

УДК 577.121

АНАЭРОБНЫЙ СИНТЕЗ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli* С АКТИВИРОВАННЫМ НАД⁺-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИМ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫМ КОМПЛЕКСОМ

© 2011 г. А. Ю. Скороходова, А. Ю. Гулевич, А. А. Моржакова, Р. С. Шакулов, В. Г. Дебабов

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 117545

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Поступила в редакцию 24.11.2010 г.

Исследовано влияние конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих ферменты НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, на анаэробную продукцию янтарной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*. Базовые штаммы-продуценты были получены за счет инактивации в клетках штамма *E. coli* MG1655 основных путей образования уксусной и молочной кислот, путем делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB* и *ldhA* (SGM0.1), и дополнительного введения пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis* (SGM0.1 [pPYC]). Конститутивная экспрессия генов *aceEF-lpdA* в потомках базовых штаммов SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] была обеспечена заменой нативной регуляторной области оперона промотором P_L фага лямбда. Молярные выходы янтарной кислоты при анаэробном сбраживании глюкозы штаммами SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] превосходили соответствующие показатели контрольных штаммов на 2 и 33% в отсутствие, и на 9 и 26% в присутствии в среде иона HCO₃⁻. Сделан вывод, что увеличение продукции янтарной кислоты штаммом SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] относительно штаммов SGM0.1 и SGM0.1 [pPYC], продуцирующих данное вещество в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот, обусловлено активацией глиоксилатного шунта.

Янтарная кислота, традиционно получаемая из продуктов нефтепереработки, широко используется как ключевой предшественник в крупнотоннажном синтезе целого ряда промышленно значимых соединений. В связи с ограниченностью природных запасов нефти и газа, возможность эффективной продукции янтарной кислоты из возобновляемого сырья представляет особый интерес. Изученность метаболизма *Escherichia coli* и доступность генно-инженерных методов для его модификации, обусловили тот факт, что лучшие на сегодняшний день микробные продуценты янтарной кислоты были получены на основе именно данного микроорганизма [1].

Биосинтез янтарной кислоты путем фиксации CO₂ и образования шавелевоуксусной кислоты в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот является весьма привлекательным, однако не может быть осуществлен из-за дефицита НАДН эквивалентов, образующихся при гликолизе. Лучшие показатели анаэробной продукции янтарной кислоты при сбраживании глюкозы, достигаются в процессах биосинтеза, представляющих сочетание двух биохимических путей – восстановительной части цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта. Глиоксилатный шунт, потребляющий меньшее количество НАДН на каждую синтезируемую

молекулу янтарной кислоты, выступает в данном случае как донор “остаточных” гликолитических НАДН для формирования целевого вещества в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот.

Распределение потоков углерода между восстановительной частью цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатным шунтом обуславливается функционированием метаболического узла фосфоенолпируват – шавелевоуксусная кислота – пировиноградная кислота – ацетил-КоА. В клетках *E. coli* изменения в данной точке ветвления могут быть осуществлены различными способами.

Один из стандартных подходов к модификации функционирования данного метаболического узла заключается в инактивации пируватформиаатлиазы PflB (КФ 2.3.1.54). В результате этого создаются условия для потенциально доминирующего участия в биосинтезе янтарной кислоты восстановительной части цикла трикарбоновых кислот. Данный подход использован при конструировании таких рекомбинантных продуцентов янтарной кислоты как *E. coli* KJ060 [1], *E. coli* AFP184 [2], *E. coli* NZN111 [3] и других. Другим подходом является обеспечение в клетках целевого рекомбинанта активности гетерологичной пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) на фоне присутствующей пируватформиаатлиазы. За счет конкурентного по отношению к пируватформиаат-

Таблица 1. Используемые штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штаммы		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MG1655 Δprc	<i>E. coli</i> MG1655 <i>prc::\lambda attB</i>	Данная работа
SGM0.1	<i>E. coli</i> MG1655 <i>ackA-pta::\lambda attB</i> , <i>poxB::\lambda attB</i> , <i>ldhA::\lambda attB</i>	»
SGM0.1 P _L - <i>aceEF-lpdA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>ackA-pta::\lambda attB</i> , <i>poxB::\lambda attB</i> , <i>ldhA::\lambda attB</i> , <i>\lambda attB</i> -P _L - <i>aceEF-lpdA</i>	»
SGM0.1 [pPYC]	SGM0.1 + pPYC	»
SGM0.1 P _L - <i>aceEF-lpdA</i> [pPYC]	SGM0.1 P _L - <i>aceEF-lpdA</i> + pPYC	»
SGM0.1 [pMW119]	SGM0.1 + pMW119	»
SGM0.1 P _L - <i>aceEF-lpdA</i> [pMW119]	SGM0.1 P _L - <i>aceEF-lpdA</i> + pMW119	»
Плазмиды		
pMW118-(<i>\lambda attL</i> -Cm- <i>\lambda attR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>\lambda attL</i> - <i>cat</i> - <i>\lambda attR</i> cassette	[11]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - <i>\lambda gam</i> - <i>bet</i> - <i>exo</i>	[10]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - <i>\lambda xis</i> - <i>int</i> , <i>cIts857</i>	[12]
pMW119	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i>	GenBank AB005476.2
pPYC	pMW119 с клонированным геном пируват-карбоксилазы (<i>pycA</i>) из <i>B. subtilis</i>	Данная работа

лиаза карбоксилирующего действия пируваткарбоксилазы в клетке создается повышенная концентрация щавелевоуксусной кислоты, что также стимулирует биосинтез янтарной кислоты в восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот. Примером реализации данного подхода может быть рекомбинантный продуцент янтарной кислоты *E. coli* SBS550MG/*pyc* [4]. При конструировании штамма *E. coli* AFP111/*pyc* [5] были применены оба вышеописанных подхода.

В результате подобных модификаций окислительно-восстановительный баланс клетки не претерпевает значительных изменений, способных обеспечить восстановительную часть цикла трикарбоновых кислот недостающими для эффективного биосинтеза янтарной кислоты восстановленными эквивалентами НАДН. Однако дополнительную генерацию НАДН можно обеспечить путем конверсии пировиноградной кислоты в ацетил-КоА, под действием ферментов НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса AceEF-LpdA (КФ 1.2.4.1; 2.3.1.12; 1.8.1.4), чья активность практически не проявляется в анаэробных условиях [6] за счет сниженной экспрессии соответствующих генов. Перераспределение потоков углерода между двумя путями биосинтеза янтарной кислоты будет осуществляться при этом под действием эффекта прецизионной метаболической регуляции с отрицательной обратной связью, поскольку сама актив-

ность пируватдегидрогеназного комплекса является НАДН-репрессуемой [7, 8].

Цель работы – изучение эффекта конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих белки-компоненты НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, на анаэробную продукцию янтарной кислоты модельными штаммами-продуцентами.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Штамм *E. coli* K12 MG1655 (ВКПМ В-6195) был использован в качестве исходного для конструирования всех полученных в работе штаммов. Используемые в работе штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB, SOC и минимальной среде M9 [9], при необходимости с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Реагенты. Использовали препараты рестриктаз и T4 ДНК-лигазы, ДНК полимеразы Taq (“Fermentas”, Литва) и Phusion (“Finnzymes”, Финляндия). Олигонуклеотиды (табл. 2) синтезировали в ЗАО “Синтол” (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

Таблица 2. Использованные в работе олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность
P1	5'-catgctgagtaagtttagtactggttctgaaactgcggcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttactgctgctgtgcagactgaatcgcagtcagcgtgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-cagtgcatgatgtaatacataaatgt-3'
P4	5'-atgcagcgcagttaagcaag-3'
P5	5'-catgaacaacaggttcagacttatatcgccaaaaccgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-ttacctagccagttgttttcgccagttcgatcactgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P7	5'-gtcagatgaactaaactgttaccg-3'
P8	5'-ggccatcatcgcttcgag-3'
P9	5'-tatgaaactcgccgtttatagcacaaaacagtcagcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P10	5'-ttaaaccagttcgttcggcaggtttcgctttttctgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P11	5'-gtggcatgttaaccgttcag-3'
P12	5'-gccatcagcaggttagcg-3'
P13	5'-tatgaacgaacaatattccgattgcgtagtaatgtcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P14	5'-ttagccgttattacgcatactgcccaatcccggctgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P15	5'-gacgtcaccgcttttacgtg-3'
P16	5'-gctttccagtaaaaagaggttag-3'
P17	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P18	5'-tattctttacctttaaaccgccaatgcttcgtttc-3'
P19	5'-gatcggatccacgtcatttgggaaacgttctgacattattctttacctttaaaccgccaatg-3'
P20	5'-aaaactcaacgttattagatagataaggaataaccccgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P21	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P22	5'-gcaactaaactagaacctgtc-3'
P23	5'-tgagcacgctcaacaccttc-3'
P24	5'-gacgtttctagaaacgggagtagcccctccgg-3'
P25	5'-agtaatggtaccactctataatctctgaagtcccc-3'

реагенты были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Конструирование штаммов и плазмид. Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [10]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *ppc*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1, P2; P5, P6; P9, P10; P13, P14 и плазмиды pMW118-(*λattL*-*Сm*-*λattR*) [11] в качестве матрицы.

Полученные фрагменты ДНК были по отдельности интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощника pKD46. Последующее удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами (*attachment*) фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [12]. Факт соответствия предполагаемых и полученных

экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *ppc*, подтверждали ПЦР анализом с помощью пар локус-специфических праймеров P3, P4; P7, P8; P11, P12 и P15, P16, соответственно. Делеции генов *ackA-pta*, *poxB* и *ldhA* были объединены в штамме SGM0.1 серией последовательных P1-зависимых трансдукций [9].

Для обеспечения конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, промотор P_L фага лямбда, соединенный с последовательностью Шайна-Дальгарно (SD) гена *aceF*, был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655 перед кодирующим участком гена *aceE*. ПЦР амплификацией с использованием пар праймеров P17, P18; P17, P19 и геномной ДНК фага лямбда был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания Bg/II, промотор P_L, последовательность SD гена *aceF* и нуклеотиды, комплементарные 5'-концу кодирующей области гена

aceE. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*III, маркер *Sm*^R и нуклеотиды, гомологичные участку ДНК, предшествующему непосредственно кодирующей области гена *aceE*, был получен при помощи ПЦР с использованием праймеров P20 и P21 и плазмиды pMW118-(*λattL*-*Sm*-*λattR*).

Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*III и лигированы Т4 ДНК-лигазой [9]. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P19 и P20. Полученный ПЦР-продукт был использован для интеграции в хромосому. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *aceE*, было подтверждено в полученных клонах секвенированием с помощью праймеров P22 и P23. Штамм SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* был получен в результате переноса P1-зависимой трансдукцией полученной модификации в штамм SGM0.1.

Ген *pusA* *Bacillus subtilis*, кодирующий пируваткарбоксилазу, был клонирован в составе плазмиды pMW119. Фрагмент ДНК, содержащий ген *pusA* с собственной регуляторной областью был получен с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы хромосомы штамма *B. subtilis* 168 и праймеров P24 и P25. Полученный ПЦР-продукт был, в дальнейшем, последовательно обработан эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Kpn*I. Параллельно эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Kpn*I была обработана плазида pMW119. Полученные линейные фрагменты ДНК, содержащие ген *pusA* и больший *Xba*I-*Kpn*I фрагмент плазмиды pMW119 были лигированы с помощью Т4 ДНК-лигазы. Полученная лигазная смесь была использована для трансформации штамма *E. coli* MG1655 *Δppc* с последующим отбором Ap^R трансформантов на агаризованной среде LB, содержащей 100 мг/л ампициллина. Полученные трансформанты проверяли на способность к росту на агаризованной минимальной среде M9 в присутствии 0.2% глюкозы в качестве единственного источника углерода. Индивидуальные клоны, способные к росту на данной среде, содержали плазмиду, включающую ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу. Выделенная по стандартной методике из соответствующих трансформантов плазида была названа pPYC.

Трансформацию штаммов SGM0.1 и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* плазидами pMW119 и pPYC осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов для продукции янтарной кислоты. Клетки штаммов SGM0.1, SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA*, SGM0.1 [pMW119], SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pMW119], SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. К 1 мл полученных ночных культур добавляли 49 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы. Полученные культуры

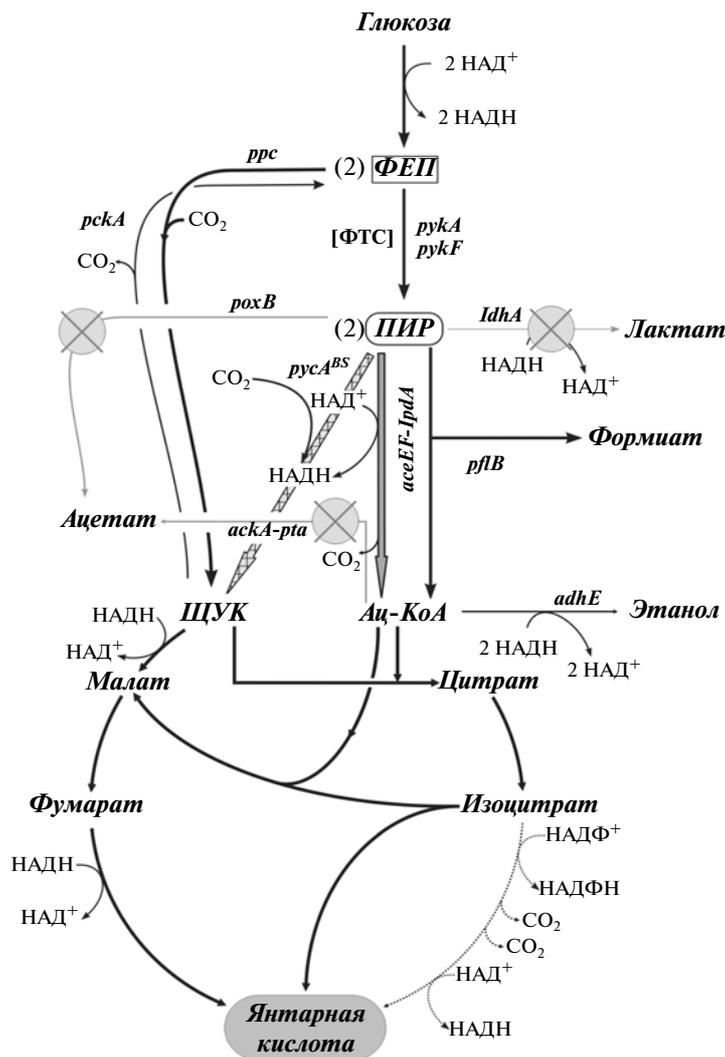
выращивали в колбах объемом 750 мл при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин в течение 6 ч. Полученные клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 20 г/л глюкозы. В дальнейшем проводили инкубацию полученных клеточных культур в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл закрытых завинчивающимися крышками при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин. При выращивании штаммов SGM0.1 [pMW119], SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pMW119], SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] использованные среды содержали дополнительно 100 мг/л ампициллина. Аналогичным образом оценивали способность штаммов SGM0.1, SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA*, SGM0.1 [pMW119], SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pMW119], SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] продуцировать янтарную кислоту в присутствии в среде дополнительного источника иона HCO₃⁻. Культивирование проводили как описано выше, за исключением того, что среда, использованная на последней стадии, дополнительно содержала 1.5 г/л NaHCO₃.

Аналитические методы. Концентрацию органических кислот и остаточной глюкозы в культуральных жидкостях определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Для измерения концентраций органических кислот использовали ReproSil-Pur C18-AQ ("Dr. Maisch", Германия) с детекцией при длине волны 210 нм. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Концентрацию этанола определяли методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором на колонке OmegaWax (30 м, 0.25 мм в.д., 0.25 мкм толщины пленки) ("Supelco", США). Использовали хроматограф "Shimadzu" GC-17A (Япония), оснащенный автосамплером АОС-20i.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе был исследован эффект конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих белки-компоненты НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, на анаэробную продукцию янтарной кислоты модельными штаммами-продуцентами.

В качестве базовых штаммов-продуцентов янтарной кислоты в работе были использованы штаммы *E. coli* SGM0.1, сконструированный таким образом, что в нем были инактивированы гены *pta*, *ackA*, *poxB* и *ldhA*, кодирующие фосфотрансацетилазу Pta (КФ 2.3.1.8), ацетаткиназу AckA (КФ 2.7.2.1), пируватоксидазу PoxB (КФ 1.2.5.1) и лактатдегидрогеназу LdhA (КФ 1.1.1.28), катализирующие основные реакции образования уксусной и молочной кислот, и SGM0.1



Общая схема окислительно-восстановительных реакций центрального метаболизма и возможных путей анаэробного биосинтеза янтарной кислоты в сконструированных штаммах.

Вовлеченные ферменты обозначены наименованиями кодирующих их генов.

Серым цветом обозначены продукты, основные пути образования которых в сконструированных штаммах инактивированы (перечеркнутые круги) за счет делеций соответствующих генов.

Широкой серой стрелкой обозначена возможность анаэробной конверсии пирувинуградной кислоты в Ац-КоА под действием пируватдегидрогеназы в штаммах SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC].

Широкой заштрихованной стрелкой обозначена возможность конверсии пирувинуградной в шавелевоуксусную кислоту под действием гетерологичной пируваткарбоксилазы в штаммах SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC].

Пунктиром обозначена окислительная часть цикла трикарбоновых кислот, не активная в анаэробных условиях.

ФЕП – фосфоенолпируват, ПИР – пирувинуградная кислота, ЩУК – шавелевоуксусная кислота, Ац-КоА – ацетил-КоА, ФТС – фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система.

[pPYC] – дополнительно обладающий активностью гетерологичной пируваткарбоксилазы.

Целевые хромосомные модификации были получены в штаммах с использованием оптимизированной [11, 12] методики, разработанной Даденко и Ваннер [10] и основанной на эффекте λRed-зависимой гомологичной рекомбинации. Конститутивная экспрессия генов *aceE*, *aceF*, *lpdA* была обеспечена

заменой нативной регуляторной области соответствующего оперона в хромосоме промотором P_L фага лямбда. Также сайт связывания рибосом гена *aceE* был заменен сайтом связывания рибосом гена *aceF*, обладающим нуклеотидной последовательностью более близкой к канонической.

Ген *pycA* *B. subtilis*, кодирующий пируваткарбоксилазу, расположили под контролем собственной

Таблица 3. Концентрации и молярные выходы* (%) метаболитов, продуцируемых сконструированными штаммами в анаэробных условиях

Штамм	Потребленная глюкоза	Пировиноградная кислота		Уксусная кислота		Этанол		Янтарная кислота	
	мМ	мМ	%	мМ	%	мМ	%	мМ	%
Без HCO_3^-									
SGM0.1	25.0 (0.5)	30.9 (0.4)	123.7 (0.7)	0.7 (0.1)	2.7 (0.1)	11.5 (0.1)	46.1 (0.5)	3.9 (0.1)	15.4 (0.1)
SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$	25.5 (0.9)	30.6 (0.3)	119.8 (2.3)	1.2 (0.1)	4.5 (0.1)	11.9 (0.1)	46.8 (1.4)	4.4 (0.1)	17.3 (0.4)
SGM0.1 [pPYC]	23.9 (0.5)	30.7 (0.4)	128.5 (0.9)	0.7 (0.1)	2.9 (0.1)	12.2 (0.1)	51.3 (0.5)	4.2 (0.1)	17.6 (0.2)
SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$ [pPYC]	23.9 (0.5)	18.7 (0.3)	78.2 (0.5)	1.7 (0.1)	7.0 (0.1)	14.0 (0.1)	58.7 (0.7)	12.2 (0.2)	51.2 (0.7)
С 1.5 г/л NaHCO_3									
SGM0.1	30.7 (0.4)	34.9 (0.3)	113.7 (0.5)	1.0 (0.1)	3.3 (0.2)	13.9 (0.1)	45.1 (0.2)	8.2 (0.1)	26.6 (0.1)
SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$	30.6 (0.5)	30.6 (0.4)	100.1 (0.3)	2.5 (0.1)	8.2 (0.1)	13.1 (0.2)	42.9 (1.2)	10.8 (0.1)	35.4 (0.7)
SGM0.1 [pPYC]	30.6 (0.4)	34.2 (0.7)	111.5 (0.7)	1.2 (0.1)	3.8 (0.1)	12.4 (0.1)	40.4 (0.1)	9.5 (0.1)	31.2 (0.3)
SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$ [pPYC]	33.6 (0.4)	18.0 (0.1)	53.8 (0.5)	1.3 (0.3)	4.0 (0.3)	13.8 (0.3)	41.1 (0.3)	19.2 (0.1)	57.3 (0.4)

* Молярные выходы продуктов приведены в расчете на потребленную глюкозу. Указанные значения являются средними для трех независимых экспериментов. В скобках указаны стандартные отклонения.

регуляторной области в составе низкокопийной плазмиды pMW119. Соответствующая плазида pPYC, содержащая ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу, была отобрана в клетках штамма *E. coli* MG1655 Δppc . Известно, что *ppc* мутанты *E. coli* не способны к синтезу шавелевоуксусной кислоты и являются ауксотрофами по интермедиатам цикла трикарбоновых кислот, в результате чего не способны расти на средах, содержащих в качестве источников углерода сахара [13]. Наличие в клетках данного штамма плазмиды pPYC, содержащей ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу, восстанавливало способность к росту штамма на минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода.

Общая схема центрального метаболизма и возможные пути анаэробного биосинтеза янтарной кислоты в сконструированных штаммах SGM0.1, SGM0.1 [pPYC], SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$ и SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$ [pPYC] представлены на рисунке.

Для получения янтарной кислоты штаммы культивировали в минимальной солевой среде M9 с использованием глюкозы в качестве единственного источника углерода. Культивирование включало

аэробную стадию накопления биомассы и анаэробную стадию образования янтарной кислоты. Анаэробную инкубацию клеток полученных штаммов осуществляли как в отсутствии, так и в присутствии в среде дополнительного источника иона HCO_3^- . Концентрации остаточной глюкозы и метаболитов, продуцируемых сконструированными штаммами в анаэробных условиях, определяли методами ВЭЖХ и ГХ. Результаты соответствующих экспериментов представлены в табл. 3. Показатели утилизации глюкозы и образования метаболитов контрольными штаммами SGM0.1 [pMW119] и SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$ [pMW119] не отличались от таковых для штаммов SGM0.1 и SGM0.1 $P_{L-aceEF-lpdA}$, соответственно.

Из результатов измерений следует, что основными продуктами анаэробного сбраживания глюкозы всеми исследованными штаммами являлись пировиноградная кислота, янтарная кислота и этанол. Отсутствие среди продуктов брожения молочной кислоты согласовывалось с инактивацией в штаммах основного пути ее образования. Остаточная продукция штаммами уксусной кислоты, с учетом инактивации основных путей ее биосинтеза, объяснялась, по-видимому, действием альтернативных ферментов, таких как ацил-КоА тиоэстераза YciA

(КФ 3.1.2.20) [14], ацетальдегиддегидрогеназа MhpF (КФ 1.2.1.10) [15] и альдегиддегидрогеназа AldB (КФ 1.2.1.4) [16].

Значительное образование штаммами пировиноградной кислоты в первую очередь зависело от действия фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы транспорта сахаров. Моллярный выход пировиноградной кислоты, в расчете на потребленную глюкозу, в большинстве случаев превышавший 100%, подтверждал данное предположение. Известно, что рост *E. coli* при высоких концентрациях глюкозы, как источника углерода, даже в аэробных условиях сопровождается значительной экскрецией уксусной кислоты. Данный феномен получил название “бактериального эффекта Крэбтри” [17]. Инактивация основных путей биосинтеза уксусной кислоты за счет делеций генов *ackA*, *pta* и *poxB* приводит, в данных условиях, к накоплению, вместо уксусной, пировиноградной и даже молочной кислот [18]. Дополнительная инактивация гена *ldhA*, блокирующая образование молочной кислоты, приводит к доминантной экскреции пировиноградной кислоты [13]. Вместе с тем, инактивация фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы транспорта сахаров, снижающая эффективность потребления глюкозы и, тем самым, интенсивность гликолиза, приводит к отмене данного эффекта [13, 19].

Присутствие в штамме SGM0.1 [pPYC] активности пируваткарбоксилазы не приводило к выраженному снижению образования пировиноградной кислоты не только в отсутствии, но и в присутствии дополнительного источника HCO_3^- . Данный факт позволял считать, что возможное образование щавелевоуксусной кислоты, в результате карбоксилирования пировиноградной кислоты, и ее дальнейшая конверсия в яблочную и янтарную кислоты в этом случае лимитировались, в первую очередь, недостатком восстановленных НАДН эквивалентов. Щавелевоуксусная кислота, синтезированная пируваткарбоксилазой, могла превращаться в фосфоенолпируват фосфоенолпируваткарбоксикиназой PckA (КФ 4.1.1.49) и в дальнейшем в пировиноградную кислоту под действием пируваткиназ PucA и PucF (КФ 2.7.1.40) или же в результате действия фосфотрансферазной транспортной системы.

Конститутивная экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона в штамме SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* приводила к относительному снижению продукции пировиноградной кислоты только в случае присутствия в среде дополнительного источника иона HCO_3^- . При этом данный эффект был связан с соответствующим повышением продукции янтарной кислоты. Можно было предположить, что в этом случае в щавелевоуксусную кислоту мог эффективнее превращаться фосфоенолпируват под действием, соответственно, фосфоенолпируваткарбоксилазы Ppc (КФ 4.1.1.31). Дополнительные НАДН эквиваленты, генерируе-

мые активным НАД⁺-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом, способствовали конверсии щавелевоуксусной кислоты в янтарную кислоту в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот.

Продукция янтарной кислоты штаммами SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* в средах, не содержащих дополнительного источника HCO_3^- , лишь незначительно превышала показатели контрольного штамма SGM0.1. В первом случае это было связано как с недостатком растворенного CO_2 для эффективного карбоксилирования пировиноградной кислоты, так и с недостатком необходимых восстановленных эквивалентов для последующей конверсии щавелевоуксусной кислоты в янтарную в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот. Во втором случае основной причиной была недостаточная генерация щавелевоуксусной кислоты фосфоенолпируваткарбоксилазой. В присутствии дополнительного источника HCO_3^- эффект наличия в штаммах активности пируваткарбоксилазы или же конститутивной экспрессии *aceEF-lpdA* оперона был более выраженным, выход янтарной кислоты повышался на ~4.5% и ~9%, соответственно. Тем не менее, отсутствие выраженного снижения продукции соответствующими штаммами пировиноградной кислоты в данных условиях позволяло сделать предположение о сохраняющихся условиях лимитации для эффективной конверсии этого предшественника в янтарную кислоту. При этом в случае штамма, содержащего пируваткарбоксилазу, позволяющую обеспечить эффективную конверсию пировиноградной кислоты в щавелевоуксусную кислоту, лимитация была обусловлена непосредственно недостатком восстановленных эквивалентов для конверсии последней в янтарную кислоту. Тогда как в случае штамма SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA*, способного к формированию дополнительных к гликолитическим НАДН эквивалентов за счет активности НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, эта лимитация обуславливалась недостаточным образованием щавелевоуксусной кислоты из интенсивно расходуемого клеткой метаболического предшественника пировиноградной кислоты – фосфоенолпирувата. Таким образом обеспечение в одном штамме совместной активности пируваткарбоксилазы и НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса могло взаимно компенсировать эффекты лимитирующие продукцию янтарной кислоты штаммами SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA*.

Действительно, объединение обеих активностей в штамме SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] приводило к резкому падению продукции им пировиноградной кислоты и резкому росту образования янтарной кислоты. При этом отношения приращений количеств синтезированной штаммом янтарной кислоты

и убывали количества синтезированной им пировиноградной кислоты относительно штаммов SGM0.1 и SGM0.1 [pPYC] во всех случаях были близки к 2/3. Это свидетельствовало о том, что увеличение продукции янтарной кислоты штаммом SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] относительно штаммов SGM0.1 и SGM0.1 [pPYC], продуцирующих данное вещество в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот, было обусловлено, в основном, активацией глиоксилатного шунта. С участием глиоксилатного шунта две молекулы янтарной кислоты могут быть синтезированы из одной молекулы щавелевоуксусной кислоты и двух молекул ацетил-КоА. Поскольку щавелевоуксусная кислота и ацетил-КоА синтезируются в штамме SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] из пировиноградной кислоты, можно заключить, что в этом случае образование 2 молекул янтарной кислоты с участием глиоксилатного шунта требует расхода 3 молекул пировиноградной кислоты, обуславливая соотношение продукт/субстрат – 2/3. В клетках *E. coli* дикого типа ферменты глиоксилатного шунта активируются лишь при росте на уксусной кислоте, жирных кислотах и других субстратах, утилизация которых происходит через первичное образование ацетил-КоА. Вместе с тем, известно, что гены кодирующие ферменты глиоксилатного шунта экспрессируются конститутивно при инактивации белка-репрессора IclR [20]. Однако, глиоксилатный шунт может активироваться при анаэробной утилизации глюкозы штаммами с инактивированными генами *ackA*, *pta*, *ldhA* и *adhE* даже в присутствии интактного IclR [4]. По-видимому, это связано с формированием в мутантных штаммах избыточного пула ацетил-КоА из пировиноградной кислоты под действием пируватформатлиазы. В штамме SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC], с интактным *adhE*, относительное возрастание пула ацетил-КоА обуславливалось дополнительной к пируватформатлиазе активностью НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса. При этом возрастание пула ацетил-КоА, сопровождающееся генерацией дополнительных НАДН эквивалентов на фоне интактной альдегид/алкоголь дегидрогеназы AdhE, не приводило к значительному увеличению образования этанола штаммом. Это объяснялось генерацией НАД⁺-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом лишь одной молекулы НАДН на формируемый ацетил-КоА, в то время как конверсия последнего в этанол требует двух восстановленных эквивалентов. С учетом активности пируватформатлиазы, синтез в клетке ацетил-КоА заведомо превышал генерацию необходимых для его конверсии в этанол восстановленных эквивалентов. Вместе с тем, образование янтарной кислоты с участием глиоксилатного шунта требует расхода двух молекул ацетил-КоА и окисления одной молекулы НАДН. Таким образом, у штамма SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] вовлечение ацетил-КоА в глиок-

силатный шунт, с формированием янтарной кислоты, было предпочтительней его конверсии в этанол.

Важно отметить, что ярко выраженный эффект конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* в штамме с активностью пируваткарбоксылазы наблюдался вне зависимости от присутствия в среде дополнительного источника HCO₃⁻. Это позволило заключить, что сочетание активностей пируваткарбоксылазы и НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса способствовало достижению определенного баланса окислительно/восстановительных реакций и потоков углерода в клетках рекомбинантного штамма, в то время как повышение уровня растворенного CO₂ способствовало лишь общей интенсификации соответствующих биохимических процессов.

Влияние активного пируватдегидрогеназного комплекса на анаэробный метаболизм клеток *E. coli* [21], на анаэробную продукцию ими этанола [22, 23] и других продуктов брожения [24] в последнее время активно обсуждается. Тем не менее прямой эффект положительного влияния активности НАД⁺-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса на анаэробную продукцию янтарной кислоты клетками *E. coli* продемонстрирован нами впервые.

Данный эффект был показан на модельных рекомбинантных штаммах. Очевидно, что их оптимизация для сверхсинтеза целевого продукта требует внесения дополнительных направленных модификаций в клеточный метаболизм.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГосНИИгенетика Антоновой С.В. и Сухоженко А.В. за проведение хроматографических анализов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jantama K., Haupt M.J., Svoronos S.A., Zhang X., Moore J.C., Shanmugam K.T., Ingram L.O. // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 99. № 5. P. 1140–1153.
2. Andersson C., Hodge D., Berglund K.A., Rova U. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. № 2. P. 381–388.
3. Stols L., Donnelly M.I. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. № 7. P. 2695–2701.
4. Sánchez A.M., Bennett G.N., San K.Y. // *Metab. Eng.* 2005. V. 7. № 3. P. 229–239.
5. Vemuri G.N., Eiteman M.A., Altman E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 4. P. 1715–1727.
6. Cassey B., Guest J.R., Attwood M.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998. V. 159. № 2. P. 325–329.
7. Schmincke-Ott E., Bisswanger H. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 114. № 2. P. 413–420.
8. Shen L.C., Atkinson D.E. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 22. P. 5974–5978.
9. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
10. Datsenko K.A., Wanner B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.

11. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
12. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
13. Sauer U., Eikmanns B.J. // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29. № 4. P. 765–794.
14. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
15. Ferrández A., Garcá J.L., Díaz E. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 8. P. 2573–2581.
16. Ho K.K., Weiner H. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 3. P. 1067–1073.
17. Veit A., Polen T., Wendisch V.F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. № 2. P. 406–421.
18. De Mey M., Lequeux G.J., Beauprez J.J., Maertens J., Van Horen E., Soetaert W.K., Vanrolleghem P.A., Vandamme E.J. // Biotechnol. Prog. 2007. V. 23. № 5. P. 1053–1063.
19. Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A.A., Bolívar F. // Metab. Eng. 2002. V. 4. № 2. P. 124–137.
20. Gui L., Sunnarborg A., Pan B., LaPorte D.C. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 1. P. 321–324.
21. Murarka A., Clomburg J.M., Moran S., Shanks J.V., Gonzalez R.J. // Biol. Chem. 2010. V. 285. № 41. P. 31548–31558.
22. Zhou S., Iverson A.G., Grayburn W.S. // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. № 2. P. 335–342.
23. Kim Y., Ingram L.O., Shanmugam K.T. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 6. P. 1766–1771.
24. Wang Q., Ou M.S., Kim Y., Ingram L.O., Shanmugam K.T. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 7. P. 2107–2114.

Anaerobic Synthesis of Succinic Acid by *Escherichia coli* Strains with Activated NAD⁺ Reducing Pyruvate Dehydrogenase Complex

A. Yu. Skorokhodova, A. Yu. Gulevich, A. A. Morzhakova, R. S. Shakulov, and V. G. Debabov

Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 117545, Russia

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Received November 24, 2010

Abstract—Effect of constitutive expression of the *aceEF-lpdA* operon genes coding for the enzymes of NAD⁺ reducing pyruvate dehydrogenase complex on the anaerobic production of succinic acids from glucose by recombinant *Escherichia coli* strains was studied. Basic producer strains were obtained by inactivation of the main pathways for synthesis of acetic and lactic acids by deletion of the genes *ackA*, *pta*, *poxB*, and *ldhA* (SGM0.1) in *E. coli* strain MG1655 cells and additional introduction of the *Bacillus subtilis* pyruvate carboxylase (SGM0.1 [pPYC]). A constitutive expression of the genes *aceEF-lpdA* in derivatives of the basic strains SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* and SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] was provided by replacing the native regulatory region of the operon with the lambda phage P_L promoter. Molar yields of succinic acid in anaerobic glucose fermentation by strains SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* and SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] exceeded the corresponding yields displayed by several control strains (exceeded considerably in the case of the strains with a pyruvate carboxylase activity). It is concluded that an increase in the succinic acid production by strain SGM0.1 P_L-*aceEF-lpdA* [pPYC] as compared with the strains SGM0.1 and SGM0.1 [pPYC], which synthesize this substance in the reductive tricarboxylic acid cycle, is determined by activation of the glyoxylate shunt.