

УДК 577.121

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА (S)-3-ГИДРОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ ПУТИ β -ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli*

© 2021 г. А. Ю. Гулевич¹, *, А. Ю. Скороходова¹, В. Г. Дебабов¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

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

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 26.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Исследован микроаэробный синтез 3-гидроксимасляной кислоты штаммом *Escherichia coli* BOX3.1 $\Delta 4 P_L\text{-atoB } P_L\text{-tesB}$ (MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *fadE*, $P_L\text{-SD}_{\text{phi10-atoB}}$, $P_{\text{trc-ideal-4}}\text{-SD}_{\text{phi10-fadB}}$, $P_L\text{-SD}_{\text{phi10-tesB}}$), ранее направленно сконструированным для биосинтеза целевого соединения из глюкозы по обращенному пути β -окисления жирных кислот. Достигнут выход целевого продукта 0.12 моль/моль. Инактивация в штамме гена неспецифичной тиоэстеразы *YciA* приводила к росту выхода 3-гидроксимасляной кислоты до 0.15 моль/моль. Для оптимизации биосинтеза продукта был сконструирован штамм MG44 $P_L\text{-tesB}$ (MG1655 Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, $P_L\text{-SD}_{\text{phi10-tesB}}$), в котором была дополнительно обеспечена экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты β -окисления жирных кислот в составе плазмиды *pMW118m-atoB-fadB*. Уровень микроаэробного синтеза 3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы штаммом MG44 $P_L\text{-tesB}$ (*pMW118m-atoB-fadB*) в тестовых условиях достигал 0.35 моль/моль. Инактивация в штамме гена неспецифичной тиоэстеразы *YciA* приводила к незначительному снижению побочной продукции ацетата. Последующая инактивация в штамме гена неспецифичной тиоэстеразы *YdiI* практически не влияла на уровень синтеза побочных продуктов. Контролируемые условия культивирования сконструированного штамма MG44 $P_L\text{-tesB}$ *YciA* (*pMW118m-atoB-fadB*) в биореакторе позволили достичь выхода 3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы, составляющего 0.75 моль/моль.

Ключевые слова: 3-гидроксимасляная кислота, β -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109921020045

Полезные свойства многих промышленно значимых и физиологически активных веществ, обладающих высокой добавленной стоимостью, определяются наличием в составе соответствующих молекул хиральных центров, обуславливающих существование оптических изомеров химически идентичных соединений. Получение оптически чистых энантиомеров в рамках стереоселективного органического синтеза зачастую является нетривиальной задачей, требующей использования дорогостоящих катализаторов, жестких физических условий и агрессивных растворителей. Использование в качестве стартового материала удобных хиральных синтонов значительно упрощает задачу эффективного синтеза целевого продукта.

В частности, энантиомеры 3-гидроксимасляной кислоты (3-ГМК) могут служить в качестве удобного стартового материала для получения таких значимых оптически активных соединений,

как лекарственные препараты, феромоны, косметические средства, душистые вещества и агрохимикаты [1–4]. В норме стереоизомеры 3-ГМК не секретируются известными микроорганизмами при утилизации сахаров. Тем не менее, их микробиологический синтез из дешевого возобновляемого сырья может служить экономически оправданной альтернативой энерго- и ресурсозатратному [5] химическому способу получения соответствующих соединений при использовании направленно сконструированных высокоэффективных микробных штаммов-продуцентов. Действительно, в последние годы была продемонстрирована принципиальная возможность рациональной инженерии такой традиционной для промышленной биотехнологии бактерии как *Escherichia coli* для биосинтеза из глюкозы как (R)- [6, 7], так и (S)-3-ГМК [7, 8].

Соответствующий биохимический путь, ведущий к формированию целевого соединения, пред-

ставляет собой последовательность реакций, включающих начальную конденсацию двух молекул предшественника, ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, дальнейшее восстановление ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА и финальный гидролиз тиоэфирной связи последнего с образованием 3-ГМК. Данные реакции катализируются ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазой (КФ 2.3.1.9), НАДФН-зависимой (*R*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой (КФ 1.1.1.36) либо НАДН-зависимой (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой (КФ 1.1.1.35), и тиоэстеразой (КФ 3.1.2.20). Таким образом, основные реакции образования ключевого хирального интермедиата, 3-гидроксибутирил-КоА, могут рассматриваться как аналогичные таковым биосинтеза 3-гидроксибутирата, в первую очередь у ралстоний, в случае (*R*)-стереоизомера и биосинтеза 1-бутанола у клостридий в случае (*S*)-стереоизомера. Этим объясняется выбор определенных гетерологических ферментов, использованных для достижения синтеза того или иного стереоизомера 3-ГМК в рекомбинантных штаммах, (*R*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы PhaV из *Ralstonia eutropha* [6, 7] и (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы Hbd из *Clostridium acetobutylicum* [7, 8]. Вместе с тем, клостридиальные реакции биосинтеза 1-бутанола с биохимической точки зрения подобны обращенным реакциям цикла β -окисления жирных кислот (БОЖК), биохимического пути существующего у множества микроорганизмов. Экспериментально, функциональная обратимость БОЖК была показана в ряде исследований, демонстрирующих продукцию по данному пути рекомбинантными штаммами *E. coli* из глюкозы или глицерина различных алифатических карбоновых кислот с различной длиной цепи, а также спиртов [9–12]. Следовательно, (*S*)-3-ГМК может быть синтезирована *E. coli* из глюкозы в результате частичного однократного обращения БОЖК при оверэкспрессии подходящей тиоэстеразы без необходимости использования каких-либо чужеродных генов.

Действительно, ранее был сконструирован штамм VOX3.1 $\Delta 4 P_L\text{-}atoB P_L\text{-}tesB$, производный от штамма *E. coli* дикого типа MG1655, способный к энантиоселективному биосинтезу из глюкозы (*S*)-3-ГМК по обращенному БОЖК [13]. В данном штамме нативные AtoC и FadR-зависимые регуляторные области генов *atoB* и *fadB*, кодирующих ацетил-КоА С-ацетилтрансферазу и бифункциональную (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназу/еноил-КоА-гидратазу (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17), были заменены искусственными регуляторными элементами, включающими эффективный сайт связывания рибосом гена $\phi 10$ из фага T7, а также промоторы P_L фага лямбда и $P_{irc\text{-}ideal\text{-}4}$ [14], соответственно. Кроме того, в штамме были инактивированы, за счет делеций генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, основные пути смешанно-кислотного бро-

жения, конкурирующие с обращенным БОЖК за восстановленные эквиваленты и ключевые метаболиты-предшественники, пируват и ацетил-КоА. Множественные раунды обращения БОЖК в штамме были предотвращены вследствие делеции гена *fadE*, кодирующего ацил-КоА дегидрогеназу (КФ 1.3.99.3), а формирование 3-ГМК из прямого КоА-предшественника было обеспечено в результате оверэкспрессии гена тиоэстеразы II, *tesB*.

Тем не менее, несмотря на способность штамма VOX3.1 $\Delta 4 P_L\text{-}atoB P_L\text{-}tesB$ синтезировать (*S*)-3-ГМК стереоселективно с относительно высоким выходом, достигающим в определенных условиях 66% от теоретического максимума, наблюдаемая секреция штаммом уксусной кислоты в качестве основного побочного продукта утилизации глюкозы предполагала возможность дальнейшей метаболической инженерии штамма либо его реконструированных аналогов для оптимизации синтеза целевого вещества.

Цель работы – оптимизация биосинтеза (*S*)-3-гидроксиасляной кислоты из глюкозы по обращенному пути β -окисления жирных кислот рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазы, ДНК полимеразу Taq, T4 ДНК лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), высокоточную ДНК полимеразу Phusion (“Thermo Scientific”, Финляндия), набор для сборки по Гибсону HiFi Builder и высокоточную ДНК полимеразу Q5 (“New England Biolabs”, США) и набор для сайт-направленного мутагенеза QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (“Agilent Technologies”, США). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Олигонуклеотиды (“Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195), ранее сконструированный штамм *E. coli* MG4 [15], являющийся производным штамма MG1655 лишенным путей смешанно-кислотного брожения, и ранее сконструированный штамм *E. coli* VOX3.1 $\Delta 4 P_L\text{-}atoB P_L\text{-}tesB$ [13], с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ферменты аэробного β -окисления жирных кислот и тиоэстеразу II, также лишенный путей смешанно-кислотного брожения, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Для культивирования бактерий применя-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-catgtctacaacacataacgtccctcagggcgatctcgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttactcaacaggtgaagcgaggtttcttcaggtgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-aatgatattggaacggaaatcacctggaagcactcgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P4	5'-tcacaaaatggcggctgtaaatcgtagcgaacagctgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P5	5'-cgtgaaggtgtcagtgcttc-3'
P6	5'-gtgacggcatggtcactacagc-3'
P7	5'-gatattcctgccgtagccagg-3'
P8	5'-caagttgagtagacatagcatcctcg-3'
P9	5'-ctatttctccagaattgccatgatttttc-3'
P10	5'-gctcagcgtgtaggtatctcagttc-3'
P11	5'-aatcatggcaattctggaagaataggcggccggcttctgaaattctgaaatgagctgttgacattgtgagcgtcacaattat-3'
P12	5'-gcaaaggtaccctcaggtatgctgactcctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacattataattgtgagcgtcacaatgctc-3'
P13	5'-gtcgacatcctcaggggtacctttgcctggcggcagtagcg-3'
P14	5'-cgaactgagatacctacagcgtgagcgcagatgcaagattgtagaaacgcaaaaaggc-3'
P15	5'-gaatcaaagctgccgacaacac-3'
P16	5'-gcttgagcgaacgacctac-3'
P17	5'-attagtcgacatggctagatctaaaaattgtgtcatcgtcagttc-3'
P18	5'-attaggtacctcagctccttaggatccattcaaccgttcaatcaccatcg-3'
P19	5'-attagtcgacatggctagatcctttacaaggcgacaccctgta-3'
P20	5'-tccatgatgatggtgatgatgagccgttttcaggtcgccaacc-3'
P21	5'-attaggtacctcagctccttaggatccatgatgatggtgatgatg-3'
P22	5'-ctggaacagcaatcagacctaaaagggtcgtcgc-3'
P23	5'-gcagcagcccttttaggtctgattgctgttccag-3'
P24	5'-gtttaatcgctggaagacctgccggtgccaccattg-3'
P25	5'-caatggtcggcaccggcaggtcttccaggcgattaaac-3'

ли полноценные среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [16], при необходимости в них добавляли ампициллин (100 мкг/мл) или хлорамфеникол (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Инактивацию генов *usiA* и *ydiI* в хромосоме *E. coli* осуществляли с использованием методики, описанной ранее [17].

Линейные фрагменты ДНК для инактивации целевых генов, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1 и P2, P3 и P4, и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [18] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инаktivированными генами *usiA* и *ydiI*, подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P5 и P6, P7 и P8.

Штаммы BOX3.1 Δ4 P_L-*atoB* P_L-*tesB* Δ*yciA*, MGΔ4 P_L-*tesB*, MGΔ4 P_L-*tesB* Δ*yciA* и MGΔ4 P_L-*tesB* Δ*yciA* Δ*ydiI* были получены при введении индивидуальных модификаций в хромосомы целевых штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае штамма MGΔ4 P_L-*tesB* использовали ранее полученный препарат трансдуцирующего фага, несущего соответствующую генетическую модификацию [13]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [19]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Конструирование плазмид. Плазмида pMW118m, производная низкокопийного вектора pMW118, содержащая генетическую конструкцию *NorI*-P_{trc-ideal-2}-SD_{lacZ}-*SalI*-*XhoI*-*KpnI*-T_{trcB}-*SphI*, была получена методом сборки по Гибсону. Необходимые линейные фрагменты ДНК, обладающие требуемыми областями фланговой гомологии, были получены ПЦР с использованием пар специфичных прай-

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
DH5alpha	F ⁻ , Δ(<i>argF-lac</i>)169, φ80d <i>lacZ</i> 58(M15), <i>phoA8</i> , <i>glnX44</i> (AS), λ ⁻ , <i>deoR481</i> , <i>rfbC1</i> , <i>gyrA96</i> (NalR), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thiE1</i> , <i>hsdR17</i>	CGSC#: 14231
BOX3.1 Δ4 P _L - <i>atoB</i> P _L - <i>tesB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>tesB</i>	[13]
BOX3.1 Δ4 P _L - <i>atoB</i> P _L - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{phi10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i>	Данная работа
MGΔ4	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i>	[15]
MGΔ4 P _L - <i>tesB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>tesB</i>	Данная работа
MGΔ4 P _L - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i>	Данная работа
MGΔ4 P _L - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i> Δ <i>ydiI</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{phi10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , Δ <i>ydiI</i>	Данная работа
Плазмида		
pMW118-(λ <i>attL</i> -Cm-λ <i>attR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , λ <i>attL-cat-attR</i>	[18]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} -λ <i>gam-bet-exo</i>	[17]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R -λ <i>xis-int</i> , cIts857	[19]
pMW118	pSC101, <i>bla</i>	GenBank AB005475
pMW118m	pMW118, <i>NotI</i> -P _{trc-ideal-2} -SD _{lacZ} - <i>SalI-XhoI-KpnI-TrmB-SphI</i>	Данная работа
pMW118m- <i>atoB-fadB</i>	pMW118, P _{trc-ideal-2} -SD _{lacZ} - <i>atoB-fadB-TrmB</i>	Данная работа

меров. Линеаризованный вектор pMW118mod получали в результате ПЦР с плазмидой pMW118, использованной в качестве матрицы, и комплементарными ее целевым областям праймерами P9 и P10. Фрагмент ДНК, содержащий 5'-концевую область гомологии с фланговым участком линеаризованного вектора pMW118mod, сайт узнавания *NotI*, промотор P_{trc-ideal-2} (O_{lac-ideal}-P_{trc}/O_{lac-ideal}) [14], SD гена *lacZ*, сайты узнавания *SalI*, *XhoI*, *KpnI* и короткую 3'-концевую область гомологии с 5'-концевым участком терминатора *rrnB* оперона, был получен с помощью ПЦР с праймерами P11 и P12, обладающими областями взаимной комплементарности. Фрагмент ДНК, включающий сайты узнавания *SalI*, *XhoI*, *KpnI*, терминатор *rrnB* оперона *E. coli*, сайт узнавания *SphI* и последовательность, гомологичную фланговому участку линеаризованного вектора pMW118mod, получали в результате ПЦР с использованием праймеров P13 и P14 и хромосомной ДНК *E. coli* в качестве матрицы.

ПЦР фрагменты очищали и добавляли к реакционной смеси набора NEB HiFi Builder, содержащей экзонуклеазу, высокоточную ДНК-полимеразу и ДНК-лигазу. Для отбора целевых ковалентно-

замкнутых плазмидных ДНК, полученной реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5alpha, с последующей селекцией трансформантов на среде, содержащей ампициллин. Соответствие запланированных и экспериментально полученных структур искусственного генетического элемента *NotI*-P_{trc-ideal-2}-SD_{lacZ}-*SalI-XhoI-KpnI-TrmB-SphI* в серии плазмид, выделенных из отобранных Ap^R-трансформантов, подтверждали секвенированием с использованием праймеров P15, P16.

Гены *atoB* и *fadB* первоначально были клонированы в составе вектора pUC18. С этой целью кодирующие области соответствующих генов были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием пар праймеров P17, P18, в случае гена *atoB*, а также P19, P20, и затем P19, P21, в случае гена *fadB*, и хромосомной ДНК штамма *E. coli* MG1655 в качестве матрицы. Дизайн праймеров предполагал, что в результате подобной амплификации кодирующие области генов будут дополнительно содержать на флангах сайты узнавания *BglII* и *VamHI*, расположенные, соответственно, непосредственно после старт- и непосредственно перед стоп-кодоном, а также сайты узнавания *SalI*,

расположенные на 5'-концах и сайты узнавания *XhoI* и *KpnI*, расположенные на 3'-концах ампликонов. Полученные фрагменты ДНК были, впоследствии, клонированы в составе вектора pUC18 по сайтам *Sall* и *KpnI* и секвенированы. Природные сайты узнавания *BglII*, расположенные в кодирующей области гена *fadB*, были далее элиминированы в результате двухэтапного сайт-направленного мутагенеза с использованием QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit ("Agilent Technologies", США). Для этого плазида с клонированным геном *fadB* была амплифицирована в ходе ПЦР с использованием локус-специфичных праймеров P22 и P23, обработана рестриктазой *DpnI*, и подвержена второму раунду ПЦР с праймерами P24 и P25. После трансформации полученной реакционной смесью клеток штамма *E. coli* DH5alpha, последующей селекции Ap^R клонов и выделения из них кольцевых плазмидных ДНК, последние были секвенированы и отобрана плазида, содержащая корректную последовательность гена *fadB*. В дальнейшем гены *atoB* и *fadB* были переклонированы из соответствующих pUC-производных плазмид в состав плазмиды pMW118m-*atoB-fadB* под контроль промотора $P_{trc-ideal-2}$ и SD_{lacZ} с использованием рестрикционных сайтов *AatII*, *Sall* и *XhoI*.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для первичного микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых невентилируемыми 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. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимых промоторов $P_{trc-ideal-2}$ и $P_{trc-ideal-4}$, спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил- β -D-тиогаляктозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ. При выращивании штаммов, содержащих pMW118-производные плазмиды, в среды дополнительно вносили 100 мкг/мл ампициллина (ООО "Синтез", Россия).

Контролируемое микроаэробное культивирование проводили в биореакторе, как описано ранее [13]. Использовали комбинированную среду, содержащую (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5.0, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 15.1, KH_2PO_4 – 3.0, NH_4Cl – 1.0, $NaCl$ – 0.5, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.015, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5 и 5 мг/л тиамина. Аэробную фазу накопления биомассы проводили в течение 7 ч при 37°C и 850 об./мин с потоком воздуха

0.5 л/мин. Индуцировали экспрессию генов, находящихся под контролем LacI-зависимых промоторов через 3 ч инкубации. Микроаэробную продуктивную фазу инициировали добавлением в среду глюкозы до концентрации 25 г/л, изменением оборотов мешалки до 250 об./мин, и снижением потока воздуха до 0.1 л/мин.

Собранные для анализа клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. 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 (объемное соотношение 75/25) при скорости потока 1.0 мл/мин.

Идентификацию и количественный анализ содержания 3-ГМК в культуральных жидкостях осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии по ранее разработанным методикам [13]. Использовали газовый хроматограф Agilent 6890N, оснащенный автосамплером 7683B и масс-селективным детектором Agilent 5975, укомплектованный капиллярной колонкой DB-5MS ("Agilent", США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа носителя использовался гелий со скоростью потока 1.0 мл/мин. Пробу 1 мкл вводили в испаритель в режиме деления потока 1 : 50. Температура испарителя составляла 230°C. Использовали следующую температурную программу термостата колонки: начальная изотерма 1 мин при 60°C, последующий градиент до 120°C со скоростью 3°C/мин, затем до 220°C со скоростью 20°C/мин, финальная изотерма 1 мин при 220°C. Применяли ионизацию электронами (электронный удар, 70 eV) при режиме работы масс-селективного детектора с контролем заданных ионов (117.10 m/z , 131.10 m/z , 147.10 m/z , 191.10 m/z). Температура ионного источника была установлена на 230°C. Пробоподготовка включала экстракцию аналита из культуральной жидкости, упаривание экстрактов в токе азота и дериватизацию с получением триметилсилильных производных. Полученные данные обрабатывали с помощью Agilent MSD ChemStation Software. Для

идентификации целевого анализа использовались библиотечные данные (индекс удерживания и масс-спектр). Количественный анализ осуществляли с использованием соответствующего стандарта.

Энантиомерную форму синтезированной штаммами 3-ГМК определяли с помощью хиральной газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку “Agilent” CP-Chiral-Dex CB (длина 25 м, 0.25 мм внутренний диаметр, толщина пленки 0.25 мкм). Проводили предварительную дериватизацию анализа с получением метилового эфира 3-ацетоксимасляной кислоты. В качестве стандартов использовали ацетилированные коммерчески доступные метиловые эфиры (*R*)- и (*S*)-3-ГМК (“Sigma-Aldrich”, США). Использовали газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 (Япония), оснащенный автосамплером АОС-5000. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1.0 мл/мин. Применяли режим ввода с делением потока (1 : 20, объем пробы 1 мкл). Температура инжектора составляла 200°C, термостата колонки – 110°C, детектора – 250°C. Обработку данных осуществляли с использованием программы GCsolution (“Shimadzu”, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез 3-ГМК по обращенному БОЖК из двух молекул ацетил-КоА требует расхода одного восстановленного эквивалента НАДН. Гликолитическая утилизация глюкозы приводит к формированию двух молекул пирувата и сопровождается генерацией двух НАДН. Анаэробная конверсия пирувата в ацетил-КоА под действием пируватформатлиазы (КФ 2.3.1.54) не сопровождается образованием НАДН, в то время как при аэрации действие пируватдегидрогеназы (КФ 1.2.4.1/2.3.1.12/1.8.1.4) приводит к формированию дополнительной молекулы НАДН на каждый образующийся ацетил-КоА. Соответственно, у штаммов *E. coli* лишенных способности к брожению уровень анаэробного формирования НАДН будет превосходить необходимый для эффективного биосинтеза 3-ГМК. Кроме того, известно, что клетки *E. coli* с инактивированными генами *pta*, *ldhA* и *adhE* не способны к анаэробному росту [20]. В результате, при анаэробно-гликолизе у подобных штаммов, сконструированных для продукции 3-ГМК, будет подавляться не только повышенным внутриклеточным пулом НАДН, но и избыточной генерацией АТФ [21]. С другой стороны, в присутствии кислорода, внутриклеточная доступность НАДН, требующегося для биосинтеза 3-ГМК, будет лимитироваться активностью дыхательной цепи переноса электронов. Таким образом, ни полностью анаэробные, ни аэробные условия не могли рассматриваться

как оптимальные для биосинтеза 3-ГМК из глюкозы по обращенному БОЖК ранее сконструированным штаммом VOX3.1 Δ4 *P_L-atoB P_L-tesB*.

Действительно, при первичной характеристике, штамм VOX3.1 Δ4 *P_L-atoB P_L-tesB* в аэробных условиях не синтезировал из глюкозы заметных количеств 3-ГМК, а при анаэробно-продукции целевого вещества была довольно низкой [13]. В настоящей работе биосинтетический потенциал штамма исходно оценивали при микроаэробном культивировании. В таких условиях штамм, в зависимости от индукции экспрессии гена *fadB*, находящегося под контролем LacI-зависимого промотора, синтезировал из глюкозы от 2.9 до 4.9 мМ 3-ГМК с молярным выходом 0.07–0.12 моль/моль (табл. 3). При этом основную часть потребленной глюкозы штамм секретирует в виде пировиноградной и уксусной кислот. Формирование штаммом 3-ГМК, наблюдаемое в отсутствие индукции экспрессии гена *fadB*, могло объясняться определенной “протечкой” промотора *P_{trc-ideal-4}* [14], тогда как мало зависящий от индукции синтез 3-ГМК уровень секреции пировиноградной и уксусной кислот мог являться следствием ряда причин. В первую очередь, к повышенной секреции данных предшественников в синтезе 3-ГМК мог приводить недостаток в штамме внутриклеточного НАДН. Однако, накопление штаммом заметных количеств сукцината и малата указывало на то, что условия культивирования штамма были достаточно “безкислородными” для формирования соответствующих дикарбоксилатов в результате функционирования восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот, обычно активной в условиях анаэробно-продукции. Повышенный уровень синтеза штаммом ацетата, при относительно невысоком формировании 3-ГМК, мог быть следствием как недостаточной активности сверхэкспрессированных в штамме ферментов БОЖК, так и результатом активности неспецифических тиоэстераз, отличных от направленно сверхэкспрессированной тиоэстеразы II (*TesB*). Действительно, клетки *E. coli* природно обладают как минимум восемью тиоэстеразами, способными гидролизовать тиоэфирную связь КоА-производных с образованием соответствующих карбоксилатов. Среди них тиоэстеразы *YciA*, *YbgC* и *YdiI* демонстрируют довольно широкую субстратную специфичность в отношении ацил-производных кофермента А [10, 22, 23]. При этом *YciA* проявляет максимальную активность в отношении ацетил-КоА [10].

Для оценки эффективности потенциальных подходов к улучшению синтеза 3-ГМК в штамме VOX3.1 Δ4 *P_L-atoB P_L-tesB* был первично инактивирован ген *yciA*. В результате данной модификации выход 3-ГМК и уровень синтеза соответствующего соединения производным штаммом VOX3.1 Δ4 *P_L-atoB P_L-tesB* Δ*yciA* возросли практи-

Таблица 3. Концентрации и молярные выходы метаболитов секретируемых сконструированными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	ИПТГ	Пируват		Ацетат		Малат		Сукцинат		3-ГМК	
		ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ	ММ	МОЛЬ/МОЛЬ
VOX3.1 Δ4 P _L - <i>atoB</i> P _L - <i>tesB</i>	–	23.2 ± 1.6	0.57	19.2 ± 1.2	0.47	0.9 ± 0.1	0.02	1.1 ± 0.1	0.03	2.9 ± 0.2	0.07
	+	20.6 ± 1.3	0.49	20.4 ± 1.3	0.49	0.9 ± 0.1	0.02	0.9 ± 0.1	0.02	4.9 ± 0.3	0.12
VOX3.1 Δ4 P _L - <i>atoB</i> P _L - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i>	–	24.4 ± 1.7	0.60	16.0 ± 1.0	0.39	1.0 ± 0.1	0.02	1.0 ± 0.1	0.02	3.5 ± 0.2	0.09
	+	21.6 ± 1.5	0.51	16.8 ± 1.2	0.40	0.9 ± 0.1	0.02	0.9 ± 0.1	0.02	6.1 ± 0.4	0.15
MGΔ4 P _L - <i>tesB</i> (pMW118m- <i>atoB-fadB</i>)	–	6.7 ± 0.4	0.16	18.7 ± 1.3	0.44	1.0 ± 0.1	0.02	1.3 ± 0.1	0.03	13.9 ± 0.8	0.32
	+	4.6 ± 0.3	0.11	17.6 ± 1.1	0.41	0.8 ± 0.1	0.02	1.4 ± 0.2	0.03	14.9 ± 0.9	0.35
MGΔ4 P _L - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i> (pMW118m- <i>atoB-fadB</i>)	–	8.5 ± 0.6	0.19	13.6 ± 0.9	0.31	1.0 ± 0.1	0.02	1.3 ± 0.1	0.03	15.6 ± 1.0	0.36
	+	6.5 ± 0.5	0.15	12.1 ± 0.7	0.27	0.9 ± 0.1	0.02	1.2 ± 0.1	0.03	17.0 ± 1.2	0.38
MGΔ4 P _L - <i>tesB</i> Δ <i>yciA</i> Δ <i>ydiI</i> (pMW118m- <i>atoB-fadB</i>)	–	8.1 ± 0.6	0.18	14.2 ± 1.0	0.32	0.9 ± 0.1	0.02	1.3 ± 0.1	0.03	15.3 ± 0.9	0.35
	+	6.3 ± 0.4	0.15	12.4 ± 0.8	0.28	1.0 ± 0.1	0.02	1.0 ± 0.1	0.02	16.9 ± 1.1	0.38

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

чески на 20%, тогда как выход и уровень синтеза ацетата снизились на то же значение (табл. 3). Тем не менее, уровень секреции штаммом пирувата был неизменным, а ацетат оставался основным продуктом секретируемым штаммом в ходе утилизации глюкозы. Данный факт свидетельствовал о том, что, по-видимому, именно внутриклеточный уровень белков катализирующих реакции БОЖК лимитировал продукцию 3-ГМК сконструированным штаммом. Несмотря на то, что промотор P_L фага лямбда, контролирующей в штамме экспрессию гена ацетил-КоА С-ацетил-трансферазы *atoB*, является одним из “сильнейших” для *E. coli*, а промотор P_{trc-ideal-4}, расположенный перед геном 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы (*fadB*) мало уступает ему по “силе” [14], хромосомная экспрессия единичных копий соответствующих генов не могла, очевидно, обеспечить в штамме форсированного протекания реакций обращенного БОЖК, способствующего повышению синтезу целевого соединения.

Для проверки правомочности данной гипотезы гены *atoB* и *fadB* были клонированы в составе экспрессионного вектора pMW118m-*atoB-fadB*, под контролем промотора P_{trc-ideal-2}, и первоначально экспрессированы в специально сконструированном штамме MGΔ4 P_L-*tesB*. За исключением уровня экспрессии соответствующих генов, кодирующих ферменты БОЖК, полученный штамм MGΔ4 P_L-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) был практически изогенен штамму VOX3.1 Δ4 P_L-*atoB*

P_L-*tesB*. Отличия заключались в отсутствии в штамме MGΔ4 мутации *lacI^Q* и в наличии интактного гена *fadE*. Однако, в отсутствие в среде жирных кислот экспрессия генов *fad*-регулона, в том числе *fadE*, репрессируется в *E. coli* транскрипционным регулятором FadR и активность соответствующих ферментов в клетке отсутствует [24]. Также, наблюдаемая в LacI^Q штамме VOX3.1 Δ4 P_L-*atoB* P_L-*tesB* “протечка” промотора P_{trc-ideal-4} не позволяла ожидать строгой репрессии, за счет данного свойства штамма, аналогичного по характеристикам промотора P_{trc-ideal-2} [14] при его расположении в составе плазмиды.

Действительно, в ходе микроаэробной утилизации глюкозы штамм MGΔ4 P_L-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) секретирует сходные количества метаболитов вне зависимости от присутствия в среде ИПТГ (табл. 3). Вместе с тем, количество синтезированной штаммом MGΔ4 P_L-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) 3-ГМК и выход этого соединения возросли практически в 3 раза, до 14.9 мМ и 0.35 моль/моль, по сравнению с соответствующими показателями, 4.9 мМ и 0.12 моль/моль, демонстрируемыми штаммом VOX3.1 Δ4 P_L-*atoB* P_L-*tesB* при индукции. Рост синтеза штаммом 3-ГМК произошел, в первую очередь, за счет резкого снижения секреции пирувата, тогда как уровень образования ацетата снизился незначительно. Таким образом, повышение формирования 3-ГМК штаммом MGΔ4 P_L-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) являлось результатом интенсификации потока уг-

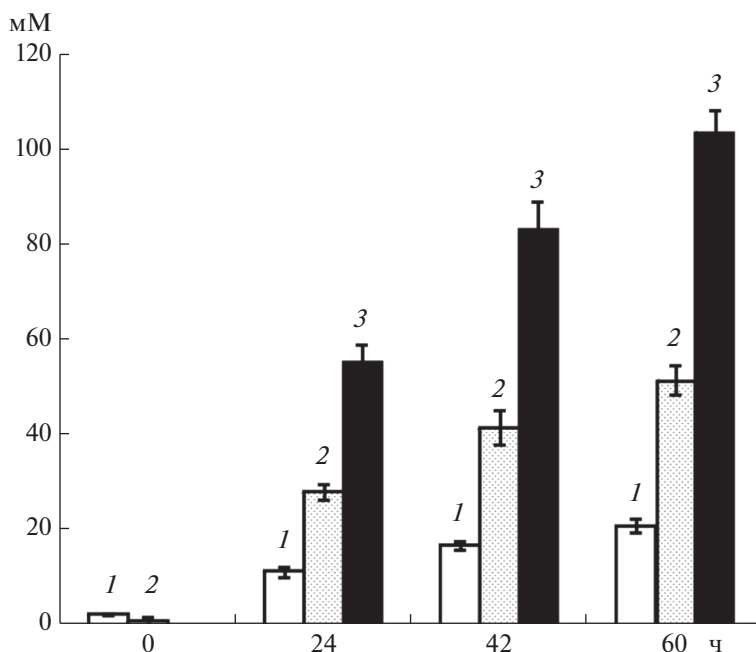


Рис. 1. Концентрации метаболитов (мМ): пирувата (1), ацетата (2) и 3-ГМК (3), секретированных штаммом MGD4 P_L-tesB *DuciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) при микроаэробной утилизации глюкозы в биореакторе в присутствии ИПТГ.

лерода через ацетил-КоА и вовлекающие его последующие реакции обращенного БОЖК. Это было следствием увеличенного синтеза в клетке белков AtoB и FadB, достигнутого при плазмидной экспрессии соответствующих генов. Тем не менее, выход 3-ГМК синтезированной штаммом MGD4 P_L-tesB (*pMW118m-atoB-fadB*) был далек от теоретического максимума, 1 моль/моль, а секреция ацетата оставалась значительной.

Делеция гена, кодирующего основную неспецифичную тиоэстеразу YciA, не привела, однако, к выраженному падению секреции ацетата соответствующим производным штаммом MGD4 P_L-tesB *DuciA* (*pMW118m-atoB-fadB*) (табл. 3). Можно предположить, что за гидролиз тиоэфирной связи ацетил-КоА с образованием ацетата в штамме MGD4 P_L-tesB *DuciA* (*pMW118m-atoB-fadB*) были ответственны другие неспецифичные тиоэстеразы. В качестве такой тиоэстеразы, в первую очередь, могла быть рассмотрена YdiI, обладающая заметно меньшей активностью по отношению к ацетил-КоА, нежели YciA (0.222 мкг/мг/мин), составляющей 0.036 мкг/мг/мин, но сравнимой с таковой для гиперэкспрессированной в штамме TesB (0.030 мкг/мг/мин) [10]. В дальнейшем ген *ydiI* был инактивирован в штамме MGD4 P_L-tesB *DuciA* (*pMW118m-atoB-fadB*). При микроаэробной утилизации глюкозы полученный штамм MGD4 P_L-tesB *DuciA* *YdiI* (*pMW118m-atoB-fadB*) синтезировал, вне зависимости от присутствия в среде ИПТГ, количества 3-ГМК и ацетата аналогичные таковым родительского штамма MGD4 P_L-tesB

DuciA (*pMW118m-atoB-fadB*) (табл. 3). Таким образом, секреция ацетата штаммом MGD4 P_L-tesB *DuciA* *YdiI* (*pMW118m-atoB-fadB*) была обусловлена, по-видимому, побочной активностью гиперэкспрессированной тиоэстеразы II.

Известно, что анаэробная утилизация жирных кислот клетками *E. coli* по БОЖК невозможна без наличия в среде внешнего акцептора электронов [25]. Таким образом, несмотря на отсутствие прямых свидетельств, можно было предположить, что активность ферментов БОЖК, нуждающихся в участии кофакторов НАДН/НАД⁺, может, в той или иной степени, подавляться высоким внутриклеточным пулом НАДН. Поддержание оптимального внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса по этой причине, очевидно, является ключевым условием эффективного синтеза целевых продуктов по обращенному БОЖК. При микроаэробном культивировании в колбах, насыщение среды кислородом не может поддерживаться на постоянном уровне и, как отмечалось выше, достигаемые в итоге условия инкубации штаммов были анаэробными. Ранее было показано, что оптимальные условия для биосинтеза 3-ГМК из глюкозы штаммом VOX3.1 Δ4 P_L-atoB P_L-tesB достигались при проведении продуктивной фазы в биореакторе с поддержкой постоянного насыщения среды низким уровнем кислорода [13], поэтому биосинтетические характеристики штамма MGD4 P_L-tesB *DuciA* (*pMW118m-atoB-fadB*) оценивали при реализации процессов роста

и биосинтеза 3-ГМК в ферментере, как описано в разделе Методика.

В биореакторе штамм MGD4 P_L-*tesB* Δ*yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) к концу инкубации синтезировал из глюкозы ~104 мМ 3-ГМК с выходом, достигающим 0.75 моль/моль (рис. 1) и энантиомерным избытком (S)-стереоизомера >99.5%. Финальный уровень секреции штаммом ацетата составлял ~51.8 мМ при выходе ~0.38 моль/моль, на фоне относительно низкого накопления пирувата. В аналогичных условиях штамм BOX3.1 Δ4 P_L-*atoB* P_L-*tesB* синтезировал из глюкозы 3-ГМК с выходом 0.66 моль/моль при заметно большей, по сравнению со штаммом MGD4 P_L-*tesB* Δ*yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*), побочной продукции ацетата [13].

Таким образом, в результате реконструкции штамма-продуцента в сочетании с проведением процесса биосинтеза целевого вещества в условиях способствующих его эффективному формированию удалось оптимизировать продукцию 3-ГМК из глюкозы направленно сконструированными штаммами *E. coli*.

Вместе с тем, результаты исследования свидетельствовали о том, что биосинтетические характеристики полученного штамма-продуцента 3-ГМК могут быть в дальнейшем улучшены за счет обеспечения в клетке четкой координации активностей ключевых ферментов, ответственных за конверсию ацетил-КоА в целевой продукт. Такая координация может быть обеспечена в результате тонкой регуляции уровня экспрессии соответствующих генов. Кроме того, оптимизация условий культивирования штамма-продуцента, направленная на достижение в клетке выгодного окислительно-восстановительного баланса также может способствовать достижению повышенного уровня конверсии глюкозы в 3-ГМК.

Авторы выражают благодарность сотруднику НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИгенетика Губайдуллину И.И. за помощь в клонировании генов *atoB* и *fadB*, а также конструировании экспрессионной плазмиды, несущий данные гены.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-08059).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blacklock T.J., Sohar P., Butcher J.W., Lamanec T., Grabowski E. J. J. // J. Org. Chem. 1993. V. 58. № 7. P. 1672–1679.
2. Chiba T., Nakai T. // Chem. Lett. 1985. V. 161. P. 651–654.
3. Mori K., Sugai T. // Synthesis. 1982. V. 9. P. 752–753.
4. Mori K., Takikawa H. // Tetrahedron. 1990. V. 46. P. 4473–4486.
5. Spengler J., Albericio F. // Curr. Org. Synth. 2008. V. 5. № 2. P. 151–161.
6. Liu Q., Ouyang S.P., Chung A., Wu Q., Chen G.Q. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. № 4. P. 811–818.
7. Tseng H.C., Martin C.H., Nielsen D.R., Prather K.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 10. P. 3137–3145.
8. Lee S.H., Park S.J., Lee S.Y., Hong S.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 79. № 4. P. 633–641.
9. Dellomonaco C., Clomburg J.M., Miller E.N., Gonzalez R. // Nature. 2011. V. 476. № 7360. P. 355–359.
10. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
11. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 3. P. 463–469.
12. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 21–29.
13. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Debabov V.G. // J. Biotechnol. 2017. V. 244. P. 16–24.
14. Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.А., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Биотехнология. 2006. № 3. С. 6–16.
15. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Моржакова А.А., Антонова С.В., Сухоженко А.В., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 383–388.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd 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. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
19. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
20. Fischer C.R., Tseng H.C., Tai M., Prather K.L., Stephanopoulos G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 1. P. 265–275.
21. Koebmann, B.J., Westerhoff H.V., Snoep, J.L., Nilsson, D., Jensen, P.R. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 14. P. 3909–3916.
22. 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.
23. Chen M., Ma X., Chen X., Jiang M., Song H., Guo Z. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 12. P. 2768–2775.
24. Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 4. P. 829–839.
25. Campbell J.W., Morgan-Kiss R.M., Cronan J.E. // Mol. Microbiol. 2003. V. 47. № 3. P. 793–805.

Optimization of Biosynthesis of (*S*)-3-Hydroxybutyric Acid from Glucose Through Inverted Fatty acid β -Oxidation Pathway by Recombinant *Escherichia coli* Strains

A. Yu. Gulevich^{a,*}, A. Yu. Skorokhodova^a, and V. G. Debabov^a

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

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

Microaerobic synthesis of 3-hydroxybutyric acid by *Escherichia coli* strain BOX3.1 $\Delta 4$ P_L-*atoB* P_L-*tesB* (MG1655 *lacI*⁰, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *fadE*, P_L-SD_{*phi10-atoB*}, P_{*irc-ideal-4*}-SD_{*phi10-fadB*}, P_L-SD_{*phi10-tesB*}) previously directly engineered for biosynthesis of target compound from glucose through the inverted fatty acid β -oxidation pathway was studied. The yield of the target product of 0.12 mol/mol was achieved. Inactivation in the strain of the gene encoding nonspecific thioesterase YciA led to the elevation of yield of 3-hydroxybutyric acid up to 0.15 mol/mol. For the optimization of biosynthesis of target product the strain MG $\Delta 4$ P_L-*tesB* (MG1655 Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD_{*phi10-tesB*}) was engineered, and the genes encoding key enzymes of fatty acid β -oxidation were overexpressed in the strain from the plasmid pMW118m-*atoB-fadB*. The level of microaerobic synthesis of 3-hydroxybutyric acid by the strain MG $\Delta 4$ P_L-*tesB* (pMW118m-*atoB-fadB*) achieved in primary evaluation conditions reached 0.35 mol/mol. Inactivation in the strain of the gene of nonspecific thioesterase YciA led to only minor decrease in acetate byproduct. Further inactivation in the strain of gene encoding nonspecific thioesterase YdiI had virtually no effect on the level of synthesis of side products. Cultivation of the constructed strain MG $\Delta 4$ P_L-*tesB* Δ *yciA* (pMW118m-*atoB-fadB*) in bioreactor under the controlled conditions ensured achievement of yield of 3-hydroxybutyric acid amounting to 0.75 mol/mol.

Keywords: 3-hydroxybutyric acid, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering, *Escherichia coli*