

УДК 577.121

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ *Escherichia coli*, ДЕФИЦИТНЫЕ ПО ПУТЯМ СМЕШАННОКИСЛОТНОГО БРОЖЕНИЯ, СПОСОБНЫЕ К БЫСТРОМУ АЭРОБНОМУ РОСТУ НА ГЛЮКОЗЕ ПРИ СНИЖЕННОМ ЭФФЕКТЕ КРЭБТРИ

© 2013 г. А. А. Моржакова, А. Ю. Скороходова, А. Ю. Гулевич, В. Г. Дебабов

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

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Поступила в редакцию 16.07.2012 г.

Сконструированы и охарактеризованы штаммы *Escherichia coli*, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения, способные к быстрому аэробному росту на глюкозе, не сопряженному с выраженным бактериальным эффектом Крэбтри. Основные пути образования уксусной и молочной кислот, а также этанола, были инактивированы в штаммах за счет делеций генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*. Фосфоенолпируватзависимая фосфотрансферазная система транспорта и фосфорилирования глюкозы была инактивирована в штаммах в результате делеции гена *ptsG*. Возможность альтернативного транспорта и фосфорилирования углеводного субстрата была обеспечена за счет конститутивной экспрессии в клетках рекомбинантов генов *galP* и *glk*, кодирующих низкоаффинный  $H^+$ -симпортер D-галактозы и глюкокиназу соответственно. Полученные штаммы SGM1.0 $\Delta$ ptsG P<sub>lac</sub>galP и SGM1.0 $\Delta$ ptsG P<sub>L</sub>glk P<sub>lac</sub>galP при культивировании в минимальной среде, содержащей 2.0 и 10.0 г/л глюкозы, демонстрировали способность к быстрому аэробному росту, сопровождающемуся секрецией лишь незначительных количеств уксусной и следовых количеств пировиноградной кислот.

DOI: 10.7868/S0555109913020116

Благодаря хорошо изученному метаболизму и доступному генно-инженерному инструментарию бактерии вида *Escherichia coli* традиционно используются в качестве базового микроорганизма для создания штаммов-продуцентов различных биологически активных и промышленно значимых веществ. Дополнительным преимуществом этих бактерий является способность к эффективному и быстрому росту даже в минимальных солевых средах, содержащих дешевые источники углерода. Так, в частности, глюкоза, один из наиболее предпочтительных для клеток *E. coli* субстратов, благодаря своей дешевизне может быть эффективно использована как для накопления биомассы рекомбинантных штаммов-продуцентов, так и для последующей продукции целевых веществ.

Общим принципом конструирования рекомбинантных штаммов-продуцентов промышленно значимых соединений является инактивация путей конкурентной утилизации ключевых метаболитов предшественников, участвующих в биосинтезе целевого вещества. Среди интермедиатов центрального метаболизма, являющихся предшественниками в синтезе целого ряда высокоценных веществ, особый интерес представляет сохранение для участия в целевых биосинтетических реакциях пировиноградной кислоты и ацетил-КоА.

С целью сбережения данных метаболитов, в первую очередь, инактивируют основные пути их нецелевого расходования клетками, сопровождающегося, в общем случае, экскрецией в среду органических кислот и этанола. Значительную часть этих путей представляют собой реакции, участвующие в процессе смешаннокислотного брожения. Так, основные побочные пути утилизации ацетил-КоА – образование из этого метаболита уксусной кислоты и этанола. Для прекращения синтеза этих веществ из ацетил-КоА, общепринятыми являются инактивация генов *ackA* и *pta*, кодирующих ацетаткиназу (КФ 2.7.2.1) и фосфотрансацетилазу (КФ 2.3.1.8), а также гена *adhE*, кодирующего, соответственно, бифункциональную алкоголь-, альдегиддегидрогеназу (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3) [1]. В случае пировиноградной кислоты инактивируют гены *ldhA* и *poxB*, кодирующие лактатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.28) и пируватоксидазу (КФ 1.2.5.1), участвующие в превращении исходного метаболита, соответственно, в молочную и уксусную кислоты [1].

Известно, что в результате таких модификаций скорость роста на глюкозе полученных рекомбинантных штаммов снижается. Так, в частности, в случае инактивации генов *pta* и/или *ackA* снижение скорости роста соответствующих штаммов обусловлено невозможностью генерации до-

полнительной молекулы АТФ при синтезе уксусной кислоты [2–4]. Вместе с тем, быстрое накопление биомассы рекомбинантного штамма и последующий синтез целевого вещества значительной массой клеток, находящихся в стационарной фазе, технологически более выгоден, значительно повышая продуктивность (г/л · ч). При этом быстрый аэробный рост клеток *E. coli* дикого типа в средах с глюкозой обусловлен именно формированием дополнительной молекулы АТФ в ходе образования из ацетил-КоА уксусной кислоты и сопровождается значительным выделением клетками данного вещества. Последний феномен получил название “бактериального эффекта Крэбтри” [5] или же “эффекта избыточного метаболизма”. Этот эффект возникает из-за дисбаланса между интенсивностью гликолиза и скоростью оборачиваемости цикла трикарбоновых кислот и сопровождается экскрецией “лишней” неметаболизированной глюкозы в виде производных тех или иных терминальных интермедиатов гликолиза. Таким образом, следствием эффекта избыточного метаболизма при выращивании клеток рекомбинантных штаммов-продуцентов в средах с глюкозой является накопление в культуральной жидкости побочных веществ, затрудняющее дальнейшую очистку и выделение целевого продукта. Так, при инактивации в рекомбинантных штаммах основных путей биосинтеза уксусной кислоты за счет делеций генов *ackA*, *pta* и *poxB* эффект Крэбтри проявляется в накоплении в средах культивирования пировиноградной и молочной кислот [4]. Дополнительная инактивация в клетках рекомбинантов гена *ldhA*, отвечающего за образование молочной кислоты, приводит к доминантной экскреции пировиноградной кислоты [6]. Накопление значительных количеств пировиноградной кислоты в последнем случае является результатом действия фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферазной системы транспорта сахаров (ФСТ). Активная ФСТ, при транспорте глюкозы в клетку, эффективно превращает в пировиноградную кислоту фосфоенолпируват (ФЭП), выступающий донором фосфатной группы при фосфорилировании глюкозы. Инактивация ФСТ сахаров в клетках *E. coli* дикого типа снижает эффективность потребления глюкозы, интенсивность гликолиза и приводит к отмене “бактериального эффекта Крэбтри” [6, 7], предотвращая, тем самым, накопление в средах культивирования побочных продуктов. Вместе с тем, однако, инактивация ФСТ значительно снижает скорость роста клеток в средах, содержащих глюкозу [7].

Ранее была продемонстрирована возможность мутантных PTS<sup>-</sup> штаммов *E. coli* к эффективному росту на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода [8, 9]. Анализ мутантов показал, что некоторые из них

обладали повышенным уровнем экспрессии гена *galP*. Известно, что GalP является низкоаффинным Н<sup>+</sup>-симпортером D-галактозы, способным, в частности, к транспорту глюкозы [10]. Глюкоза, поступающая в клетки штаммов с инактивированной ФСТ по механизму углевод/Н<sup>+</sup>-симпорта, должна быть фосфорилирована для дальнейшего участия в метаболизме. Такое фосфорилирование в клетках *E. coli* осуществляется глюкокиназой Glk [11, 12], использующей в качестве источника фосфата АТФ, а не ФЭП. Вместе с тем восстановление за счет экспрессии генов *galP* и *glk* ростовых параметров PTS<sup>-</sup> штаммов *E. coli* в минимальных средах, содержащих глюкозу в качестве единственного источника углерода, сопровождается интенсификацией бактериального эффекта Крэбтри. Так, показатели секреции уксусной кислоты PTS<sup>-</sup> GalP+ Glk+ производными штамма *E. coli* W3110 при росте в минимальной среде с глюкозой двукратно превышают показатели, демонстрируемые в аналогичных условиях родительским штаммом [8].

На сегодняшний день нет сведений о выраженности эффекта Крэбтри и его проявлениях при росте на глюкозе рекомбинантных штаммов *E. coli* с инактивированными путями нецелевого расхода пировиноградной кислоты и ацетил-КоА и содержащими альтернативную ФСТ систему транспорта и фосфорилирования глюкозы (GalP, Glk).

Цель работы – получение и характеристика рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, дефицитных по путям смешаннокислотного брожения, способных к быстрому росту на глюкозе в аэробных условиях на фоне сниженного эффекта Крэбтри.

## МЕТОДИКА

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл.1. Бактерии культивировали аэробно при 37°C на качалке при 250 об/мин в богатых средах LB, SOB, SOC и минимальной среде M9 [13], содержащей 2.0 или 10.0 г/л глюкозы, при необходимости с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

**Реагенты.** Использовали препараты рестриктаз и T4 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 электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit “Qiagen” (США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Таблица 1.** Используемые в работе штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
SGM0.1	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$	[16]
SGM1.0	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$	Данная работа
SGM1.0 $\Delta ptsG$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$	»
SGM1.0 $\Delta ptsG$ P <sub>tac</sub> galP	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , P <sub>tac</sub> galP	»
SGM1.0 $\Delta ptsG$ P <sub>L</sub> glk	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , P <sub>L</sub> glk	»
SGM1.0 $\Delta ptsG$ P <sub>L</sub> glk P <sub>tac</sub> galP	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$ , $\Delta proxB$ , $\Delta ldhA$ , $\Delta adhE$ , $\Delta ptsG$ , P <sub>L</sub> glk, P <sub>tac</sub> galP	»
Плаزمида		
pMW118-( $\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$ )	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , $\lambda attL$ - <i>cat</i> - $\lambda attR$ cassette	[15]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P <sub>araB</sub> - $\lambda gam$ - <i>bet-exo</i>	[14]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P <sub>R</sub> - $\lambda xis$ - <i>int</i> , <i>cIts857</i>	[17]
pDR540	pBR322, <i>bla</i> , <i>galK</i> , P <sub>tac</sub>	GenBank U13847

**Таблица 2.** Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность
P1	5'-tatggctgtactaatgctgctgaacttaacgcactcgctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttaagcggatttttctgctttttctcagcttttagctgaagcctgcttttttataactaagttgg-3'
P3	5'-cagtgagtgtagcgcgag-3'
P4	5'-gaagccgttatagtgccctcag-3'
P5	5'-tatgtttaagaatgcatttgctaactgcaaaaggctcgctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-ttagtggttacggatgactcatcctcctcggttttgaagcctgcttttttataactaagttgg-3'
P7	5'-ccatactcaggagcactctc-3'
P8	5'-catctggctgccttagtctc-3'
P9	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgcc-3'
P10	5'-cattctcaactgctccgctaaagtcaaaataattcttacggccaatgcttctgttc-3'
P11	5'-ttgccagctgcaaaaaggcatcgctgcaattggcgcctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P12	5'-ctagtaagatctgaagcctgcttttttataactaagttgg-3'
P13	5'-ttctattccttatcgggggtc-3'
P14	5'-cccacatcaccgactaatgc-3'
P15	5'-gaccatagatctccctgttgacaattaatcatcggctcgatataatg-3'
P16	5'-tttttagcgtcaggcatgatgccctccaataggtcgctcacaattccacacattatac-3'
P17	5'-agttgttacattctttcagtaaaagtcttaattgccgctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P18	5'-gattacaccaaccacaacagac-3'
P19	5'-cgtcattgcctgtttgaccg-3'

**Конструирование штаммов.** Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [14]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *adhE* и *ptsG*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1, P2 и P5, P6 и плазмиды pMW118-( $\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$ ) [15] в качестве матрицы.

Полученные фрагменты ДНК были по отдельности интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *adhE* и *ptsG*, подтверждали ПЦР анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P3, P4; P7, P8 соответственно.

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *glk* осуществлялось в несколько стадий. На первом этапе с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда был получен фрагмент ДНК, содержащий в начале участок узнавания *Bgl*II, промотор  $P_L$ , и 36 нуклеотидов, комплементарных области предшествующей кодирующей части гена *glk*. ПЦР проводили с использованием праймеров P9 и P10. На втором этапе фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер  $Cm^R$  и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, расположенному на 35 нуклеотидов ранее кодирующей области гена *glk*, был получен при помощи ПЦР с использованием праймеров P11 и P12 и плазмиды pMW118-( $\lambda attL$ - $Cm$ - $\lambda attR$ ). Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой [13]. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P10 и P11. Полученный ПЦР-продукт был использован для интеграции в хромосому. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *glk*, было подтверждено в полученных клонах секвенированием с помощью праймеров P13 и P14.

Аналогичным образом нативный промотор гена *galP* был заменен укороченным вариантом промотора  $P_{tac}$ , обеспечивающим конститутивную транскрипцию в  $LacI^+$  штаммах *E. coli*. Использовали праймеры P15, P16, P17, P12 и плазмиды pDR540 и pMW118-( $\lambda attL$ - $Cm$ - $\lambda attR$ ) в качестве матриц. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *galP*, было подтверждено в полученных клонах секвенированием с помощью праймеров P18 и P19.

Штаммы SGM1.0, SGM1.0 $\Delta$ ptsG, SGM1.0 $\Delta$ ptsG  $P_{tac}galP$ , SGM1.0 $\Delta$ ptsG  $P_Lglk$  и SGM1.0 $\Delta$ ptsG  $P_Lglk$   $P_{tac}galP$  были получены серией P1-зависимых трансдукций соответствующих модификаций в ранее сконструированный штамм SGM0.1 [16]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами (*attachment*) фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [17].

**Определение скорости роста.** Клетки штаммов выращивали в течение ночи при 37°C в среде M9, содержащей 2.0 г/л глюкозы. В свежую среду M9, содержащую 2.0 или 10.0 г/л глюкозы, добавляли необходимое количество ночной культуры до  $OP_{600} \approx 0.04$ . Культуры выращивали при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин 9 ч. Оптическую плотность растущей культуры измеряли через 3, 5, 7, 9 ч при длине волны 600 нм. Скорость

роста определяли по графику изменения оптической плотности культур от времени. Логарифмические части кривых роста аппроксимировали уравнением  $OP = A \exp(\mu T)$ .

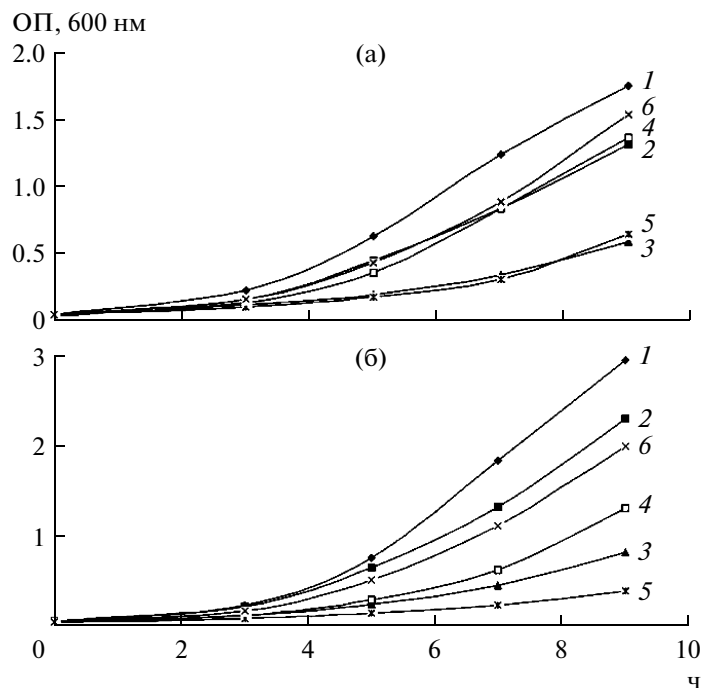
**Аналитические методы.** Концентрацию органических кислот и остаточной глюкозы в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ с использованием системы HPLC "Waters" (США). Для измерения концентраций органических кислот использовали колонку ReproSil-Pur C18-AQ "Dr. Maisch" (Германия) с детекцией при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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было исследовано влияние альтернативной ФСТ системы транспорта и фосфорилирования глюкозы (*GalP*, *Glk*) на характеристики аэробного роста рекомбинантных штаммов *E. coli*, дефицитных по путям смешаннокислотного брожения, в минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода.

Инактивация основных путей образования уксусной, молочной кислоты, этанола, а также ФСТ сахаров в штаммах была осуществлена в результате делеций генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA*, *adhE* и *ptsG* соответственно. Альтернативный транспорт глюкозы в клетки штаммов был обеспечен за счет конститутивной экспрессии генов *galP* и *glk* при замене в хромосоме регуляторных областей соответствующих генов необходимыми по силе промоторами. Для транскрипции гена *glk* был использован "сильный" промотор  $P_L$ , в силу того, что эффективность роста клеток с инактивированной ФСТ системой на глюкозе повышается при увеличении активности глюкокиназы [12]. Для транскрипции гена *galP* был выбран более "слабый" промотор  $P_{tac}$ , поскольку сверхпродукция мембранных белков, в частности транспортеров сахаров, сопряжена с токсичным эффектом [18]. Модификации  $P_{tac}galP$  и  $P_Lglk$  были внесены в штамм SGM1.0 $\Delta$ ptsG с помощью P1-зависимой трансдукции раздельно или совместно.

Для определения скорости роста штаммов *E. coli* MG1655, SGM1.0, SGM1.0 $\Delta$ ptsG, SGM1.0 $\Delta$ ptsG  $P_{tac}galP$ , SGM1.0 $\Delta$ ptsG  $P_Lglk$ , SGM1.0 $\Delta$ ptsG  $P_Lglk$   $P_{tac}galP$  при аэробной утилизации глюкозы, как единственного источника углерода, соответствующие культуры выращивали в минимальной соле-



Кривые роста исследуемых штаммов при выращивании в минимальной среде M9, содержащей 2.0 (а) и 10.0 (б) г/л глюкозы.

1 – MG1655, 2 – SGM1.0, 3 – SGM1.0ΔptsG, 4 – SGM1.0ΔptsG P<sub>tacgalP</sub>, 5 – SGM1.0ΔptsG P<sub>Lglk</sub>, 6 – SGM1.0ΔptsG P<sub>Lglk</sub> P<sub>tacgalP</sub>.

вой среде M9, содержащей углеводный субстрат в количестве 2.0 или 10.0 г/л. Типичные кривые роста клеток представлены на рисунке, значения скорости роста – в табл. 3.

Скорость роста штамма SGM1.0, в котором инактивированы пути образования уксусной, молочной кислоты и этанола, составляла 90% скорости роста штамма *E. coli* дикого типа MG1655 независимо от использованной концентрации глюкозы в среде. В то же время клетки штамма SGM1.0ΔptsG, лишённые ФСТ и в результате неспособные быстро усваивать глюкозу, демонстрировали скорость роста, составляющую 60% от скорости роста штамма MG1655. Полученный ре-

зультат согласуется с известными данными литературы, описывающими скорости роста ΔptsG производных штаммов *E. coli* дикого типа на минимальных солевых средах с 2.0 г/л глюкозы, составляющими от 66 [19] до 84% [20] от показателей родительских штаммов. Относительно более выраженное снижение скорости роста штамма SGM1.0ΔptsG в сравнении со штаммом дикого типа MG1655 объясняется, в данном случае, вкладом в общее снижение ростовых характеристик рекомбинантного штамма инактивацией путей смешаннокислотного брожения.

В минимальной среде, содержащей 2.0 г/л глюкозы, скорость роста штаммов SGM1.0ΔptsG P<sub>tacgalP</sub> и SGM1.0 была практически одинакова – 0.44 и 0.43 ч<sup>-1</sup> соответственно. Данный факт позволял судить о том, что при малых концентрациях глюкозы для восстановления скорости роста рекомбинантных штаммов с инактивированной ФСТ достаточно обеспечения возможности альтернативного транспорта субстрата за счет активации экспрессии гена *galP* путем замены его природной регуляторной области на относительно “слабый” *tac* промотор. С другой стороны, индивидуальное обеспечение конститутивной экспрессии гена *glk*, при использовании даже “сильного” P<sub>L</sub> промотора, не способствовало повышению скорости роста штамма SGM1.0ΔptsG. Известно, что глюкокиназа, кодируемая геном *glk*, способна

**Таблица 3.** Скорость роста штаммов в минимальной среде M9 с глюкозой

Штамм	μ, ч <sup>-1</sup>	
	2.0 г/л	10.0 г/л
MG1655	0.49	0.55
SGM1.0	0.43	0.49
SGM1.0ΔptsG	0.30	0.33
SGM1.0ΔptsG P <sub>tacgalP</sub>	0.44	0.40
SGM1.0ΔptsG P <sub>Lglk</sub>	0.30	0.26
SGM1.0ΔptsG P <sub>Lglk</sub> P <sub>tacgalP</sub>	0.44	0.48

**Таблица 4.** Концентрация метаболитов, секретируемых исследуемыми штаммами при аэробном выращивании в минимальной среде М9, содержащей 2.0 г/л (11.1 мМ) глюкозы

Штамм	Уксусная кислота, мМ			Пировиноградная кислота, мМ		
	5 ч	7 ч	9 ч	5 ч	7 ч	9 ч
MG1655	5.1	6.7	11.2	0	0	0
SGM1.0	0	3.8	4.8	0.2	2.6	7.4
SGM1.0ΔptsG	0	0	0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P <sub>tac</sub> galP	0	3.5	4.1	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P <sub>L</sub> glk	0	0	0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P <sub>L</sub> glk P <sub>tac</sub> galP	0	4.0	4.2	0	0.1	0.4

**Таблица 5.** Концентрация метаболитов, секретируемых исследуемыми штаммами, при аэробном выращивании в минимальной среде М9, содержащей 10.0 г/л (55.5 мМ) глюкозы

Штамм	Уксусная кислота, мМ			Пировиноградная кислота, мМ		
	5 ч	7 ч	9 ч	5 ч	7 ч	9 ч
MG1655	5.7	9.8	15.3	0	0	0
SGM1.0	3.3	4.5	5.7	1.6	5.3	14.0
SGM1.0ΔptsG	0	0	3.5	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P <sub>tac</sub> galP	0	0	4.0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P <sub>L</sub> glk	0	0	0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P <sub>L</sub> glk P <sub>tac</sub> galP	0	3.8	4.2	0	0	0.6

катализировать фосфорилирование глюкозы лишь при наличии субстрата в клетке, тогда как в случае штамма SGM1.0ΔptsG P<sub>L</sub>glk транспорт данного моносахарида из среды оставался лимитированным. Действительно, совместная экспрессия генов *glk* и *galP* в штамме SGM1.0ΔptsG P<sub>L</sub>glk P<sub>tac</sub>galP привела к полному восстановлению роста по отношению к штамму SGM1.0. Можно было предположить, что в случае штамма SGM1.0ΔptsG P<sub>tac</sub>galP практически полное восстановление скорости роста в сравнении с родительским штаммом обеспечивалось базальной активностью глюкокиназы, достаточной для фосфорилирования глюкозы транспортируемой в клетку низкоаффинным H<sup>+</sup>-симпортером из среды с невысоким содержанием субстрата.

Так же, как и при концентрации глюкозы в среде 2.0 г/л, усиления экспрессии лишь гена *glk* было недостаточно для увеличения скорости роста культуры штамма SGM1.0ΔptsG и в среде, содержащей 10.0 г/л глюкозы. Менее эффективным в отношении восстановления роста штамма SGM1.0ΔptsG при концентрации глюкозы 10.0 г/л оказалось и индивидуальное усиление экспрессии гена *galP*, скорость роста штамма SGM1.0ΔptsG P<sub>tac</sub>galP в данных условиях составила лишь 80% от скорости роста штамма SGM1.0. Интересно отметить, что в случае инактивации в штаммах *E. coli* дикого типа ФСТ за счет делеции генов *ptsHI-crr*

оперона, конститутивная экспрессия гена *galP* со сравнимых по силе с P<sub>tac</sub> промоторов обеспечивала восстановление скорости роста мутантных штаммов относительно предков дикого типа до ~89% при содержании глюкозы в среде 2.0 г/л [8], и до ~60% при концентрации глюкозы 5.0 г/л [12]. Для полноценного восстановления ростовых характеристик таких PTS<sup>-</sup> штаммов требовалась обязательная совместная экспрессия в них генов *galP* и *glk*. При культивировании штамма SGM1.0ΔptsG в среде, содержащей 10.0 г/л глюкозы, восстановление скорости роста до значения, характерного для штамма SGM1.0, было достигнуто также при обеспечении конститутивной экспрессии в штамме как гена *galP*, так и гена *glk*.

Исследование эффекта Крэбтри у штамма MG1655 и его сконструированных производных, дефицитных по путям смешаннокислотного брожения, проводили, анализируя спектры и концентрации метаболитов, секретируемых штаммами при аэробном росте в минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода. Концентрации метаболитов, секретируемых исследуемыми штаммами при аэробном выращивании в минимальной среде М9, содержащей 2.0 и 10.0 г/л глюкозы, представлены в табл. 4 и табл. 5.

При выращивании на глюкозе штамма *E. coli* дикого типа MG1655 эффект Крэбтри выражался классическим накоплением в средах культивирования значительных количеств уксусной кислоты. У штамма SGM1.0 с инактивированными основными путями биосинтеза уксусной кислоты, молочной кислоты и этанола, доминантным продуктом, секретиремым в среду с течением времени, становилась пировиноградная кислота, что согласуется с известными данными литературы [6]. Остаточная секреция штаммом SGM1.0 и некоторыми его производными 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) [21], ацетальдегиддегидрогеназа MhpF (КФ 1.2.1.10) [22] и альдегид-дегидрогеназа AldB (КФ 1.2.1.4) [23].

Инактивация ФСТ сахаров, снижающая эффективность потребления глюкозы, приводила к полной отмене эффекта Крэбтри при выращивании штамма SGM1.0ΔptsG в среде, содержащей 2.0 г/л глюкозы. В случае культивирования штамма при повышенной концентрации глюкозы (10.0 г/л) отмечалось некоторое накопление в среде уксусной кислоты на поздней стадии роста культуры. Данный факт может быть обусловлен относительно более высокой скоростью роста штамма в среде, содержащей повышенную концентрацию субстрата, и связан с эффектом увеличения объемной скорости потребления глюкозы частично возросшей клеточной массой. Аналогичными причинами может быть обусловлено и более раннее накопление уксусной кислоты в среде культивирования штамма SGM1.0ΔptsG P<sub>tac</sub>galP при концентрации глюкозы 2.0 г/л, способствующей несколько более быстрому росту штамма. Вместе с тем PTS<sup>-</sup> штамм SGM1.0ΔptsG P<sub>tac</sub>galP при скоростях роста, сравнимых со скоростями роста PTS<sup>+</sup> штамма SGM1.0, в отличие от родительского штамма, не секретировал в ходе роста в среду культивирования пировиноградную кислоту, а количество уксусной кислоты, накопленной штаммом, было невелико ~0.2 г/л. Данный факт свидетельствовал о значительном снижении эффекта Крэбтри при относительно быстром росте штамма SGM1.0ΔptsG P<sub>tac</sub>galP в минимальной среде, содержащей как низкие (2.0 г/л), так и высокие (10.0 г/л) концентрации глюкозы.

Штамм SGM1.0ΔptsG P<sub>Lglk</sub> P<sub>tac</sub>galP, при выращивании в минимальных средах с 2.0 или 10.0 г/л глюкозы, также демонстрировал значительное снижение проявления эффекта Крэбтри, поскольку секретировал в среду незначительные количества уксусной (~0.2 г/л) и лишь следовые (~0.05 г/л) количества пировиноградной кислоты. При этом характеристики роста штамма SGM1.0ΔptsG P<sub>Lglk</sub>

P<sub>tac</sub>galP полностью соответствовали таковым родительского штамма SGM1.0.

Таким образом, за счет инактивации фосфоенолпируватзависимой системы транспорта сахаров и обеспечения возможности альтернативного транспорта и фосфорилирования субстрата, сконструированы и охарактеризованы штаммы *E. coli* SGM1.0ΔptsG P<sub>tac</sub>galP и SGM1.0ΔptsG P<sub>Lglk</sub> P<sub>tac</sub>galP, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения и способные к быстрому аэробному росту на глюкозе со сниженными проявлениями бактериального эффекта Крэбтри.

Благодаря своим характеристикам полученные штаммы могут служить базовой платформой для создания эффективных продуцентов, осуществляющих биосинтез целевого вещества в стационарной фазе в среде, не содержащей значительных количеств побочных продуктов, образованных на стадии выращивания биомассы.

Авторы выражают благодарность сотруднице ГосНИИгенетика Антоновой С.В. за проведение хроматографических анализов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2037) с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГУП “ГосНИИгенетика” (ГК № 16.552.11.7029).”

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kern A., Tilley E., Hunter I.S., Legisa M., Glieder A. // J. Biotechnol. 2007. V. 129. № 1. P. 6–29.
2. Chang D.E., Shin S., Rhee J.S., Pan J.G. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 21. P. 6656–6663.
3. Dittrich C.R., Bennett G.N., San K.Y. // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. № 4. P. 1062–1067.
4. 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.
5. Veit A., Polen T., Wendisch V.F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. № 2. P. 406–421.
6. Sauer U., Eikmanns B.J. // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29. № 4. P. 765–794.
7. Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A.A., Bolívar F. // Metab. Eng. 2002. V. 4. № 2. P. 124–137.
8. Hernandez-Montalvo V., Martínez A., Hernandez-Chavez G., Bolívar F., Valle F., Gosset G. // Biotechnol. Bioeng. 2003. V. 83. № 6. P. 687–694.
9. Flores N., Flores S., Escalante A., de Anda R., Leal L., Malpica R., Georgellis D., Gosset G., Bolívar F. // Metabolic. Eng. 2005. V. 7. № 2. P. 70–87.
10. McDonald T.P., Walmsley A.R., Henderson P.J. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 24. P. 15189–15199.
11. Wang Q., Wu C., Chen T., Chen X., Zhao X. // Biotechnol. Lett. 2006. V. 28. № 2. P. 89–93.

12. Сливинская Е.А., Рыбак К.В., Каташкина Ж.И., Машко С.В., Козлов Ю.И. // Биотехнология. 2007. № 5. С. 24–37.
13. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
14. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
15. 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.
16. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. Т. 47. № 4. С. 415–423.
17. 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.
18. Drew D., Fröderberg L., Baars L., de Gier J.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1610. № 1. P. 3–10.
19. Picon A., de Mattos M.J., Postma P.W. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 4. P. 213–218.
20. Chou C.H., Bennett G.N., San K.Y. // Biotechnol. Bioeng. 1994. V. 44. № 8. P. 952–960.
21. 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.
22. Ferrández A., Garcá J.L., Díaz E. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 8. P. 2573–2581.
23. Ho K.K., Weiner H. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 3. P. 1067–1073.

## Recombinant *Escherichia coli* Strains Deficient in Mixed Acid Fermentation Pathways and Capable of Rapid Aerobic Growth on Glucose with a Reduced Crabtree Effect

A. A. Morzhakova, A. Yu. Skorokhodova, A. Yu. Gulevich, and V. G. Debabov

State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 117545 Russia

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Received July 16, 2012

**Abstract**—In this study, we constructed and characterized *Escherichia coli* strains deficient for mixed acid fermentation pathways, which are capable of rapid aerobic growth on glucose without pronounced bacterial Crabtree effect. The main pathways of production of acetic and lactic acids and ethanol in these strains were inactivated by a deletion of the *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA*, and *adhE* genes. The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of glucose transport and phosphorylation was inactivated in the strains by a deletion of the *ptsG* gene. The possibility of alternative transport and phosphorylation of the carbohydrate substrate was ensured in recombinants by constitutive expression of the *galP* and *glk* genes, which encode the low-affinity H<sup>+</sup>-symporter of *D*-galactose and glucokinase, respectively. SGM1.0Δ*ptsG* P<sub>tac</sub>*galP* and SGM1.0Δ*ptsG* P<sub>l</sub>*glk* P<sub>tac</sub>*galP* strains were capable of rapid aerobic growth in a minimal medium containing 2.0 and 10.0 g/l of glucose and secreted only small amounts of acetic acid and trace amounts of pyruvic acid.