

УДК 577.121

# ЭФФЕКТ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА БИОСИНТЕЗ АДПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ШТАММАМИ *Escherichia coli* ПО ОБРАЩЕННОМУ $\beta$ -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2024 г. А. Ю. Гулевич<sup>1</sup>, \*, А. Ю. Скороходова<sup>1</sup>, В. Г. Дебабов<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 18.09.2023 г.

После доработки 15.11.2023 г.

Принята к печати 10.12.2023 г.

С использованием в качестве базового ранее сконструированного адипат-секретирующего штамма *Escherichia coli* MG1655 *lacI*<sup>Q</sup>,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *proxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>Ф10</sub>-*atoB*, P<sub>trc-ideal-4</sub>-SD<sub>Ф10</sub>-*fadB*,  $\Delta$ *fadE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>Ф10</sub>-*tesB*,  $\Delta$ *yciA*, P<sub>trc-ideal-4</sub>-SD<sub>Ф10</sub>-*fabI*, P<sub>L</sub>-SD<sub>Ф10</sub>-*paal*,  $\Delta$ *aceBAK*,  $\Delta$ *glcB* получены штаммы-производные, способные к повышенному синтезу целевого соединения из глюкозы по обращенному пути  $\beta$ -окисления жирных кислот. Такой эффект достигнут при интенсификации в клетках цикла трикарбонных кислот. Прекращение множественных обращений цикла за счет инактивации в штамме сукцинатдегидрогеназы не оказывало выраженного влияния на формирование рекомбинантом адипиновой кислоты. При интенсификации цикла за счет усиления анаплеротического формирования шавелевоуксусной кислоты из фосфоенолпирувата, в результате повышения экспрессии нативного гена *pps*, синтез адипиновой кислоты возрастал в 1.2 раза до ~390 мкМ. Обеспечение возможности формирования шавелевоуксусной кислоты из пировиноградной, при введении в штамм активности гетерологичной пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis*, приводило к интенсификации цикла в 1.5 раз и сопровождалось ростом секреции адипиновой кислоты до ~496 мкМ. Последующая инактивация в штамме генов *sdhAB* повышала секрецию целевого соединения лишь незначительно и титр адипиновой кислоты достигал ~520 мкМ. Полученные данные указывали на прямую зависимость эффективности синтеза адипиновой кислоты сконструированными рекомбинантами от степени интенсификации в них цикла трикарбонных кислот.

**Ключевые слова:** адипиновая кислота,  $\beta$ -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, сукцинил-КоА, цикл трикарбонных кислот, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109924030033 EDN: EXDGH

Адипиновая кислота — это алифатическая дикарбоновая кислота, которая может быть удобным предшественником в последующем синтезе широкого спектра производных с высокой добавленной стоимостью, таких как смазочные материалы, пластификаторы, фармацевтические субстанции и компоненты искусственных волокон [1]. В настоящее время большая часть адипиновой кислоты производится нефтехимическим синтезом с использованием бензола в качестве предшественника [2]. Тем не менее, адипиновая кислота может быть получена из возобновляемого сырья рядом биотехнологических способов, представляющих экологически оправданную альтернативу традиционному методу.

Один из первых предложенных методов биотехнологической конверсии растительного сырья в адипиновую кислоту предполагал первичное

получение из возобновляемых источников углерода *cis*, *cis*-муконовой кислоты с последующим образованием из нее целевого продукта в результате каталитического гидрирования [3]. Возможность эффективной микробиологической конверсии глюкозы и глицерина в *cis*, *cis*-муконовую кислоту была продемонстрирована с использованием ряда направленно сконструированных штаммов *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* [4–7]. Кроме того, сообщалось об успешном формировании адипиновой кислоты из соответствующего предшественника в результате биокаталитического гидрирования [8].

Альтернативой двухстадийному методу синтеза адипиновой кислоты, включающему как биосинтетическую, так и каталитическую стадии, является прямой босинтетический способ микробиологического синтеза этого дикарбоксилата, основанный

на принципе обратимости биохимических реакций  $\beta$ -окисления, таких как реакции деградации фенилацетата или деградации жирных кислот. Формирование адипиновой кислоты из консервативных для биотехнологически значимых микроорганизмов метаболитов-предшественников, согласно данному подходу, предполагает первичную конденсацию ацетил-КоА и сукцинил-КоА, с последующим превращением 3-оксоадипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА, затем в 2,3-дидегидроадипил-КоА и, в итоге, в адипил-КоА. Гидролиз тиоэфирной связи последнего КоА-производного, ведущий к получению целевого соединения, может катализироваться тиоэстеразами, обладающими необходимой субстратной специфичностью.

Синтез адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути деградации фенилацетата был успешно продемонстрирован [9–12] при оверэкспрессии в клетках *E. coli* как нативных генов *paa*-оперона, обеспечивающих формирование 2,3-дидегидроадипил-КоА, так и вспомогательных генов гетерологичных ферментов, ответственных за конверсию 2,3-дидегидроадипил-КоА в адипил-КоА и гидролиз его тиоэфирной связи. Также, при усилении в *E. coli* экспрессии нативных генов 3-оксоацил-КоА-тиолазы (КФ 2.3.1.174), бифункциональной (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-редуктазы (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17), еноил-ацилпереносящий белок (АПБ)-редуктазы/ацил-КоА-дегидрогеназы (КФ 1.3.1.9) и тиоэстеразы II (КФ 3.1.2.20) недавно был показан синтез адипиновой кислоты из глюкозы в результате функционального обращения  $\beta$ -окисления жирных кислот (БОЖК) [13].

Эффективность протекания всей последовательности реакций обращенного  $\beta$ -окисления напрямую зависит от эффективности первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА. В данной связи, были предприняты попытки улучшения биосинтетических характеристик адипат-секретирующих рекомбинантов за счет повышения внутриклеточной доступности сукцинил-КоА.

Поскольку этот метаболит является интермедиатом цикла трикарбонных кислот (ЦТК), подходы к повышению его внутриклеточной доступности для реакций обращенного  $\beta$ -окисления включали, в первую очередь, предотвращение утилизации сформированного сукцинил-КоА в последующих реакциях цикла за счет инактивации сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1) [10] или сукцинил-КоА-синтазы (КФ 6.2.1.5) [14]. Альтернативный подход заключался в инактивации глиоксيلاتного шунта [13], расходующего непрямого предшественника сукцинил-КоА, изоцитрат, и активированного при интенсивном формировании в клетке ацетил-КоА [15]. Вместе с тем, внутриклеточная доступность сукцинил-КоА для реакций биосинтеза адипиновой кислоты может быть

повышена не только за счет “сбережения” соответствующего тиоэфира, но и в результате усиления его образования, при интенсификации ЦТК.

Цель работы – оценка влияния интенсификации ЦТК на биосинтез адипиновой кислоты рекомбинантными штаммами *E. coli*, способными к формированию целевого соединения по обращенному  $\beta$ -окислению жирных кислот.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе использовали Taq ДНК-полимеразу и дезоксинуклеозидтрифосфаты “Thermo Scientific” (Литва). Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были производства “Pan-reac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* BOX3.3  $\Delta 4$  *P<sub>trc</sub>-id-4-fabI P<sub>L</sub>-paaJ  $\Delta$ aceBAK  $\Delta$ glcB* [13], обозначенный как AdiBOX1.0, с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного  $\beta$ -окисления жирных кислот, еноил-АПБ-редуктазу, 3-оксоацил-КоА-тиолазу и тиоэстеразу II, а также лишенный путей смешанно-кислотного брожения, глиоксيلاتного шунта и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Для культивирования бактерий применяли богатую среду LB и минимальную среду M9 [16] с добавлением при необходимости ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

**Конструирование штаммов.** Целевые генетические модификации были индивидуально введены в хромосому штамма *E. coli* MG1655 с использованием Red-зависимой системы гомологичной рекомбинации фага лямбда по методу описанному ранее [17]. Производные штамма AdiBOX 1.0, несущие соответствующие генетические модификации, были получены с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае инактивации генов *sdhAB*, замены природной регуляторной области гена *pps* искусственным генетическим элементом *P<sub>L</sub>-SD<sub>ph10</sub>* и интеграции на место гена *roxB* гена *pusA* *B. subtilis* под контролем промотора *P<sub>L</sub>* фага лямбда, использовали ранее полученные препараты P1-трансдуцирующих фагов, содержащие соответствующие маркированные модификации [18–20]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [21]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды, сконструированные и использованные в работе

| Объект                                                        | Генотип                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Ссылка        |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Штамм</b>                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |
| MG1655                                                        | Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | ВКПМ          |
| AdiBOX 1.0                                                    | <i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , $\Delta$ <i>yciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>paaJ</i> , $\Delta$ <i>aceBAK</i> , $\Delta$ <i>glcB</i>                                                              | [13]          |
| AdiBOX 1.0 $\Delta$ <i>sdhAB</i>                              | <i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , $\Delta$ <i>yciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>paaJ</i> , $\Delta$ <i>aceBAK</i> , $\Delta$ <i>glcB</i> , $\Delta$ <i>sdhAB</i>                                      | Данная работа |
| AdiBOX 1.0 P <sub>L</sub> - <i>ppc</i>                        | <i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>poxB</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , $\Delta$ <i>yciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>paaJ</i> , $\Delta$ <i>aceBAK</i> , $\Delta$ <i>glcB</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>ppc</i>             | Данная работа |
| AdiBOX 1.0 P <sub>L</sub> - <i>pycA</i>                       | <i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , $\Delta$ <i>yciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>paaJ</i> , $\Delta$ <i>aceBAK</i> , $\Delta$ <i>glcB</i> , <i>poxB</i> :: P <sub>L</sub> - <i>pycA</i> <sup>Bs</sup>                         | Данная работа |
| AdiBOX 1.0 P <sub>L</sub> - <i>pycA</i> $\Delta$ <i>sdhAB</i> | <i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup> , $\Delta$ <i>ackA-pta</i> , $\Delta$ <i>ldhA</i> , $\Delta$ <i>adhE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , $\Delta$ <i>fadE</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>tesB</i> , $\Delta$ <i>yciA</i> , P <sub>trc-ideal-4</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fabI</i> , P <sub>L</sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>paaJ</i> , $\Delta$ <i>aceBAK</i> , $\Delta$ <i>glcB</i> , <i>poxB</i> :: P <sub>L</sub> - <i>pycA</i> <sup>Bs</sup> , $\Delta$ <i>sdhAB</i> | Данная работа |
| <b>Плазмида</b>                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |               |
| pMWts-Int/Xis                                                 | pSC101-ts, <i>bla</i> , P <sub>R</sub> - $\lambda$ <i>xis-int</i> , <i>cIts857</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [21]          |

**Культивирование штаммов.** Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде М9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды М9, содержащей 10 г/л глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 2.5 г/л NaHCO<sub>3</sub>. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Насыщение среды кислородом оценивали в контрольных колбах с соответствующими культурами при инкубации в присутствии резазурина. Экспрессию генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора P<sub>trc-ideal-4</sub>, индуцировали спустя 3 ч от начала инкубации, добавляя в среды культивирования изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ.

Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин и в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

**Аналитические методы.** Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы “Waters” HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (“Phenomenex”, США) с детекцией

при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором “Waters” 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 (“Waters”, США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75 : 25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Идентификацию и количественный анализ масляной и адипиновой кислот в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, как описано ранее [13]. Использовали газовый хроматограф Agilent 6890N, с автосамплером 7683B и масс-селективным детектором Agilent 5975 MSD, укомплектованный капиллярной колонкой Agilent DB-5MS (“Agilent”, США). В качестве внутренних стандартов использовали валериановую и пимелиновую кислоты. Для ионизации аналитов была использована ионизация электронами (70 eV). Масс-анализатор функционировал в режиме селективного детектирования (145 m/z и 73 m/z для масляной кислоты, 275 m/z и 172 m/z для адипиновой кислоты, 159 m/z для валериановой кислоты, 289 m/z для пимелиновой кислоты).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655 *lacI*<sup>Q</sup>,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*,

$P_{L-SD_{\phi 10-atoB}}$ ,  $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fadB}}$ ,  $\Delta fadE$ ,  $P_{L-SD_{\phi 10-tesB}}$ ,  $\Delta yciA$ ,  $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fabI}}$ ,  $P_{L-SD_{\phi 10-paaJ}}$  [13] был способен к синтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК при катализе терминальных реакций цикла еноил-АПБ-редуктазой/ацил-КоА-дегидрогеназой *FabI*, промежуточном образовании 3-гидроксиадипил-КоА и 2,3-дидегидроадипил-КоА бифункциональной (*S*)-3-гидроксацил-КоА-дегидрогеназой/еноил-КоА-редуктазой *FadB* и в результате первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА под действием 3-оксоацил-КоА-тиолазы *PaaJ*. Инактивация в штамме глиоксилатного шунта способствовала “сбережению” изоцитрата, предшественника сукцинил-КоА, и обеспечивала увеличение продукции адипиновой кислоты штаммом *E. coli* MG1655 *lacI<sup>Q</sup>*,  $\Delta ackA-pta$ ,  $\Delta proxB$ ,  $\Delta ldhA$ ,  $\Delta adhE$ ,  $P_{L-SD_{\phi 10-atoB}}$ ,  $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fadB}}$ ,  $\Delta fadE$ ,  $P_{L-SD_{\phi 10-tesB}}$ ,  $\Delta yciA$ ,  $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fabI}}$ ,  $P_{L-SD_{\phi 10-paaJ}}$ ,  $\Delta aceBAK$ ,  $\Delta glcB$  (AdiBOX 1.0) в 3.3 раза, с ~101 до ~330 мкМ, за счет повышения относительной внутриклеточной доступности соответствующего КоА-производного для целевых биосинтетических реакций. При этом, значимая секреция штаммом AdiBOX 1.0 уксусной кислоты (табл. 2) свидетельствовала об избыточной генерации в клетках рекомбинанта ацетил-КоА и формировании сукцинил-КоА в количествах, недостаточных для эффективного и полного вовлечения этих тиоэфиров в реакции обращенного БОЖК. Сукцинил-КоА, являясь интермедиатом ЦТК, как формируется, так и потребляется в реакциях соответствующего цикла. Поэтому его сниженная внутриклеточная доступность для конденсации с ацетил-КоА могла быть связана как с пониженной интенсивностью его образования из 2-кетоглутарата под действием 2-кетоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.1.105), так и с его интенсивной конверсией в янтарную кислоту сукцинил-КоА синтетазой. Для оценки эффективности формирования сукцинил-КоА в реакциях ЦТК, гены *sdhAB*, кодирующие компоненты сукцинатдегидрогеназного ферментативного комплекса, были инактивированы в штамме AdiBOX 1.0. Количество янтарной кислоты, секретированное соответствующим рекомбинантом в ходе потребления глюкозы, могло служить индикатором максимального уровня формирования в штамме сукцинил-КоА, являющегося прямым предшественником этого легко детектируемого дикарбоксилата. При утилизации углеродного субстрата, штамм AdiBOX 1.0  $\Delta sdhAB$  синтезировал янтарную кислоту в количествах, возросших в ~3 раза по сравнению с родительским штаммом, тогда как секреция адипиновой кислоты повышалась лишь незначительно (на ~5%), в первую очередь, по-видимому, за счет некоторого снижения продукции рекомбинантом уксусной кислоты (табл. 2). Приращение в уровне секретированной штаммом янтарной кислоты в 2.2 мМ указывало, в первую очередь, на то

количество углерода, которое вовлекалось в родительском штамме в повторные раунды оксидативного ЦТК с формированием  $CO_2$  в качестве конечного продукта. В результате, эффект прекращения полноценного функционирования цикла вследствие инактивации в штамме сукцинатдегидрогеназы был, таким образом, незначительным и не оказывал существенного влияния на формирование рекомбинантом основных секретированных метаболитов. Более того, полученные данные свидетельствовали о том, что лишь ~7% потребленной штаммом глюкозы вовлекалось в реакции ЦТК и уровень формирования рекомбинантом сукцинил-КоА мог достигать максимум 3.1 мМ.

Основными метаболитами, секретированными штаммами AdiBOX 1.0 и AdiBOX 1.0  $\Delta sdhAB$ , являлись пировиноградная и уксусная кислоты. При этом, соответствующие рекомбинанты конвертировали более половины потребленного углеродного субстрата в пировиноградную кислоту с выходом, составляющим около 55%, тогда как выход секретированной штаммами уксусной кислоты был существенно ниже (табл. 2). Это, с учетом полученных данных о секреции штаммом AdiBOX 1.0 *sdhAB* янтарной кислоты, указывало на то, что гликолитические предшественники не эффективно вовлекались в ЦТК, в первую очередь, по-видимому, в силу дефицита в клетках рекомбинантов щавелевоуксусной кислоты (ЩУК), образующейся при карбоксилировании трехуглеродных продуктов гликолиза. Таким образом, повышение внутриклеточной доступности сукцинил-КоА для инициации биосинтеза адипиновой кислоты по обращенному БОЖК требовало интенсификации ЦТК. Согласно полученным результатам, соответствующая интенсификация могла быть обеспечена в результате повышения в штаммах активности ферментов, ответственных за формирование ЩУК из трехуглеродных субстратов. В *E. coli* анаплеротическое образование ЩУК происходит под действием карбоксилирующей фосфоенолпируват фосфоенолпируваткарбоксилазы *Ppc* (КФ 4.1.1.31). Для повышения внутриклеточной доступности ЩУК для ее конденсации с ацетил-КоА и, соответственно, интенсификации ЦТК, экспрессия гена *ppc* в штамме AdiBOX 1.0 была усилена.

В результате внесения данной модификации, продукция пировиноградной кислоты соответствующим производным штаммом AdiBOX 1.0  $P_{L-ppc}$  снижалась более чем вдвое, с 22.3 мМ до 10.2 мМ, тогда как секреция адипиновой кислоты возрастала в ~1.2 раза, с ~330 мкМ до ~390 мкМ (табл. 2). При этом, уровень формирования штаммом AdiBOX 1.0  $P_{L-ppc}$  уксусной кислоты оставался практически неизменным по сравнению с родительским штаммом AdiBOX 1.0, а секреция янтарной кислоты возрастала в ~1.5 раз (табл. 2). При неизменном уровне формирования штаммом уксусной

**Таблица 2.** Концентрации и выходы основных метаболитов, а также концентрации производных обращенного β-окисления жирных кислот, секретируемых сконструированными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы\*

| Штамм                                                  | Глюкоза, мМ | Пировиноградная кислота, |              | Уксусная кислота, |              | Янтарная кислота, |              | Масляная кислота, мкМ | Адипиновая кислота, мкМ |
|--------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-----------------------|-------------------------|
|                                                        |             | мМ                       | моль/моль, % | мМ                | моль/моль, % | мМ                | моль/моль, % |                       |                         |
| AdiBOX 1.0                                             | 42.0 ± 2.4  | 22.3 ± 1.0               | 53.1         | 13.0 ± 1.1        | 30.9         | 0.9 ± 0.1         | 2.1          | 134.2 ± 11.8          | 330.6 ± 32.7            |
| AdiBOX 1.0 Δ <i>sdhAB</i>                              | 41.0 ± 2.1  | 22.7 ± 1.3               | 55.4         | 10.8 ± 0.6        | 26.3         | 3.1 ± 0.3         | 7.6          | 130.7 ± 11.5          | 346.0 ± 34.3            |
| AdiBOX 1.0 P <sub>L</sub> - <i>ppc</i>                 | 42.2 ± 2.3  | 10.2 ± 0.6               | 24.1         | 13.6 ± 1.2        | 32.2         | 1.4 ± 0.1         | 3.3          | 138.5 ± 12.2          | 389.3 ± 36.2            |
| AdiBOX 1.0 P <sub>L</sub> - <i>pusA</i>                | 41.7 ± 2.0  | 7.3 ± 0.4                | 17.5         | 12.8 ± 0.8        | 30.7         | 2.0 ± 0.2         | 4.8          | 132.1 ± 11.6          | 496.1 ± 47.6            |
| AdiBOX 1.0 P <sub>L</sub> - <i>pusA</i> Δ <i>sdhAB</i> | 40.3 ± 2.2  | 6.2 ± 0.4                | 15.4         | 11.3 ± 0.7        | 28.0         | 5.9 ± 0.4         | 14.6         | 133.6 ± 12.7          | 520.9 ± 45.8            |

\* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

кислоты, полученные данные указывали на то, что снижение в 2.2 раза секреции рекомбинантом пировиноградной кислоты, являющейся как прямым производным фосфоенолпирувата, так и прямым предшественником ацетил-КоА, могло приводить к интенсификации ЦТК лишь в 1.1 раз. Соответствующая оценка совпала с ростом синтеза штаммом адипиновой кислоты.

Следует отметить, что в *E. coli* фосфоенолпируваткарбоксилаза конкурирует за общий субстрат, ФЕП, с гликолитическими пируваткиназами PycA и PycF (КФ 2.7.1.40), синтезирующими из соответствующего предшественника пировиноградную кислоту, необходимую для дальнейшего образования ацетил-КоА. При этом, было показано, что экспрессия в клетках *E. coli* гена гетерологичной пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1), формирующей ЩУК из пировиноградной кислоты, способствует такому перераспределению потоков углерода в метаболическом узле ЩУК – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота – ацетил-КоА, который ведет к повышенному формированию рекомбинантами производных ЦТК [19, 20, 22].

При введении в клетки базового штамма гена *pusA* *B. subtilis*, кодирующего пируваткарбоксилазу, и его экспрессии под контролем сильного конститутивного промотора P<sub>L</sub> фага лямбда, секреция пировиноградной кислоты полученным рекомбинантом AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*pusA* снижалась до 7.3 мМ при выходе 17.5%, что соответствовало падению в 3 раза относительно показателя родительского штамма AdiBOX 1.0 (табл. 2). Как и в случае усиления туннелирования фосфоенолпирувата к ЩУК в штамме AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*ppc*, выраженное перенаправление пировиноградной кислоты в сторону формирования соответствующего производного в штамме AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*pusA* не оказывало значимого влияния на формирование рекомбинантом уксусной кислоты. Вместе с тем, синтез адипиновой кислоты штаммом AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*pusA* возрос в 1.5 раз до ~ 500 мкМ, на фоне роста секреции янтарной кислоты в 2 раза (табл. 2). По аналогии с оценкой синтеза метаболитов штаммом AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*ppc*, полученные результаты косвенно свидетельствовали об интенсификации ЦТК в клетках штамма AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*pusA* в 1.5 раза.

Таким образом, рост биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК сконструированными штаммами был прямо пропорционален оценочной степени интенсификации в них ЦТК. Вместе с тем, демонстрируемые штаммами AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*ppc* и AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-*pusA* значения углеродного баланса, рассчитанного как отношение общего количества молей углерода в детектированных продуктах, к количеству молей углерода потребленной глюкозы, составляли лишь 0.25 и 0.22 соответственно. Это могло указывать на более выраженную, нежели рассчитанную на

основании изменения секреции пировиноградной кислоты, интенсификацию в рекомбинантах ЦТК, сопровождающуюся значительными потерями углерода в виде  $\text{CO}_2$  при множественных обращениях цикла. Для проверки этого предположения, в штамме *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA* была осуществлена инактивация сукцинатдегидрогеназы, позволяющая, как указывалось выше, прямо оценить интенсивность ЦТК в соответствующем производном по уровню секреции им янтарной кислоты.

Полученный штамм *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA ΔsdhAB* синтезировал янтарную кислоту из глюкозы с выходом, возросшим до 14.6% и в 1.9 раз превышающим показатель штамма *AdiBOX 1.0 ΔsdhAB* (табл. 2). Таким образом, экспрессия в штамме *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA ΔsdhAB* гена пируваткарбоксилазы обеспечивала интенсификацию ЦТК в рекомбинанте в 1.9 раз. Соответствующее значение лишь немного превосходило подобное, ранее рассчитанное на основании изменения секреции пировиноградной кислоты для штамма *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA* (1.5 раза). Секреция адипиновой кислоты штаммом *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA ΔsdhAB* ~520 мкМ, также была в 1.5 раза выше аналогичного показателя соответствующего контрольного штамма (табл. 2). Таким образом, эти данные служили четким подтверждением предположения о прямой зависимости роста эффективности биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК сконструированными штаммами от степени интенсификации в них ЦТК. Вместе с тем, полученные результаты свидетельствовали об общей невысокой эффективности формирования в рекомбинантах сукцинил-КоА в реакциях ЦТК даже после интенсификации цикла. Действительно, лишь ~14% потребленной штаммом *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA ΔsdhAB* глюкозы было конвертировано в янтарную кислоту, указывая на максимально возможный уровень синтеза рекомбинантом сукцинил-КоА в пределах 6 мМ (табл. 2). Несмотря на то, что в результате инактивации сукцинатдегидрогеназы относительная внутриклеточная доступность сукцинил-КоА для реакций обращенного БОЖК потенциально была повышена в штамме *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA ΔsdhAB* в ~3 раза по сравнению со штаммом *AdiBOX 1.0 P<sub>L</sub>-pycA* (5.9 мМ против 2.0 мМ), синтез адипиновой кислоты соответствующим рекомбинантом увеличивался лишь на 5%. Таким образом, можно было заключить, что поток углерода через реакцию катализируемую 2-кетоглутаратдегидрогеназой, достигнутый в сконструированных штаммах и обеспечивающий формирование сукцинил-КоА в вышеуказанных количествах, был недостаточным для эффективного туннелирования последнего в реакции обращенного БОЖК. В совокупности с полученными результатами, свидетельствующими о позитивном эффекте интенсификации ЦТК на биосинтез целевого соединения, это предполагает необходимость дальнейшей оптимизации

функциональности цикла в сконструированных штаммах для повышения эффективности образования ими адипиновой кислоты.

Известно, что активность 2-кетоглутаратдегидрогеназы в *E. coli* снижена при выращивании клеток в богатых и содержащих глюкозу средах [23], что ограничивает поток углерода к янтарной кислоте через сукцинил-КоА и обуславливает проявление эффекта избыточного метаболизма глутаминовой кислоты (“glutamate overflow”), выражающегося в перенаправлении 2-кетоглутарата из ЦТК в сторону формирования соответствующей аминокислоты [24, 25]. Одним из подходов к преодолению соответствующей лимитации является обеспечение в клетках *E. coli* функциональности искусственного шунта 2-кетоглутарат – сукцинат-полуальдегид – янтарная кислота, опосредованного действием гетерологичной 2-кетоглутаратдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.71) и нативных для данной бактерии сукцинат-полуальдегиддегидрогеназ (КФ 1.2.1.24/1.2.1.7) [19, 20, 22]. При этом, поскольку сукцинил-КоА-синтетаза катализирует обратимую интерконверсию янтарной кислоты и сукцинил-КоА, синтезированная рекомбинантами янтарная кислота может быть превращена в соответствующий тиоэфир, необходимый для биосинтеза тех или иных целевых соединений, при усилении в штаммах экспрессии генов, кодирующих компоненты соответствующего ферментативного комплекса [26, 27]. Соответственно, перенаправление потока углерода от 2-кетоглутарата к сукцинил-КоА через промежуточное образование сукцинат-полуальдегида и янтарной кислоты может рассматриваться в качестве одной из возможных стратегий для дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик полученных в работе рекомбинантов.

В итоге, в результате проведенного исследования, сконструированы штаммы *E. coli* способные к повышенному биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК. Показано позитивное влияние усиления генерации ЩУК из трехуглеродных предшественников на биосинтез штаммами целевого соединения. Выявлена прямая зависимость между интенсификацией ЦТК и ростом эффективности биосинтеза полученными рекомбинантами адипиновой кислоты. Предложена стратегия дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик соответствующих адипат-продуцирующих штаммов.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22–14–00040).

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.** В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lang M., Li H.* // *ChemSusChem*. 2022. V. 15. № 1. e202101531.  
<https://doi.org/10.1002/cssc.202101531>
2. *Skoog E., Shin J.H., Saez-Jimenez V., Mapelli V., Olsson L.* // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 8. P. 2248–2263.
3. *Thomas J.M., Raja R., Johnson B.F., O'Connell T.J., Sankar G., Khimyak T.* // *Chem. Commun.* 2003. V. 21 № 10. P. 1126–1127.
4. *Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y.* // *Metab. Eng.* 2014. V. 23. P. 62–69.
5. *Zhang H., Li Z., Pereira B., Stephanopoulos G.* // *Microb. Cell. Factories*. 2015. V. 14. № 1.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0319-0>
6. *Weber C., Brueckner C., Weinreb S., Lehr C., Essl C., Boles E.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 8421–8430.
7. *Curran K.A., Leavitt J.M., Karim A.S., Alper H.S.* // *Metab. Eng.* 2013. V. 15. P. 55–66.
8. *Raj K., Partow S., Correia K., Khusnutdinova A.N., Yakunin A.F., Mahadevan R.* // *Metab. Eng. Commun.* 2018. V. 6. P. 28–32.
9. *Kallscheuer T., Gätgens J., Lübcke M., Pietruszka J., Bott M., Polen T.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. № 6. P. 2371–2382.
10. *Yu J.L., Xia X.X., Zhong J.J., Qian Z.G.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. V. 111. № 12. P. 2580–2586.
11. *Babu T., Yun E.J., Kim S., Kim D.H., Liu K.H., Kim S.R., Kim K.H.* // *Proc. Bioch.* 2015. V. 50. № 12. P. 2066–2071.
12. *Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R.* // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. № 5. P. 556–561.
13. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 3. С. 235–243.
14. *Zhao M., Huang D., Zhang X., Koffas M.A.G., Zhou J., Deng Y.* // *Metab. Eng.* 2018. V. 47. P. 254–262.
15. *Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Morzhakova A.A., Shakulov R.S., Debabov V.G.* // *Biotechnol. Lett.* 2013. V. 35. № 4. P. 577–583.
16. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2 nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. *Datsenko K.A., Wanner B.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
18. *Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
19. *Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 6.  
<https://doi.org/10.31857/S0555109923060168>
20. *Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // *Biotechnol. Rep.* 2022. V. 33. e00703.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00703>
21. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М. и др.* // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
22. *Skorokhodova A.Y., Stasenko A.A., Krasilnikova N.V., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // *Fermentation*. 2022. V. 8. № 12. 738.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation8120738>
23. *Park S.J., Chao G., Gunsalus R.P.* // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. № 13. P. 4138–4142.
24. *Chang D.E., Shin S., Rhee J.S., Pan J.G.* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 21. P. 6656–6663.
25. *Burgard A., Burk M.J., Osterhout R., Van Dien S., Yim H.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 42. P. 118–125.
26. *Choi S., Kim H.U., Kim T.Y., Lee S.Y.* // *Metab. Eng.* 2016. V. 38. P. 264–273.
27. *Yim H., Haselbeck R., Niu W., Pujol-Baxley C., Burgard A., Boldt J. et al.* // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 7. P. 445–452.

## Effect of the Tricarboxylic Acid Cycle Intensification on Biosynthesis of Adipic Acid Through the Inverted Fatty Acid $\beta$ -Oxidation by *Escherichia coli* Strains

A. Yu. Gulevich<sup>a, \*</sup>, A. Yu. Skorokhodova<sup>a</sup>, and V. G. Debabov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

Using previously engineered adipate-secreting *Escherichia* MG1655 *lacI*<sup>Q</sup>,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ldhA*,  $\Delta$ *adhE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*atoB*, P<sub>trc-ideal-4</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*fadB*,  $\Delta$ *fadE*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*tesB*,  $\Delta$ *yciA*, P<sub>trc-ideal-4</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*fabI*, P<sub>L</sub>-SD<sub>φ10</sub>-*paaJ*,  $\Delta$ *aceBAK*,  $\Delta$ *glcB* as a core strain, the derivatives capable of enhanced synthesis of the target compound from glucose via the reversed fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway were obtained. The respective effect was achieved due to the intensification of the tricarboxylic acid cycle in the cells. Prevention of multiple cycle turnovers, resulting from the inactivation of succinate dehydrogenase, had no pronounced effect on the formation of adipic acid by the recombinant. Upon the cycle intensification due to enhancing anaplerotic oxaloacetic acetic acid formation from phosphoenolpyruvate, resulting from the increased expression of the native *ppc* gene, the synthesis of adipic acid rose 1.2-fold to ~390  $\mu$ M. Enabling the formation of oxaloacetate from pyruvic acid, by introducing in the cells of heterologous *Bacillus subtilis* pyruvate carboxylase, resulted in a 1.5-fold intensification of the cycle, concomitantly with the proportional increase in adipic acid secretion to ~496  $\mu$ M. Subsequent inactivation of *sdhAB* genes in the strain increased the secretion of the target compound only slightly and adipic acid titer reached ~520  $\mu$ M. The obtained data indicated a direct dependence of the efficiency of adipic acid synthesis by the engineered strains on the degree of intensification of the tricarboxylic acid cycle.

**Keywords:** adipic acid, *Escherichia coli*, fatty acid  $\beta$ -oxidation, metabolic engineering, tricarboxylic acid cycle, succinyl-CoA