01464-10

11. Bommarreddy R.R., Chen Z., Rappert S., Zeng A.P. A *de novo* NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Metabolic Engineering.*, 2014, 25, 30–37. doi: 10.1016/j.ymben.2014.06.005
12. Sauer U., Canonaco F., Heri S., Perrenoud A., Fischer E. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(8), 6613–6619. doi: 10.1074/jbc.M311657200
13. Kabus A., Georgi T., Wendisch V.F., Bott M. Expression of the *Escherichia coli* pntAB genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 75(1), 47–53. doi: 10.1007/s00253-006-0804-9
14. Witthoff S., Eggeling L., Bott M., Polen T. *Corynebacterium glutamicum* harbours a molybdenum cofactor-dependent formate dehydrogenase which alleviates growth inhibition in the presence of formate. *Microbiology*, 2012, 158(9), 2428–2439. doi: 10.1099/mic.0.059196-0
15. Тишков В.И., Попов В.О. Механизм действия формиатдегидрогеназы и ее практическое применение. *Биохимия*, 2004, 69(11), 1537–1554.
16. Alekseeva A.A., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., et al. The role of Ala198 in the stability and coenzyme specificity of bacterial formate dehydrogenases. *Acta Naturae*, 2015, 7(1), 60–69.
17. Рябченко Л.Е., Шустикова Т.Е., Шереметьева М.Е. Герасимова Т.В., Леонова Т.Е., Яненко А.С. L-лизин-продуцирующая коринеформная бактерия с инактивированным геном *ltbR* и способ получения L-лизина с использованием этой бактерии, Патент РФ, RU 2639247 C1, C12N 1/21, C12N 15/09, C12R 1/13, C12R 1/15, C12P 13/08.
18. Тарутина М.Г., Раевская Н.М., Шустикова Т.Е. и др. Оценка эффективности промоторов *Corynebacterium glutamicum* и их использование для усиления активности генов у лизин-продуцирующих бактерий. *Биотехнология*, 2015, 6, 16–24.
19. Green M.R., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press. 2011, 11–27.
20. Van der Rest M.E., Lange C., Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52(4), 541–545. doi: 10.1007/s002530051557
21. Hoelsch K., Sührer I., Heusel M., et al. Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97, 2473–2481. doi: 10.1007/s00253-012-4142-9

Expression of the NADP⁺-Dependent Formate Dehydrogenase Gene from *Pseudomonas* Increases the Lysine Production in *Corynebacterium glutamicum*

L. E. RYABCHENKO^{1,*}, T. E. LEONOVA¹, T. E. SHUSTIKOVA¹, T. V. GERASIMOVA¹, T. A. IVANKOVA¹, K. V. SIDORENKO¹, and A. S. YANENKO¹

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: ryabchenko@genetika.ru

Received November 12, 2019

Revised November 20, 2019

Accepted November 27, 2019

Abstract—The *psefdh_D221Q* gene coding for a mutant formate dehydrogenase (PseFDG_D221Q) from *Pseudomonas*, which catalyzes the formate oxidation with the simultaneous formation of NADPH, has been expressed in the cells of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* strains. The *psefdh_D221Q* gene was introduced into *C. glutamicum* strains as part of an autonomous plasmid or was integrated into the chromosome with simultaneous inactivation of host formate dehydrogenase genes. It was shown that the *C. glutamicum* strains with NADP⁺-dependent formate dehydrogenase have an increased level of L-lysine synthesis in the presence of formate, if their own formate dehydrogenase is inactivated.

Key words: L-lysine, formate dehydrogenase, NADPH, *Corynebacterium glutamicum*

Acknowledgements—This work was carried out on the equipment of the Multipurpose Scientific Installation of «All-Russian Collection of Industrial Microorganisms», National Bio-Resource Center, NRC «Kurchatov Institute»—GosNIIgenetika.

Funding—This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Unique Project Identifier - RFMEFI61017X0011).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-21-29