

УДК 577.121

СИНТЕЗ 1-БУТАНОЛА КЛЕТКАМИ *Escherichia coli* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БУТИРИЛ-КоА ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ КЛОСТРИДИЙ И НАТИВНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ β -ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2012 г. А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, А. А. Моржакова, С. В. Антонова, А. В. Сухоженко, Р. С. Шакулов, В. Г. Дебабов

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

e-mail: gulevich@genetika.ru

Поступила в редакцию 08.12.2011 г.

Исследован анаэробный биосинтез 1-бутанола из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, формирующими бутирил-КоА под действием гетерологичного ферментативного комплекса клостридий или в результате обращенного действия нативных ферментов пути β -окисления жирных кислот. Обнаружено, что при инактивации основных путей образования уксусной и молочной кислот, за счет делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB* и *ldhA*, эффективность биосинтеза бутирил-КоА и его восстановленного продукта 1-бутанола двумя типами рекомбинантных штаммов сравнима. Фактором, лимитирующим продукцию 1-бутанола полученными штаммами, является низкая субстратная специфичность по отношению к бутирил-КоА основной КоА-зависимой алкоголь/альдегид дегидрогеназы *E. coli* AdhE. Сделан вывод, что для конструирования эффективного продуцента 1-бутанола на основе модельного штамма, синтезирующего бутирил-КоА в результате обращенного действия ферментов β -окисления жирных кислот, необходимо обеспечить в клетках штамма интенсивное формирование ацетил-КоА и повышенную активность альтернативных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ.

Бутанол, благодаря своим физико-химическим свойствам, рассматривается как перспективное биотопливо, которое может быть получено из возобновляемого сырья [1]. Природными продуцентами 1-бутанола являются представители рода *Clostridium*. *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* и др. способны сбраживать сахара с образованием смеси ацетона, 1-бутанола и этанола (так называемый **АБЭ-процесс**). Однако использование АБЭ-процесса для продукции 1-бутанола в настоящее время экономически не выгодно. Были предприняты попытки конструирования продуцентов 1-бутанола путем клонирования генов, кодирующих ферменты биосинтеза бутанола клостридий, в клетках *Escherichia coli* [2–4], *Bacillus subtilis* [4], *Pseudomonas putida* [4], *Saccharomyces cerevisiae* [5], *Lactobacillus brevis* [6]. Ключевым моментом во всех работах было обеспечение возможности биосинтеза этими микроорганизмами бутирил-КоА – метаболита в норме ими не образуемого. Недавно было показано, что в клетках *E. coli* биосинтез бутирил-КоА с последующим образованием масляной кислоты [7] или 1-бутанола [8–9] возможен в результате обращения нативного для клеток пути β -окисления жирных кислот. Цикл β -окисления жирных кислот является одним из основных биохимических путей, встречающимся во множестве организмов, и это значительно расширяет спектр

потенциальных продуцентов 1-бутанола и других высших спиртов. Формирующиеся в результате обращения β -окисления жирных кислот ацил-КоА-производные (в частности, бутирил-КоА) могут быть восстановлены в соответствующие спирты (в простейшем случае 1-бутанол) эндогенными КоА-зависимыми алкоголь/альдегид дегидрогеназами, также весьма широко распространенными ферментами.

Цель работы – сравнение эффективности биосинтеза 1-бутанола клетками *E. coli* при формировании бутирил-КоА гетерологичным ферментативным комплексом клостридий и нативными ферментами пути β -окисления жирных кислот.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* VOX-3 [9], способный синтезировать 1-бутанол по обращенному пути β -окисления жирных кислот, были использованы в качестве исходных 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 [10], при необходимости с добавле-

Таблица 1. Используемые штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MG Δ2	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i>	Данная работа
MG Δ3	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i>	»
MG Δ4	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i>	»
MG [pHYc- <i>thl-bcs</i>]	MG 1655 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
MG Δ2 [pYHyc- <i>thl-bcs</i>]	MG Δ2 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
MG Δ3 [pYHyc- <i>thl-bcs</i>]	MG Δ3 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
MG Δ4 [pYHyc- <i>thl-bcs</i>]	MG Δ4 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
BOX-3	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q	[9]
	<i>P</i> _{<i>tre-ideal-4</i>} -SD _{φ10} - <i>adhE</i> (Glu568Lys), <i>P</i> _{<i>tre-ideal-4</i>} -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , <i>P</i> _{<i>tre-ideal-4</i>} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , <i>P</i> _{<i>tre-ideal-4</i>} -SD _{φ10} - <i>fadE</i>	
BOX-3 Δ2	BOX-3 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i>	Данная работа
BOX-3 Δ3	BOX-3 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i>	»
BOX-3 Δ4	BOX-3 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i>	»
Плаزمида		
pMW118-(<i>λattL</i> -Cm- <i>λattR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>λattL-cat-λattR</i> cassette	[12]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , <i>P</i> _{<i>araB</i>} - <i>λgam-bet-exo</i>	[11]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , <i>P</i> _{<i>R</i>} - <i>λxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[13]
pHYc	pHY300PLK, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>ori-pAMA1</i> , <i>ori-177</i>	[14]
pYHyc- <i>thl-bcs</i>	pYHyc с клонированными генами <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> и <i>thlA</i> из <i>C. acetobutylicum</i>	[6]

нием ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Реагенты. Использовали препараты рестриктаз и Т4 ДНК-лигазы (“Fermentas”, Литва), 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 реагенты были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Конструирование штаммов и плазмид. Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [11]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, 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*-Cm-*λattR*) [12] 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 [13]. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P3, P4; P7, P8; P11, P12 и P15, P16 соответственно. Делеции генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE* были объединены в хромосомах целевых штаммов серией последовательных P1-зависимых трансдукций [10].

Трансформацию штаммов плазмидами pYHyc [14] и pYHyc-*thl-bcs* [6] осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов для биосинтеза 1-бутанола. Клетки штамма *E. coli* дикого типа MG1655, а также клетки всех рекомбинантных штаммов выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. По 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 50 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы. Полу-

Таблица 2. Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность
P1	5'-catgtcgagtaagtagtactggttctgaactgcgg-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttactgctgctgtgcagactgaatcgagtcagcgc-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-cagtgcgatggttaatacataaatgt-3'
P4	5'-atgcagcgcagttaagcaag-3'
P5	5'-catgaaacaacgggtgcagcttatatcgccaaaac-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-ttaccttagccagttgttttcgccagttgatcac-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P7	5'-gtcagatgaactaaactgttaccg-3'
P8	5'-ggccatcatcgcttcgag-3'
P9	5'-tatgaaactcggctttatagcacaacagtagca-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P10	5'-ttaaccagttcgttcggcaggttcgcttttc-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P11	5'-gtggcatgttaaccgttcag-3'
P12	5'-gccatcagcaggcttagc-3'
P13	5'-tatgctgttactaatgtcgtgaactaacgcact-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P14	5'-ttaagcggatttttcgctttttctcagcttttagc-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P15	5'-cagtgagtgtagcgcgag-3'
P16	5'-gaagccgttatagtcctcag-3'

ченные культуры растили в колбах объемом 750 мл при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин в течение 6 ч. В случае штамма ВОХ-3 и его производных спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-D-тио-галактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Полученные клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды М9 или LB, содержащих 10 г/л глюкозы. Инкубацию полученных клеточных культур проводили в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых заворачивающимися крышками, при 37°C на роторной качалке при 150 об/мин в присутствии 1 мМ ИПТГ для штамма ВОХ-3 и его производных и 100 мкг/мл ампициллина для штаммов, содержащих плазмиды.

Аналитические методы. Концентрацию органических кислот и остаточной глюкозы в культуральных жидкостях определяли методом ВЭЖХ с использованием системы HPLC “Waters” (США). Для измерения концентрации 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). Концентрации 1-бутанола и этанола в культуральных жидкостях определяли методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором на колонке OmegaWax (30 м, 0,25 мм в.д., 0,25 мкм толщина пленки) (“Supelco”, США). Использовали хроматограф GC-17A (“Shimadzu”, Япония), оснащенный автосамплером АОС-20i.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез бутирил-КоА в клетках штамма *E. coli* дикого типа MG1655 и в его производных был обеспечен за счет экспрессии, в составе плазмиды, генов: *thlA*, кодирующего ацетил-КоА ацетилтрансферазу (КФ 2.3.1.8), *hbd*, кодирующего 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназу (КФ 1.1.1.157), *crt*, кодирующего 3-гидроксибутирил-КоА дегидратазу (КФ 4.2.1.55), *bcd*, кодирующего бутирил-КоА дегидрогеназу (КФ 1.3.99.2) и *etfA* и *etfB*, кодирующих компоненты электрон-транспортного флавопротеина из *C. acetobutylicum*. У штамма ВОХ-3 и его производных синтез бутирил-КоА осуществлялся ферментами пути аэробного β-окисления жирных кислот при индукции экспрессии хромосомальных копий соответствующих генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора [9]. Двухстадийное восстановление сформированного бутирил-КоА в 1-бутанол в штаммах катализировалось нативной алкоголь/альдегид дегидрогеназой *E. coli* AdhE (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3).

При анаэробной утилизации глюкозы штамм MG [pHYc-*thl-bcs*], содержащий гетерологичные гены кластридий, и штамм ВОХ-3, не содержащий гетерологичных генов, синтезировали заметные количества 1-бутанола (табл. 3). Штамм MG1655 и его производные, содержащие плазмиду рHУс, не синтезировали детектируемых количеств 1-бутанола. Количество 1-бутанола, продуцируемое штаммом MG [pHYc-*thl-bcs*], значительно превосходило, образуемое штаммом ВОХ-3. Данный факт, по-видимому, объяснялся различным

Таблица 3. Концентрации* метаболитов, продуцируемых сконструированными штаммами в условиях анаэробной утилизации глюкозы

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Кислота, мМ				Этанол, мМ	1-Бутанол, мкМ
		пировиноградная	молочная	уксусная	янтарная		
MG [pH _{Yc} - <i>thl</i> - <i>bcs</i>]	24.0 (0.5)	0.5 (0.1)	6.1 (0.2)	10.0 (0.5)	1.6 (0.1)	10.2 (0.3)	170.0 (7.2)
VOX-3	22.8 (0.6)	0.2 (0.1)	6.1 (0.2)	11.5 (0.6)	1.5 (0.1)	7.2 (0.2)	12.1 (0.8)
MG Δ2 [pH _{Yc} - <i>thl</i> - <i>bcs</i>]	27.2 (0.9)	1.0 (0.2)	11.8 (0.3)	—	4.8 (0.2)	6.7 (0.2)	70.2 (3.4)
VOX-3 Δ2	26.1 (0.7)	0.7 (0.1)	12.9 (0.4)	—	4.1 (0.2)	5.8 (0.2)	—
MG Δ3 [pH _{Yc} - <i>thl</i> - <i>bcs</i>]	20.0 (0.5)	23.4 (0.5)	0.6 (0.1)	0.7 (0.1)	4.1 (0.2)	9.7 (0.3)	153.8 (6.8)
VOX-3 Δ3	21.6 (0.5)	25 (0.4)	0.8 (0.1)	1.2 (0.1)	3.1 (0.2)	7.4 (0.2)	137.0 (6.3)
MG Δ4 [pH _{Yc} - <i>thl</i> - <i>bcs</i>]	3.3 (0.2)	3.4 (0.2)	—	—	0.5 (0.1)	0.4 (0.1)	—
VOX-3 Δ4	3.3 (0.2)	3.7 (0.2)	—	—	0.7 (0.1)	0.7 (0.1)	—

* Указанные значения являются средними для трех независимых экспериментов. В скобках указаны стандартные отклонения.

количеством в штаммах копий генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза бутирил-КоА. У штамма MG [pH_{Yc}-*thl*-*bcs*] соответствующие гены экспрессировались в составе плазмиды, тогда как в штамме VOX-3 каждый ген, кодирующий фермент, участвующий в биосинтезе 1-бутанола, был представлен единственной хромосомной копией. Тем не менее, количество 1-бутанола, продуцируемое обоими штаммами, было невелико. В первую очередь, это связано с нехваткой ацетил-КоА для эффективного биосинтеза ацетоацетил-КоА и формирования дальнейших необходимых для образования целевого вещества предшественников. Действительно, практически вся потребленная штаммами глюкоза была утилизирована в продукты брожения под действием ферментов, вовлеченных в биохимические пути, конкурирующие с биосинтезом 1-бутанола за восстановленные эквиваленты и за прямые метаболические предшественники. При этом основным продуктом была уксусная кислота, при формировании которой под действием фосфотранс-ацетилазы Pta (КФ 2.3.1.8) и ацетаткиназы AckA (КФ 2.7.2.1) расходуется ацетил-КоА, а под действием пируватоксидазы PoxB (КФ 1.2.5.1), его прямой метаболический предшественник — пировиноградная кислота. Таким образом, для сбережения ацетил-КоА и повышения его доступности для биосинтеза 1-бутанола инактивировали в штаммах гены *pta*, *ackA* и *poxB*, кодирующие ферменты, катализирующие в клетках *E. coli* основные реакции образования уксусной кислоты.

В результате инактивации соответствующих генов штаммы MG Δ2 [pH_{Yc}-*thl*-*bcs*] и VOX-3 Δ2 при анаэробном сбраживании глюкозы не синтезировали детектируемых количеств уксусной кислоты, однако демонстрировали увеличенное образование продуктов — производных фосфоенолпирувата (янтарная кислота) и пировино-

градной кислоты (молочная кислота). При этом наблюдалось снижение продукции штаммами этанола и 1-бутанола. В случае штамма VOX-3 Δ2 продукции 1-бутанола не отмечалось. Можно было предположить, что падение эффективности биосинтеза штаммами спиртов, формирующихся в результате восстановления ацетил-КоА или его производного бутирил-КоА, было обусловлено двумя взаимосвязанными причинами. Первая причина — снижение интенсивности потока углерода через ацетил-КоА в результате инактивации фосфотранс-ацетилазы Pta и ацетаткиназы AckA, а также в результате возросшего расхода его метаболических предшественников — фосфоенолпирувата и пировиноградной кислоты на синтез соответственно янтарной и молочной кислот. Вторая причина — снижение относительной доступности необходимых для биосинтеза спиртов восстановленных НАДН эквивалентов. Действительно, для формирования одной молекулы этанола из ацетил-КоА необходимо 2 молекулы НАДН, в то время как для образования одной молекулы 1-бутанола из двух молекул ацетил-КоА необходимо 4 восстановленных эквивалента. В отсутствие кислорода формирование из глюкозы двух молей пировиноградной кислоты сопровождается генерацией только двух молей гликолитического НАДН. При этом формирование молочной кислоты из пировиноградной сопровождается окислением эквивалентного количества НАДН, а образование янтарной кислоты из фосфоенолпирувата в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот требует двукратного молярного избытка восстановленных эквивалентов. По этой причине, а также в силу того, что недавно была показана значимость для биосинтеза 1-бутанола “движущих сил” ацетил-КоА и НАДН [15], инактивировали в штаммах ген *ldhA*, кодирующий лактатдегидрогеназу LdhA (КФ 1.1.1.28), для повышения относи-

тельной доступности для биосинтеза 1-бутанола восстановленных НАДН эквивалентов.

Полученные штаммы MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 более половины утилизированной глюкозы экскретировали в среду в виде пировиноградной кислоты, тем самым повышая доступность гликолитически сформированных НАДН для биосинтеза 1-бутанола из “остаточных” метаболитов предшественников. Действительно, биосинтез 1-бутанола штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 возрос относительно штаммов MG Δ2 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ2. При этом продукция 1-бутанола штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 практически не отличалась. Данный результат свидетельствовал о том, что формирование бутирил-КоА в клетках *E. coli* в результате обращенного действия ферментов нативного пути β-окисления жирных кислот может быть сравнимо по эффективности с формированием этого метаболита под действием гетерологического ферментативного комплекса кластридий. Недавно эффективное образование в клетках *E. coli* ацил-КоА производных в результате обращения цикла β-окисления жирных кислот было показано при суперэкспрессии ключевых генов в составе плазмид [8]. Полученные нами результаты свидетельствовали о достаточности, при создании благоприятных условий, единичных хромосомных копий генов, кодирующих ферменты β-окисления жирных кислот, для эффективного биосинтеза бутирил-КоА в клетках *E. coli*.

Тем не менее количества 1-бутанола, синтезированные штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 оставались низкими и не сравнимыми с количествами продуцируемого штаммами этанола. Причиной этому служило то, что ацетил-КоА является для алкоголь/альдегид дегидрогеназы AdhE гораздо более предпочтительным субстратом, нежели бутирил-КоА [2]. Однако алкоголь или альдегид-дегидрогеназную активность в клетках *E. coli* могут проявлять также и другие ферменты, такие, как, например, AdhP (КФ 1.1.1.1), YqhD (КФ 1.1.1.-), MhpF (КФ 1.2.1.10) и др. В норме активность данных ферментов в клетках не проявляется, но может активироваться в рекомбинантных штаммах. Так, в частности, остаточный биосинтез штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 уксусной и молочной кислот с учетом инактивации основных путей их биосинтеза был обусловлен, по всей видимости, активацией действия альтернативных ферментов, таких, как ацил-КоА тиоэстераза YciA (КФ 3.1.2.20), ацетальдегиддегидрогеназа MhpF (КФ 1.2.1.10), альдегиддегидрогеназа AldB (КФ 1.2.1.4) и лактальдегид дегидрогеназа AldA (КФ 1.2.1.22). Таким образом, алкоголь/альдегид дегидрогеназа AdhE была инактивированна в клетках рекомбинантных штаммов.

Однако в результате такой модификации анаэробная утилизация глюкозы полученными штаммами MG Δ4 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ4 резко снизилась. Можно было предположить, что фоновой активности альтернативных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ было недостаточно для эффективного биосинтеза спиртов, о чем свидетельствовало отсутствие в средах культивирования штаммов 1-бутанола и присутствие лишь незначительных количеств этанола. В результате сниженная интенсивность реокисления гликолитического НАДН в клетках рекомбинантных штаммов ограничивала их способность к анаэробному потреблению глюкозы. Очевидно, что для обеспечения в клетках модифицированных штаммов повышенной активности целевых алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ требуется направленное изменение в хромосоме регуляторных областей кодирующих их генов.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что формирование в клетках *E. coli* бутирил-КоА в результате обращенного действия собственных ферментов пути β-окисления жирных кислот может быть, как минимум, не менее эффективным, чем катализируемое гетерологичным ферментативным комплексом кластридий. При этом для эффективного биосинтеза данного метаболита не требуется суперэкспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты, в составе плазмид. Данные, полученные в ходе характеристики рекомбинантных штаммов, позволили заключить, что для конструирования на основе модельного штамма ВОХ-3 Δ4 эффективного продуцента 1-бутанола необходимо обеспечить в клетках штамма повышенную интенсивность образования ацетил-КоА и достаточную активность специфичных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ, катализирующих терминальные стадии восстановления бутирил-КоА в целевой продукт.

Авторы выражают благодарность сотруднице ГосНИИгенетика Березиной О.В. за предоставленные препараты плазмид pHyc и pHyc-*thl-bcs*.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ФГУП “ГосНИИгенетика” при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 10-04-00766-а и 11-04-91184-ГФЕН_а) и Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.552.11.7029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dürre P. // Biotechnol. J. 2007. V. 2. № 12. P. 1525–1534.
2. Atsumi S., Cann A.F., Connor M.R., Shen C.R., Smith K.M., Brynildsen M.P., Chou K.J., Hanai T., Liao J.C. // Metab. Eng. 2008. V. 10. № 6. P. 305–311.
3. Inui M., Suda M., Kimura S., Yasuda K., Suzuki H., Toda H., Yamamoto S., Okino S., Suzuki N., Yukawa H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 77. № 6. P. 1305–1316.

4. Nielsen D.R., Leonard E., Yoon S.H., Tseng H.C., Yuan C., Prather K.L. // *Metab. Eng.* 2009. V. 11. № 4–5. P. 262–273.
5. Steen E.J., Chan R., Prasad N., Myers S., Petzold C.J., Redding A., Ouellet M., Keasling J.D. // *Microb. Cell. Fact.* 2008. doi:10.1186/1475-2859-7-36.
6. Berezina O.V., Zakharova N.V., Brandt A., Yarotsky S.V., Schwarz W.H., Zverlov V.V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. № 2. P. 635–646.
7. Серегина Т.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г., Мионов А.С. // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 24–35.
8. Dellomonaco C., Clomburg J.M., Miller E.N., Gonzalez R. // *Nature.* 2011. V. 476. № 7360. P. 355–359.
9. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // *Biotechnol. Lett.* 2011. doi: 10.1007/s10529-011-0797-z.
10. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2nd Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
11. Datsenko K.A., Wanner B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
12. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // *Мол. биология.* 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
13. 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. // *Мол. биология.* 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
14. Iijima K., Suzuki K., Ozaki K., Yamashita H. // *J. Appl. Microbiol.* 2006. V. 100. № 6. P. 1282–1288.
15. Shen C.R., Lan E.I., Dekishima Y., Baez A., Cho K.M., Liao J.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 9. P. 2905–2915.

1-Butanol Synthesis by *Escherichia coli* Cells Through Butyryl-CoA Formation by Heterologous Enzymes of Clostridia and Native Enzymes of Fatty Acid β -Oxidation

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

*All-Russia Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia*

e-mail: gulevich@genetika.ru

Received December 8, 2011

Abstract—Anaerobic biosynthesis of 1-butanol from glucose is investigated in recombinant *Escherichia coli* strains which form butyryl-CoA using the heterologous enzyme complex of clostridia or as a result of a reversal in the action of native enzymes of the fatty acid β -oxidation pathway. It was revealed that when the basic pathways of acetic and lactic acid formation are inactivated due to deletions in the *ackA*, *pta*, *poxB*, and *ldhA* genes, the efficiency of butyryl-CoA biosynthesis and its reduced product, i.e., 1-butanol, by two types of recombinant strains is comparable. The limiting factor for 1-butanol production by the obtained strains is the low substrate specificity of the basic CoA-dependent alcohol/aldehyde AdhE dehydrogenase from *E. coli* to butyryl-CoA. It was concluded that, in order to construct an efficient 1-butanol producer based on a model strain synthesizing butyryl-CoA as a result of a reversal in fatty acid β -oxidation enzymes, it is necessary to provide intensive formation of acetyl-CoA and enhanced activity of alternative alcohol and aldehyde dehydrogenases in the cells of a strain.