

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.121

Создание бесплазмидного и безмаркерного штамма *Escherichia coli* – продуцента янтарной кислоты и оценка его биосинтетического потенциала при утилизации сахаров лигноцеллюлозы

© 2020 А. Ю. СКОРОХОДОВА^{1,*}, О. А. ЖУРАВЛЕВА², Т. А. ВОЕЙКОВА^{2,**}, А. Ю. ГУЛЕВИЧ¹, В. Г. ДЕБАБОВ²

¹ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, 119071

²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com,

**e-mail: voeikova@genetika.ru

Поступила в редакцию 23.03.2020 г.

После доработки 31.03.2020 г.

Принята к публикации 08.04.2020 г.

Сконструирован и охарактеризован бесплазмидный и безмаркерный штамм-продуцент янтарной кислоты *Escherichia coli* SGM2.0Puc-int с инактивированными, за счет делеций генов *ldhA*, *poxB*, *ackA*, *pta* и *adhE*, основными путями смешанного брожения, конститутивно экспрессирующий гены *aceEF-lpdA* оперона, кодирующие компоненты пируватдегидрогеназного комплекса, и обладающий интегрированным в хромосому геном *pucA Bacillus subtilis*, кодирующим пируваткарбоксилазу. Исследована способность штамма синтезировать янтарную кислоту в ходе двухстадийной аэробно-анаэробной ферментации с использованием в качестве субстратов сахаров лигноцеллюлозы. В продуктивной анаэробной фазе штамм SGM2.0Puc-int синтезировал янтарную кислоту из глюкозы, ксилозы и арабинозы, с молярными выходами, составляющими 1,41 моль/моль, 1,18 моль/моль и 1,18 моль/моль, соответственно. Полученный штамм обладает высоким потенциалом для разработки эффективных процессов получения янтарной кислоты из сахаров растительной биомассы.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, брожение, арабиноза, глюкоза, ксилоза, янтарная кислота.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-3-11

Замена веществ, получаемых нефтехимическим синтезом, продуктами микробных биотехнологий является важной частью современных стратегий устойчивого развития [1]. В соответствии с данным подходом синтез целевых промышленно-значимых соединений достигается с использованием направленно сконструированных микроорганизмов, способных конвертировать возобновляемое сырье растительной биомассы в ценные химикаты.

Одними из востребованных химической промышленностью веществ, весьма перспективными

для их эффективного биотехнологического производства, являются четырехуглеродные дикарбоновые кислоты: фумаровая, яблочная и янтарная. Эти соединения могут служить прямой заменой малеинового и фталевого ангидридов, используемых в процессах органического синтеза целого спектра производных с высокой добавленной стоимостью, которые находят применение в пищевой, фармацевтической и автомобильной отраслях промышленности [2]. С биохимической точки зрения, соответствующие дикарбоксилаты

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ФЕП – фосфоенолпируват; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; ЩУК – щавелевоуксусная кислота.

являются интермедиатами цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), пути метаболизма, широко распространенного у всех основных известных микроорганизмов. Природными продуцентами яблочной, фумаровой и янтарной кислот являются грибы *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* [3], *Rhizopus oryzae* [4] и анаэробные бактерии рубца крупного рогатого скота *Actinobacillus succinogenes* [5], *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [6] и *Mannheimia succiniciproducens* [7]. Тем не менее, биотехнологическое применение данных организмов ограничено их повышенными требованиями к компонентам питательных сред и потенциальной опасностью распространения соответствующих штаммов среди поголовья сельскохозяйственных животных [8]. Вместе с тем, в промышленной биотехнологии широкое применение нашла энтеробактерия *Escherichia coli*, наиболее изученный на сегодняшний день микроорганизм, в норме являющийся симбионтным для человека и окружающих его представителей сосуществующей фауны. В развитых странах в настоящее время с использованием генетически измененных штаммов *E. coli* реализовано крупнотоннажное производство, в частности, кормовых аминокислот, компонентов биоразлагаемых пластиков, ферментов, лекарственных белков и других востребованных рынком продуктов [9, 10].

Ранее мы сконструировали штамм *E. coli* SGM2.0, дефицитный по основным путям смешанного брожения и обладающий повышенной анаэробной активностью пируватдегидрогеназного комплекса, способный к эффективной продукции янтарной кислоты при гетерологичной экспрессии гена пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis* в составе низкокопийной плазмиды pPYC [11]. Однако, строгие нормы регулирования¹ допускают к использованию в крупнотоннажном производстве лишь безопасные и полностью охарактеризованные штаммы микроорганизмов, обладающих установленной структурой генома и не способные обмениваться генетической информацией с традиционной микробиотой, распространенной в местах их промышленного применения, иными словами не содержащими плазмид и генов антибиотической устойчивости. В качестве перспективных субстратов для микробной биотехнологии в настоящее время рассматриваются гидролизаты лигноцеллюлозы, включающие в качестве основных сахаров глюкозу, ксилозу и арабинозу. Биосинте-

тические характеристики штамма-продуцента янтарной кислоты SGM2.0 [pPYC] были определены исключительно с использованием глюкозы в качестве единственного источника углерода.

Цель работы – создание бесплазмидного и безмаркерного штамма *E. coli* – продуцента янтарной кислоты, производного SGM2.0, и оценка его биосинтетического потенциала при утилизации сахаров лигноцеллюлозы.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды

Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в Таблице 1. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и штамм *E. coli* MG1655 Δ ppc [12], обозначенный как MG Δ ppc, а также ранее сконструированный штамм *E. coli* SGM2.0 [11], эффективный продуцент янтарной кислоты, обладающий инактивированными путями смешанного брожения и усиленной экспрессией генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих компоненты пируватдегидрогеназного комплекса, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Бактерии культивировали в минимальной солевой среде M9, содержащей необходимый источник углерода, или в богатых средах LB, SOB и SOC [13], с добавлением при необходимости ампициллина (100 мкг/мл, ОАО «Синтез», Россия) или хлорамфеникола (30 мкг/мл, Sigma, США).

Реагенты

Использовали эндонуклеазы рестрикции BglII, XbaI, T4 ДНК-лигазу и ДНК полимеразу Taq (Thermo Scientific, Литва), а также ДНК полимеразу Кара HiFi (Roche, Швейцария). Олигонуклеотидные праймеры (Табл. 1) синтезировали в ООО «Евроген» (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и выделяли, используя QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты производства Panreac (Испания) и Sigma (США).

Конструирование штаммов и плазмид

Все хромосомные модификации осуществляли с использованием модифицированной [14] методики Даценко и Ваннера [15]. Ген *pusA B. subtilis*,

¹Нормативная база РФ в области регулирования генно-инженерной деятельности и, в частности использования в промышленном производстве ГММ, является мозаичной и не охватывает всех аспектов данной проблемы как зарубежные аналоги, например Закон США о контроле токсических веществ (Toxic Substance Control Act) – TSCA [<http://www2.epa.gov/laws-regulations/summary-toxic-substances-control-act>].

Использованные штаммы, плазмиды и олигонуклеотидные праймеры.**Strains, plasmids, and oligonucleotide primers used in this study**

Объект	Генотип / Последовательность	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MG Δ <i>ppc</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ppc</i>	[12]
MG Δ <i>ppc</i> Pyc-int	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ppc</i> , <i>poxB::λattR-cat-λattL-P_L-pucA^{Bs}</i>	Данная работа
SGM2.0	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L - <i>aceEF-lpdA</i>	[11]
SGM2.0Pyc-int	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , <i>poxB::λattB-P_L-pucA^{Bs}</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L - <i>aceEF-lpdA</i> (ВКПМ В-13285)	Данная работа, ВКПМ
Плазмиды		
pMW118- (<i>λattL-Cm-λattR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>λattL-cat-λattR</i>	[14]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - <i>λgam-bet-exo</i>	[15]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - <i>λxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[16]
pPUC	pMW119 с клонированным геном пируваткарбоксилазы (<i>pucA</i>) из <i>B. subtilis</i>	[12]
Праймер		
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgcc-3'	Данная работа
P2	5'-agtaattctagaacggccaatgctctgttc-3'	» »
P3	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagttgg-3'	» »
P4	5'-catgaacaacaacgggtgcagcttatatcgccaaaccgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'	» »
P5	5'-gacgttctagaattatattccattcgggtaagg-3'	» »
P6	5'-ttacctagccagttgttttgcagtcgatcacctctataatctctgaagtc-3'	» »
P7	5'-gggagatctgctcctgaaattg-3'	» »
P8	5'-ggccatcatcgcttcgag-3'	» »

кодирующий пируваткарбоксилазу, был интегрирован в хромосому штамма *E. coli*, производного MG1655, на место гена *poxB*. Конструирование фрагмента ДНК для замены кодирующей области гена *poxB* искусственным генетическим элементом, содержащим ген *cat*, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу, фланкированный сайтами *attL* и *attR* фага лямбда, сильный конститутивный промотор P_L фага лямбда, сайт связывания рибосом гена *pucA* и кодирующую область гена *pucA* из *B. subtilis*, осуществлялось в несколько стадий. Первоначально, с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания BglII, промотор P_L, и сайт узнавания XbaI. Использовали праймеры P1 и P2, и ДНК фага лямбда в качестве матрицы. Параллельно, с использованием праймеров P3 и P4, и плазмиды pMW118-(*λ attL-Cm- λ attR*) [14], был получен фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания BglII, ген *cat*, фланкированный аттечмент сайтами фага лямбда, и 36 нуклеотидов, гомологичных 5'-концевому участку кодирующей области гена *poxB E. coli*. Также был получен фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания XbaI, природный

сайт связывания рибосом и кодирующую область гена *pucA* из *B. subtilis*, а также 36 нуклеотидов, комплементарных 3'-концевой области гена *poxB E. coli*. В качестве матрицы при ПЦР использовали хромосомную ДНК штамма *B. subtilis* 168 и праймеры P5 и P6. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазами рестрикции BglII и XbaI и лигированы с использованием T4 ДНК-лигазы. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P4 и P6.

Полученный фрагмент ДНК был использован для интеграции в хромосому штамма MG Δ *ppc*, несущего плазмиду-помощник pKD46. Целевые клоны отбирали на агаризованной LB среде с хлорамфениколом. Плазмиду pKD46 в отобранных клонах элиминировали и подтверждали факт наличия целевой модификации ПЦР анализом с помощью локус-специфичных праймеров P7 и P8. Колонии с подтвержденным фактом интеграции гена *pucA B. subtilis* в локус гена *poxB E. coli* выращивали на минимальной среде M9 с 0,2% глюкозы в качестве единственного источника углерода. Индивидуальные клоны штамма MG Δ *ppc* Pyc-int, способные к росту на данной среде, содержа-

ли ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу. В дальнейшем, соответствие нуклеотидной последовательности *pusA* *B. subtilis*, интегрированного в хромосому штамма *E. coli* MG *Dppc* *Pus-int*, природной последовательности соответствующего гена было подтверждено секвенированием.

Штамм SGM2.0*Pus-int* был получен при введении соответствующей модификации в хромосому штамма SGM2.0 с помощью неспецифической трансдукции фагом P1 [13]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [16].

Трансформацию штамма SGM2.0 плазмидой pPUC [12] осуществляли по стандартной методике [13].

Культивирование штаммов

Для оценки ростовых характеристик клетки штамма SGM2.0*Pus-int* выращивали в течение ночи в 5 мл минимальной среды M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37 °С. Полученные культуры разбавляли в 10 раз минимальной средой M9, содержащей 10 г/л дрожжевого экстракта и/или 10 г/л углеводного источника углерода (глюкозы, ксилозы или арабинозы), и выращивали в колбах объемом 750 мл при 37 °С на роторной качалке при 250 об./мин. в течение 6 ч. Оптическую плотность растущих культур определяли каждые 2 часа при длине волны 600 нм.

Для оценки анаэробной продукции янтарной кислоты, клетки исследуемых штаммов SGM2.0 [pPUC] и SGM2.0*Pus-int* выращивали в течение ночи в минимальной среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта, при 37 °С. К 5 мл ночных культур добавляли 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л дрожжевого экстракта, и выращивали в колбах объемом 750 мл при 37 °С на роторной качалке при 250 об./мин. в течение 6 ч. Для дальнейшей оценки утилизации углеводного субстрата и продукции метаболитов в условиях анаэробно-аэробно накопленную биомассу собирали центрифугированием. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, с концентрацией сахаров (глюкозы или ксилозы, или арабинозы) 50 мМ и NaHCO₃ 100 мМ. Культуры инкубировали в течение 24 ч в закрытых крышками пробирках объемом 15 мл при 37 °С на роторной качалке при 250 об./мин. В случае штамма SGM2.0 [pPUC] среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина. Биомассу клеток отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 10000 g и в полученных супернатан-

тах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточных сахаров. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

Аналитические методы

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе анаэробной утилизации углеводов штаммы *E. coli* дикого типа реализуют процесс смешанного брожения в зависимости от конкретного источника углерода, приводящий к формированию, в различных соотношениях, уксусной кислоты, этанола, молочной и муравьиной кислот, а также янтарной кислоты. В частности, при анаэробном потреблении глюкозы клетки *E. coli* продуцируют, в общем случае, уксусную кислоту, этанол, молочную кислоту и муравьиную кислоту в соотношении 1:1:2:2, янтарная кислота является минорным продуктом, составляющим лишь около 5% от общего количества секретированных метаболитов [17]. Ключевым предшественником в биосинтезе янтарной кислоты по восстановительной ветви ЦТК является щавелевоуксусная кислота (ЩУК). К ключевым анаэробным ферментам бактерий, ответственным за формирование ЩУК из гликолитических предшественников, относятся как карбоксилирующие фосфоенолпируват (ФЕП) фосфоенолпируваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31) и фосфоенолпируваткарбоксикиназа (КФ 4.1.1.49), так и пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1), использующая в качестве субстрата пировиноградную кислоту [18]. При этом фосфоенолпируваткарбоксилаза и пируваткарбоксилаза необратимо карбоксилируют соответствующие субстраты с образованием ЩУК, а реакция, катализируемая фосфоенолпируваткарбоксикиназой обратима. Клетки *E. coli* природно обладают

обоими карбоксилирующими ФЕП ферментами, тогда как активность пируваткарбоксилазы у этой бактерии отсутствует. В результате, при утилизации гликолитических субстратов у *E. coli* основным анаэробным ферментом служит фосфоенолпируваткарбоксилаза [18]. С учетом того, что фосфоенолпируваткарбоксилаза конкурирует за общий метаболит предшественник, ФЕП, с синтезирующими пирувиноградную кислоту гликолитическими пируваткиназами *PycA* и *PycF* (КФ 2.7.1.40), присутствие активности гетерологичной пируваткарбоксилазы должно значительно повышать гибкость и эффективность функционирования анаэробных процессов в клетках *E. coli* и способствовать повышенному анаэробному синтезу янтарной кислоты.

При этом ключевые процессы анаэробной диссимиляции пирувата и его прямого производного, ацетил-КоА, в клетках *E. coli* связаны с основными реакциями смешанного брожения, катализируемыми лактатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.28), пируватоксидазой (КФ 1.2.5.1), ацетаткиназой (КФ 2.7.2.1), фосфотрансацетилазой (КФ 2.3.1.8) и бифункциональной алкоголь/альдегиддегидрогеназой (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3). В связи с этим, для обеспечения эффективного анаэробного биосинтеза янтарной кислоты из гликолитического субстрата, соответствующие гены *ldhA*, *poxB*, *ackA*, *pta* и *adhE* были инактивированы в штамме *E. coli* MG1655, тогда как присутствие активности пируваткарбоксилазы в результирующем штамме SGM2.0 было обеспечено за счет экспрессии гена *pycA* *B. subtilis* в составе плазмиды pPyc.

Бесплазмидный и безмаркерный штамм *E. coli* SGM2.0Pyc-int был получен в результате интеграции гена *pycA* *B. subtilis*, под контролем сильного конститутивного промотора P_L фага лямбда, в хромосому родительского штамма на место делетированного гена *poxB* по областям гомологии, расположенным непосредственно на 5'- и 3'-концах кодирующей области соответствующего гена. В качестве реципиента первоначально был использован штамм MG Δ*ppc* с делетированным геном, кодирующим фосфоенолпируваткарбоксилазу. Известно, что *ppc* мутанты *E. coli* не способны к синтезу ЦУК и являются ауксотрофами по интермедиатам ЦТК, в результате чего не способны расти на средах, содержащих в качестве источников углерода сахара [18]. Наличие в клетках штамма MG Δ*ppc* гена *pycA*, кодирующего функционально активную пируваткарбоксилазу, должно было восстанавливать способность штамма к росту на минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода. Таким образом, штамм MG Δ*ppc* был использо-

ван в качестве реципиента для дальнейшей верификации функциональной активности гетерологичной пируваткарбоксилазы, кодируемой интегрированным в хромосому штамма геном *pycA*. После соответствующей проверки функциональности пируваткарбоксилазы в полученных интегрантах и последующего секвенирования, целевая модификация была перенесена в хромосому штамма SGM2.0 в результате трансдукции фагом P1, приводя, в итоге, к получению целевого штамма SGM2.0Pyc-int.

Штамм SGM2.0, предшественник SGM2.0Pyc-int, был сконструирован для эффективной продукции янтарной кислоты в результате двухстадийной ферментации, включающей аэробную стадию накопления биомассы и последующую анаэробную продуктивную стадию. Таким образом, углеводы лигноцеллюлозных гидролизатов потенциально могли служить для штамма не только ключевыми субстратами для их анаэробной конверсии в целевой продукт покоящейся культурой, но и основными источниками углерода и питательными факторами, обеспечивающими рост штамма в условиях аэрации. В этой связи, первоначально оценивали ростовые характеристики полученного штамма SGM2.0Pyc-int при аэробном культивировании в среде M9, содержащей, в качестве единственного источника углерода, каждый из лигноцеллюлозных сахаров: глюкозу, арабинозу или ксилозу.

При культивировании в минимальной солевой среде с глюкозой и арабинозой в качестве единственных источников углерода, штамм SGM2.0Pyc-int к 6 часам роста достигал поздней экспоненциальной фазы, тогда как рост штамма на ксилозе был резко ограничен (Рис. 1а). При этом глюкоза выступала в качестве предпочтительного питательного фактора, потребление которого обеспечивало максимальный рост культуры. Наблюдаемая разница в способности лигноцеллюлозных шести- и пятичленных сахаров поддерживать рост культуры могла объясняться, в первую очередь, известным эффектом глюкозной катаболитной репрессии [19], а также предпочтительным потреблением клетками арабинозы, в качестве источника углерода, в сравнении с ксилозой [20]. С другой стороны, сниженный рост штамма на пятичленных сахарах мог быть связан с особенностями метаболизма метилглиоксаля в соответствующем рекомбинанте. Известно, что при утилизации пентоз штаммы *E. coli* дико-го типа способны к внутриклеточному формированию потенциально токсичных количеств метилглиоксаля в результате дисбаланса в синтезе триозофосфатов [21, 22]. Существуют свидетельства

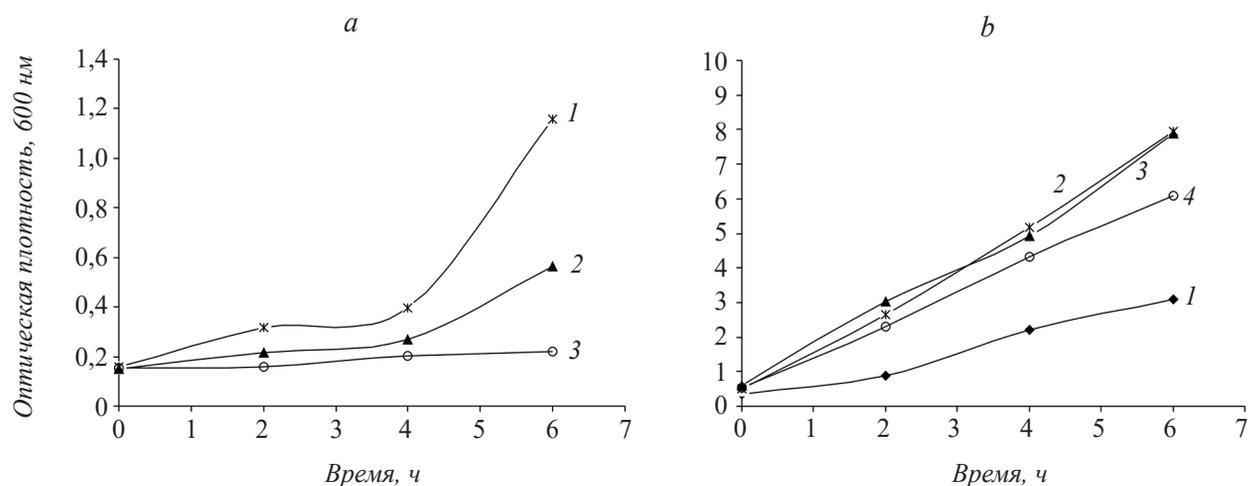


Рис. 1. Кривые роста штамма SGM2.0Pyc-int при аэробном выращивании в (a) минимальной среде M9, содержащей 1 – 10 г/л глюкозы, 2 – 10 г/л арабинозы, 3 – 10 г/л ксилозы; (b): минимальной среде M9 с 10 г/л дрожжевого экстракта: 1 – только дрожжевой экстракт, 2 – дрожжевой экстракт и 10 г/л глюкозы, 3 – дрожжевой экстракт и 10 г/л арабинозы, 4 – дрожжевой экстракт и 10 г/л ксилозы.

Fig. 1. Growth curves of SGM2.0Pyc-int strain during aerobic culturing (a) in an M9 minimal medium containing 1 – 10 g/l of glucose, 2 – 10 g/l of arabinose, 3 – 10 g/l of xylose; (b) in M9 medium with 10 g/l of yeast extract: 1 – yeast extract only, 2 – yeast extract and 10 g/l of glucose, 3 – yeast extract and 10 g/l of arabinose, 4 – yeast extract and 10 g/l of xylose

в пользу того, что соответствующий эффект более выражен, в частности, у штаммов дефицитных по путям смешанного брожения [23]. С учетом того, что наблюдаемый рост штамма в минимальной среде и, соответственно, потребление углеводного субстрата были резко снижены в случае использования в качестве единственного источника углерода ксилозы и в меньшей степени арабинозы, в дальнейшем оценивали эффект присутствия в среде культивирования дрожжевого экстракта, как основного ростового фактора, обеспечивающего формирование биомассы.

При культивировании в среде с дрожжевым экстрактом рост штамма SGM2.0Pyc-int был более выражен в присутствии любого из использованных сахаров (рис. 1b). Накопление биомассы штаммом было сравнимо высоко в случае глюкозы и арабинозы и лишь незначительно снижено в случае ксилозы. Таким образом, наличие в среде дрожжевого экстракта не только обеспечивало рост культуры, но снижало эффект остаточной катаболитной репрессии, способствуя утилизации штаммом пятичленных сахаров. Можно было ожидать, что в результате аэробного выращивания штамма SGM2.0Pyc-int в присутствии дрожжевого экстракта, последующее потребление пятичленных сахаров штаммом в продуктивной анаэробной фазе не будет подвержено негативно влиянию катаболитной репрессии. При этом с учетом того, что конверсия сахаров в целевой продукт предпочтительней их расхода на поддержание роста, биомассу штамма SGM2.0Pyc-int и

контрольного штамма SGM2.0 [pPYC] для последующей анаэробной продукции янтарной кислоты накапливали в дальнейшем при аэробном культивировании в среде, содержащей только дрожжевой экстракт в качестве питательного субстрата.

Первоначально оценивали способность штамма SGM2.0Pyc-int к анаэробной конверсии в целевой продукт, янтарную кислоту, традиционно субстрата микробной биотехнологии – глюкозы. В качестве контроля использовали штамм прототип SGM2.0 [pPYC]. Поскольку последовательности биохимических реакций, ответственные за анаэробное формирование янтарной кислоты у штаммов идентичны, соответствующие рекомбинанты обладают одинаковым значением максимального теоретического выхода целевого продукта, составляющим в случае глюкозы 1,66 моль/моль [24]. Ранее сконструированный штамм SGM2.0 [pPYC] характеризуется высоким значением экспериментально достигаемого коэффициента анаэробной конверсии глюкозы в янтарную кислоту, ~1,42 моль/моль, составляющим 85% от штамм-специфического теоретического максимума. Полученный бесплазмидный и безмаркерный штамм SGM2.0Pyc-int анаэробно синтезировал янтарную кислоту из соответствующего субстрата с выходом практически идентичным таковому штамма прототипа, ~1,41 моль/моль (табл. 2). В качестве побочного продукта утилизации глюкозы штамм SGM2.0Pyc-int, как и SGM2.0 [pPYC], накапливал уксусную кислоту. При этом доля данной примеси составляла лишь

Характеристики анаэробного потребления углеводного субстрата и продукции метаболитов исследованными штаммами**Characteristics of anaerobic carbohydrate substrate consumption and metabolites production by the studied strains**

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Потребленная ксилоза, мМ	Потребленная арабиноза, мМ	Секретированная уксусная кислота, мМ	Секретированная янтарная кислота, мМ	Выход янтарной кислоты, моль/моль
SGM2.0 [pPYC]	50	-	-	9,4±0,8	71,2±0,3	1,42±0,01
SGM2.0Pyc-int	50	-	-	9,7±0,7	70,7±0,4	1,41±0,01
SGM2.0Pyc-int	-	50	-	9,9±0,7	58,9±0,9	1,18±0,02
SGM2.0Pyc-int	-	-	50	9,7±0,8	58,8±0,7	1,18±0,01

Примечание: Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

Note: Standard deviations for three independent experiments are given.

около 12% от секретированных штаммом метаболитов, а доля целевого продукта, янтарной кислоты, соответственно 88% (табл. 2). Таким образом, биосинтетические характеристики штамма SGM2.0Pyc-int позволяли расценивать его в качестве перспективного продуцента для получения янтарной кислоты как минимум из глюкозы. В качестве альтернативного субстрата для микробиологического синтеза полезных химикатов повышенное внимание в последнее время привлекают, как отмечалось выше, гидролизаты лигноцеллюлозы, содержащие, помимо глюкозы, такие пятичленные сахара, как ксилоза и арабиноза. В этой связи способность штамма SGM2.0Pyc-int к анаэробной продукции янтарной кислоты была исследована с использованием в качестве субстратов указанных пятичленных сахаров. Максимальное теоретически возможное значение конверсии ксилозы или арабинозы в янтарную кислоту для штамма SGM2.0Pyc-int составляет 1,39 моль продукта на моль утилизированного субстрата. В отсутствие аэрации штамм конвертировал каждый из субстратов в целевой продукт с выходом, составляющим 1,18 моль/моль (табл. 2). В качестве побочного продукта, как и в случае анаэробной утилизации глюкозы, накапливалась уксусная кислота, хотя ее доля среди секретированных штаммом метаболитов была несколько выше при потреблении пятичленных сахаров. С учетом инактивации в базовом штамме генов, кодирующих основные ферменты, ответственные за образование уксусной кислоты, наблюдаемая секреция этого метаболита штаммом SGM2.0Pyc-int была обусловлена действием альтернативных ферментов, в первую очередь неспецифичной ацил-КоА тиоэстеразы YciA, что являлось следствием дисбаланса в распределении трехуглеродных продуктов гликолиза, ФЕП и пировиноградной кислоты, между формированием ЦУК

и ацетил-КоА. Подобный дисбаланс может быть связан с ограниченной доступностью растворенного в среде CO₂, необходимого для образования ЦУК при карбоксилировании ФЕП или пировиноградной кислоты, и может быть преодолен при оптимизации условий ферментации [24].

Несмотря на то, что дизайн штамма прототипа SGM2.0 [pPYC] предполагал предпочтительное использование в качестве субстрата для продукции янтарной кислоты глюкозы, сконструированный штамм SGM2.0Pyc-int эффективно конвертировал в целевое соединение не только шести-, но и пятичленные сахара. Коэффициенты конверсии субстрата в целевой продукт, продемонстрированные штаммом при утилизации основных сахаров растительной биомассы (глюкозы и ксилозы), сравнимы с показателями лучших современных штаммов *E. coli* продуцентов янтарной кислоты [25, 26]. Способность к аэробной продукции янтарной кислоты с использованием в качестве субстрата арабинозы недавно была продемонстрирована для модифицированных клеток *Corynebacterium glutamicum* [27]. В настоящей работе с помощью направленно сконструированного штамма *E. coli* продемонстрирована эффективная конверсия арабинозы в янтарную кислоту в анаэробных условиях.

Результаты исследования указывают на высокий потенциал сконструированного бесплазмидного и безмаркерного штамма продуцента янтарной кислоты для биотехнологического получения целевого продукта из различных углеводов растительной биомассы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-29-14005).

ЛИТЕРАТУРА

- Aguilar A., Twardowski T., Wohlgenuth R. Bioeconomy for sustainable development. *Biotechnol. J.*, 2019. doi: 10.1002/biot.201800638
- Werpy T., Petersen G., Aden A., Bozell J., Holladay J., White J., Manheim A., Eliot D., Lasure L., Jones S. Top Value Added Chemicals from Biomass, Volume 1: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas, Washington, DC, USA: Pacific Northwest National Laboratory, National Renewable Energy Laboratory and Department of Energy, 2004, 76 p.
- West T.P. Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus species*. *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33(12), 2463–2467. doi: 10.1007/s10529-011-0720-7
- Roa Engel C.A., Straathof A.J., Zijlmans T.W., et al. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78(3), 379–389. doi: 10.1007/s00253-007-1341-x
- Guettler M.V., Rumler D., Jain M.K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49(1), 207–216. doi: 10.1099/00207713-49-1-207
- Nghiem N.P., Davison B.H., Suttle B.E., Richardson G.R. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997, 63-65, 565–576. doi: 10.1007/bf02920454
- Lee P.C., Lee S.Y., Hong S.H., Chang H.N. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 58(5), 663–668. doi: 10.1007/s00253-002-0935-6
- Yin X., Li J., Shin H.D., et al. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33(6:1), 830–841. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.006
- Becker J., Wittmann C. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the heterologous production of high value molecules - a veteran at new shores. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2016, 42, 178–188. doi: 10.1016/j.copbio.2016.05.004
- Pontrelli S., Chiu T.Y., Lan E.L., et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metab. Eng.*, 2018, 50, 16–46. doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.008
- Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент янтарной кислоты (варианты) и способ получения янтарной кислоты с использованием этого штамма. Патент РФ RU 2528056 от 10.09.2014.
- Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., и др. Анаэробный синтез янтарной кислоты рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* с активированным НАД⁺-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2011, 47(4), 415–423. doi: 10.1134/S0003683811040168
- 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. doi: 10.1007/s11008-005-0087-8
- 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
- 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. doi: 10.1134/S0026893309030194
- Neidhardt F., Curtiss R. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2ndedn., Washington, USA, ASM Press., 1996, 2822 p.
- Sauer U., Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, 29, 765–794.
- Görke B., Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, 6(8), 613–624. doi: 10.1038/nrmicro1932
- Desai T.A., Rao C.V. Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(5), 1524–1532. doi: 10.1128/AEM.01970-09
- Töttemeyer S., Booth N.A., Nichols W.W., et al. From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1998, 27(3), 553–562.
- Chakraborty S., Karmakar K., Chakravorty D. Cells producing their own nemesis: understanding methylglyoxal metabolism. *IUBMB Life.*, 2014, 66(10), 667–678. doi: 10.1002/iub.1324
- Yomano L.P., York S.W., Shanmugam K.T., Ingram L.O. Deletion of methylglyoxal synthase gene (*mgsA*) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 2009, 31(9), 1389–1398. doi: 10.1007/s10529-009-0011-8
- Skorokhodova A.Y., Morzhakova A.A., Gulevich A.Y., Debabov V.G. Manipulating pyruvate to acetyl-CoA conversion in *Escherichia coli* for anaerobic succinate biosynthesis from glucose with the yield close to the stoichiometric maximum. *J. Biotechnol.*, 2015, 214, 33–42. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.09.003
- Zhu L.W., Tang Y.J. Current advances of succinate biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.*, 2017, 35(8), 1040–1048. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.007
- Khunnonkwao P., Jantama S.S., Kanchanatawee S., Jantama K. Re-engineering *Escherichia coli* KJ122 to enhance the utilization of xylose and xylose/glucose mixture for efficient succinate production in mineral salt medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(1), 127–141. doi: 10.1007/s00253-017-8580-2
- Chen T., Zhu N., Xia H. Aerobic production of succinate from arabinose by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol.*, 2014, 151, 411–444. doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.017

Creation of Plasmidless and Markerless *Escherichia coli* Succinate Producing Strain and Evaluation of its Biosynthetic Potential during Utilization of Lignocellulosic Sugars

A.Yu. SKOROKHODOVA^{1,*}, O.A. ZHURAVLIOVA², T.A. VOEIKOVA^{2,**}, A.Yu. GULEVICH¹, and V.G. DEBAVOV²

¹*Fundamentals of Biotechnology Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), Moscow, 117545 Russia*

**e-mail*: sasha.skorokhodova@gmail.com,

***e-mail*: voeikova@genetika.ru

Received March 23, 2020

Revised March 31, 2020

Accepted April 8, 2020

Abstract—The plasmidless and markerless *Escherichia coli* succinate producing strain SGM2.0Pyc-int has been engineered and characterized. The strain has the inactivated main mixed-acid fermentation pathways due to the deletions of *ldhA*, *poxB*, *ackA*, *pta*, and *adhE* genes, constitutively expresses the genes of the *aceEF-lpdA* operon encoding components of pyruvate dehydrogenase complex, and possesses the chromosomally integrated *Bacillus subtilis* *pycA* gene coding for pyruvate carboxylase. The capacity of the strain to synthesize succinic acid in course of dual-phase aerobic-anaerobic fermentation with lignocellulosic sugars as substrates was studied. The SGM2.0Pyc-int strain synthesized succinic acid from glucose, xylose, and arabinose with a molar yields of 1.41 mol/mol, 1.18 mol/mol, and 1.18 mol/mol, respectively, during the anaerobic production stage. The constructed strain has great potential for developing efficient processes for the succinic acid production from plant biomass-derived sugars.

Key words: *Escherichia coli*, fermentation, arabinose, glucose, xylose, succinic acid.

Funding—The work was supported by a Grant from the Russian Foundation for Basic Research (Project no. 18-29-14005).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-3-11