

УДК 577.121

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОБРАЩЕНИЯ β -ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В *Escherichia coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ НАТИВНЫХ АЦИЛ-КоА ДЕГИДРОГЕНАЗ

© 2022 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 25.02.2022 г.

После доработки 01.03.2022 г.

Принята к публикации 03.03.2022 г.

С использованием, в качестве базового, штамма *Escherichia coli* MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *fadE*, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA* исследована эффективность обращения β -окисления жирных кислот при действии нативных клеточных ферментов, способных служить в качестве ацил-КоА-дегидрогеназ. Повышенная экспрессия генов *fadE*, *fabI* и *ydiO/ydiQRST*, кодирующих соответствующие ферменты, была обеспечена в производных базового штамма при замене их нативных регуляторных областей искусственным регуляторным элементом P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}. Продемонстрировано трехкратное обращение цикла в сконструированных рекомбинантах, сопровождающееся значимой секрецией масляной, капроновой и каприловой кислот. Максимальный уровень продукции шести- и восьмиуглеродных карбоксилатов достигнут при повышенной экспрессии гена *fabI*, тогда как минимальные уровни секреции соответствующих соединений демонстрировал штамм с усиленной экспрессией генов *ydiO* и *ydiQRST*. Рекомбинантный штамм с индивидуально усиленной экспрессией *ydiO* не продуцировал детектируемых количеств производных полного обращения β -окисления жирных кислот.

Ключевые слова: ацил-КоА дегидрогеназа, β -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109922040195

Актуальной тенденцией современной биотехнологии является разработка микробных биосинтетических платформ для получения промышленно значимых химикатов. Действительно, многие из этих веществ могут быть получены в результате серий относительно простых превращений ограниченного набора интермедиатов центрального метаболизма клетки, таких как пировиноградная кислота, щавелевоуксусная кислота и ацетил-КоА. Таким образом, биосинтез ряда структурно родственных соединений может быть обеспечен при вовлечении того или иного ключевого интермедиата центрального метаболизма в целевой платформенный биохимический путь на основе единого базового рекомбинантного штамма, вместо создания серии специализированных продуцентов. На сегодняшний день перспективность данного подхода продемонстрирована на основе клеточек *Escherichia coli*, подвергнутых направленной метаболической инженерии для синтеза метилкетонов [1], гидроксикислот [2], алифатических спиртов [3] и алифатических функционализированных карбоновых кислот [4, 5]. В общем случае,

платформенный биосинтетический путь представляет собой конечную последовательность реакций, один из интермедиатов которой может служить ключевым предшественником в биосинтезе целевых продуктов [6]. Однако, потенциально, в качестве подобных путей могут использоваться итеративные биохимические пути, обеспечивающие приращение углеродной цепи формируемых молекул на каждом новом функциональном раунде. Такое свойство итеративных биохимических путей является их дополнительным преимуществом, кратно расширяющим спектр возможных конечных продуктов биосинтеза. Одной из немногих удобных и эффективных итеративных биосинтетических платформ, потенциал которых для микробиологического синтеза целевых групп веществ различных классов подтвержден экспериментально, является обращенное β -окисление жирных кислот (БОЖК) [7].

При форсированной инверсии БОЖК в сторону биосинтеза, последовательность соответствующих реакций инициируется конденсацией двух

молекул ацетил-КоА, прямого производного пировиноградной кислоты, и, в дальнейшем, протекает через поэтапное формирование 3-кетоацил-, 3-гидроксиацил-, 2-еноил- и ацил- производных КоА, что подразумевает возможность конверсии соответствующих интермедиатов цикла в линейные алифатические 3-кето-, 3-гидроксифункционализированные, насыщенные и ненасыщенные карбоновые кислоты, а также нормальные спирты и 1,3-диола в результате гидролиза тиоэфирной связи и/или же восстановления карбоксильной группы под действием подходящих терминирующих тиоэстераз или альдегид/алкоголь дегидрогеназ. Первичную и последующие этапы конденсации ацетил-КоА и ацил-КоА в клетках *E. coli* способна катализировать ацетил-КоА-С-ацетилтрансфераза AtoB (КФ 2.3.1.9), а дальнейшее восстановление 3-кетоацил-КоА в 3-гидроксиацил-КоА и формирование 2-еноил-КоА – бифункциональная (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа/еноил-КоА-редуктаза FadB (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17). Восстановление 2-еноил-КоА в соответствующее ацил-КоА производное могут обеспечивать как гетерологичные транс-еноил-КоА-редуктазы Ter (КФ 1.3.1.38) *Treponema denticola* и *Euglena gracilis*, так и нативные для *E. coli* ацил-КоА-дегидрогеназа FadE (КФ 1.3.99.3) и еноил-АЦП редуктаза/ацил-КоА-дегидрогеназа FabI (КФ 1.3.1.9) [8–10]. В катализе соответствующей реакции потенциально может принимать участие и ацил-КоА-дегидрогеназа YdiO [11].

В ранее опубликованных работах многократно подтверждена эффективность использования в качестве ферментов, катализирующих начальные стадии обращенного БОЖК, белков *E. coli* AtoB и FadB. Вместе с тем, возможность и эффективность многократного обращения цикла напрямую зависят от активности ферментов, катализирующих его финальную стадию. При этом данные об эффективности участия Ter, FadE, FabI и YdiO в обращении БОЖК разнятся, не позволяя сделать однозначного выбора в пользу одного из этих ферментов. Это связано с тем, что эффект усиления экспрессии генов, кодирующих соответствующие белки, на продукцию рекомбинантными продуцентами маркерных соединений оценивался в штаммах не являющихся изогенными и с использованием разных источников углерода [8–10].

Цель работы – оценка эффективности функционального обращения БОЖК в *Escherichia coli* при действии различных нативных ацил-КоА-дегидрогеназ в едином ранее сконструированном базовом штамме, способном к эффективной продукции 3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы в результате однократного частичного обращения цикла.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазу BglII, ДНК-полимеразу Taq, T4 ДНК-лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), а также высокоточную ДНК-полимеразу Кара HiFi (“Roche”, Швейцария). 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) и ранее сконструированный штамм *E. coli* BOX3.1 Δ4 P_{L-atoB} P_{L-tesB} ΔydcA [12], обозначенный как BOX3.3 Δ4, с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β-окисления жирных кислот и тиоэстеразу II, а также лишенный путей смешанно-кислотного брожения и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, 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 применяли полноценные среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [13], при необходимости в них добавляли ампициллин (100 мкг/мл) или хлорамфеникол (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Введение целевых модификаций в хромосому *E. coli* осуществляли с использованием методики, описанной ранее [14].

Конструирование фрагментов ДНК для замены нативных регуляторных областей генов *fadE*, *fabI*, *ydiO* и *ydiQRST* искусственным генетическим элементом P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}, содержащим сильный LacI-зависимый промотор и эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, осуществляли в несколько стадий. На первой стадии, с помощью ПЦР были получены фрагменты ДНК, содержащие на 5'-конце участок узнавания BglII, затем промотор P_{trc-ideal-4}, последовательность SD гена φ10 из фага T7 и, наконец, 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концам кодирующих областей генов *fadE*, *fabI*, *ydiO* и *ydiQRST*. Фрагменты получали в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы плазмиды pMW-O_{lac-ideal}-P_{trc}/O_{lac-ideal}-lacZ [15], был получен фрагмент ДНК, содержащий на 5'-конце участок узнавания BglII, затем промотор P_{trc-ideal-4} и часть последовательности SD гена φ10 из фага T7. ПЦР проводили с использованием праймеров P1 и P2. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующих раундах ПЦР с использованием пар праймеров P1 и P3, P1 и P4, P1 и P5, P1 и P6. Праймеры P3, P4, P5 и P6 содержали область комплементарную 3'-концу промотора P_{trc-ideal-4}, последовательность SD гена φ10 из

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctgaattgtgagcgctcacaattggatc-3'
P2	5'-cttcgctcacaattccacacattataaattgtgagcgctcacaattgcaac-3'
P3	5'-caggacaaccgtagcagaataactcaaaatcatcatatgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'
P4	5'-ggttaccagaatgcgcttaccggaagaaaccatcatgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'
P5	5'-cagcagttctgttcttcagttaaagaaaaatccatcatgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'
P6	5'-ttcaggcaccagctaaagcaggttatttttcat-atgtatatctc-cttc-gctcacaattccacacattata-3'
P7	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagtgg-3'
P8	5'-gtggtcagacacctcacaagtaaggggcttttcgtt-cgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P9	5'-caggcacaacaagcatcaacaataaggattaaagctcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P10	5'-tcctgctgaagcggctcattaacaggagtataatgcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P11	5'-cggagatggttccgtatcgactcacaggagaatccgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P12	5'-catcacaagtggtcagacctc-3'
P13	5'-cagactgctgataaataagctcac-3'
P14	5'-gcaactatagctactcacagccag-3'
P15	5'-gtaggtgaatgccagttcagctc-3'
P16	5'-gaagcggctcattaacaggag-3'
P17	5'-gaaataaccgttatccgccag-3'
P18	5'-gcaccgctatcgcacac-3'
P19	5'-gcattgagatcgaactggctg-3'

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
ВОХ3.3 Δ4	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i>	[12]
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>fadE</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadE</i>	Данная работа
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>fabI</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i>	Данная работа
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>ydiO</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>ydiO</i>	Данная работа
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>ydiO</i> P _{irc-id-4} - <i>ydiQRST</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>proxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>ydiO</i> , P _{irc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>ydiQRST</i>	Данная работа
Плазмида		
pMW118-(<i>λattL</i> -Cm- <i>λattR</i>)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>λattL-cat-λattR</i>	[16]
pMW-O _{lac-ideal} -P _{irc} /O _{lac-ideal} - <i>lacZ</i>	pSC101, <i>bla</i> , O _{lac-ideal} -P _{irc} /O _{lac-ideal} - <i>lacZ</i>	[15]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - <i>λgam-bet-exo</i>	[14]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - <i>λxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[17]

фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамок считывания генов *fadE*, *fabI*, *ydiO* и *ydiQRST*, соответственно. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК, содержащие участок узнавания *BglII*, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участкам ДНК, непосредственно предшествующим кодирующим областям генов *fadE*, *fabI*, *ydiO* и *ydiQRST*, были получены при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P7 и P8, P7 и P9, P7 и P10, P7 и P11, и плазмиды pMW118-(*attL*-*Cm*-*attR*) [16] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *BglII* и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукты лигирования амплифицировали с использованием пар праймеров P3 и P8, P4 и P9, P5 и P10, P6 и P11.

Сконструированные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Соответствие запланированных и экспериментально полученных нуклеотидных последовательностей нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующими областями генов *fadE*, *fabI*, *ydiO* и *ydiQRST*, было подтверждено секвенированием с помощью пар праймеров P12 и P13, P14 и P15, P16 и P17, P18 и P19.

Соответствующие индивидуальные генетические модификации были введены в состав хромосом целевых рекомбинантных штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [13]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [17]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. 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 выращивали в колбах объемом 750 мл на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора P_{trc-ideal-4}, спустя 3 ч от начала инкубации в среде культивирования добавляли изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы и 1.0 мМ ИПТГ. В дальнейшем культуры инкубировали анаэробно в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых заворачивающимися крышками, при 37°C на роторной качалке при 250 об./мин. 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 в соотношении 75/25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Концентрации этанола в культуральных жидкостях определяли методом газовой хроматографии на колонке OmegaWax (30 м, 0.25 мм в.д., 0.25 μм толщина пленки, "Supelco", США). Использовали хроматограф GC-17A ("Shimadzu", Япония), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и автосамплером АОС-20i.

Для количественного анализа содержания в культуральных жидкостях карбоновых кислот продуктов обращения БОЖК использовали газовый хроматограф GC-2010 Plus ("Shimadzu", Япония), укомплектованный капиллярной колонкой Stabilwax-DA ("Restek", США) длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа-носителя служил гелий при постоянной объемной скорости 1.2 мл/мин. Пробы, объемом 0.5 мкл, вводили в испаритель в режиме деления потока 1:20. Температура испарителя и пламенно-ионизационного детектора составляла 150 и 250°C, соответственно. Температурная программа термостата колонки: начальная изотерма – 2 мин при 90°C с последующим линейным градиентом до 200°C со скоростью 10°C/мин и конечной изотермой – 2 мин при 200°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве базового для оценки эффективности функционального обращения БОЖК при действии различных нативных ацил-КоА-дегидрогеназ был использован ранее сконструированный штамм *E. coli* VOX3.3 Δ4 [12] (табл. 2). В данном штамме были инактивированы гены *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, кодирующие ферменты путей смешанно-кислотного брожения, вовлекающие в побочные реакции пировиноградную кислоту и ее прямое производное – ацетил-КоА –

Таблица 3. Концентрации потребленного субстрата и основных метаболитов, секретированных исследованными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота, мМ	Уксусная кислота, мМ	Молочная кислота, мМ	Янтарная кислота, мМ	Этанол, мМ
ВОХ3.3 Δ4	19.8 ± 1.4	0.39 ± 0.04	10.1 ± 0.8	7.0 ± 0.6	2.6 ± 0.2	6.2 ± 0.4
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>fadE</i>	19.6 ± 1.3	0.35 ± 0.03	10.4 ± 0.7	6.8 ± 0.5	2.5 ± 0.2	6.4 ± 0.5
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>fabI</i>	20.3 ± 1.5	0.40 ± 0.03	10.6 ± 0.8	6.6 ± 0.4	2.9 ± 0.3	6.0 ± 0.4
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>ydiO</i>	20.0 ± 1.3	0.47 ± 0.04	9.9 ± 0.7	7.2 ± 0.6	2.7 ± 0.3	6.6 ± 0.5
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>ydiO</i> P _{irc-id-4} - <i>ydiQRST</i>	19.2 ± 1.4	0.45 ± 0.03	9.7 ± 0.7	6.9 ± 0.7	2.6 ± 0.2	6.3 ± 0.5

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

ключевой метаболит предшественник в реакциях обращенного БОЖК. Кроме того в штамме была усилена экспрессия генов *atoB* и *fadB*, кодирующих ферменты БОЖК, которые обеспечивают формирование 3-гидроксибутирил-КоА из ацетил-КоА, а также экспрессия гена тиоэстеразы II, *tesB*, способной служить терминирующим ферментом, обеспечивающим формирование карбоновых кислот из ацил-КоА-интермедиатов БОЖК. В штамме был инактивирован ген неспецифичной тиоэстеразы YciA с целью дополнительного снижения конкурентной конверсии ацетил-КоА в уксусную кислоту, а также инактивирован ген основной ацил-КоА-дегидрогеназы, *fadE*, с целью предотвращения множественного обращения БОЖК. В результате, при ферментации в пробирках штамм был способен к синтезу из глюкозы до ~6 мМ 3-гидроксимасляной кислоты в микроаэробных и до ~4 мМ 3-гидроксимасляной кислоты в анаэробных условиях за счет частичного однократного обращения БОЖК [12].

Реакции обращенного БОЖК, катализируемые 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназой и ацил-КоА дегидрогеназой, являются НАДН-потребляющими. Таким образом, анаэробные условия, исключая интенсивное окисление восстановленных эквивалентов в дыхательной электрон-транспортной цепи с участием кислорода в качестве терминального акцептора электронов, являются более предпочтительными для поддержки многократного обращения цикла. Поэтому эффективность обращения БОЖК в исследуемых штаммах оценивали по концентрациям маркерных соединений, секретированных рекомбинантами в анаэробной стадии двух-фазной аэробно-анаэробной ферментации. Соответствующий процесс культивирования, включающий аэробную стадию накопления биомассы с последующей анаэробной продуктивной стадией, был выбран потому, что штаммы *E. coli*, дефицитные по путям смешанно-кислотного брожения, не способны к анаэробному росту [17],

однако сохраняют метаболическую активность в отсутствие аэрации.

При анаэробной утилизации глюкозы базовый штамм ВОХ3.3 Δ4 синтезировал уксусную и молочную кислоты, а также этанол (табл. 3) в качестве основных продуктов потребления углеродного субстрата, не секретировав при этом, в силу делеции гена *fadE*, детектируемых количеств продуктов полного и, тем более, многократного обращения БОЖК (табл. 4).

Следует отметить, что секреция штаммом карбоновых кислот производных ацил-КоА отсутствовала, несмотря на наличие в хромосоме интактных генов *fabI* и *ydiO*. Это указывало на то, что природные уровни экспрессии соответствующих генов не могли обеспечить в клетке активность ацил-КоА-дегидрогеназы достаточную для полного функционального обращения БОЖК. Действительно, в случае *FabI* ацил-КоА-дегидрогеназная активность является побочной по отношению к основной еноил-АЦП-редуктазной активности этого белка [18] и для обеспечения эффективного восстановления кротонил-КоА, необходимого для обращения БОЖК в рекомбинантных штаммах, требуется усиление экспрессии гена *fabI* [10]. С другой стороны, экспрессия гена *ydiO*, кодирующего ацил-КоА дегидрогеназу анаэробного БОЖК [11], может быть репрессирована в присутствии кислорода [19]. Аэробные условия, использованные для накопления биомассы штамма ВОХ3.3 Δ4, препятствовали, таким образом, формированию в клетках в стадии роста такого уровня соответствующего белка, который был бы достаточен для его эффективного действия в последующей биосинтетической стадии. Кроме того, при отсутствии в среде жирных кислот экспрессия генов *fad*-регулона, в том числе *fadE*, репрессирована в *E. coli* транскрипционным регулятором *FadR* и активность соответствующих ферментов в клетке резко ограничена [20]. В совокупности, это указывало на то, что для

Таблица 4. Концентрации алифатических четырех- – восьмиуглеродных карбоновых кислот, секретированных исследованными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы в результате функционального обращения бета-окисления жирных кислот*

Штамм	Масляная кислота, мкМ	Капроновая кислота, мкМ	Каприловая кислота, мкМ
ВОХ3.3 Δ4	–	–	–
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>fadE</i>	510.7 ± 48.5	14.6 ± 1.9	11.1 ± 1.5
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>fabI</i>	471.3 ± 40.1	55.9 ± 6.7	28.8 ± 3.8
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>ydiO</i>	–	–	–
ВОХ3.3 Δ4 P _{irc-id-4} - <i>ydiO</i> P _{irc-id-4} - <i>ydiQRST</i>	162.1 ± 15.4	9.6 ± 1.2	7.2 ± 1.0

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

обеспечения в клетках рекомбинантов активностей ацил-КоА-дегидрогеназ, необходимых для эффективного обращения БОЖК, усиление экспрессии соответствующих генов являлось обязательным условием.

В штамме ВОХ3.3 Δ4 экспрессия генов ацил-КоА-С-ацетилтрансферазы, *atoB*, и тиоэстеразы II, *tesB*, контролировалась промотором P_L фага лямбда, являющегося одним из “сильнейших” для *E. coli*, в то время как перед геном 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы, *fadB*, был расположен промотор P_{irc-ideal-4}, несколько уступающий по “силе” P_L-промотору [15]. Соответствующие промоторы, в составе искусственных регуляторных элементов, содержащих эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, были расположены перед указанными генами для обеспечения, в первую очередь, возможности эффективной инициации обращения БОЖК и последующего формирования детектируемых продуктов из КоА-интермедиатов цикла, тогда как интенсивность протекания промежуточных реакций могла быть несколько снижена. Таким образом, с целью предотвращения потенциального дисбаланса между инициацией обращения БОЖК, формированием интермедиатов цикла и синтезом конечных продуктов, природные регуляторные области генов *fadE*, *fabI* и *ydiO* в штаммах производных ВОХ3.3 Δ4 были также заменены искусственным регуляторным элементом P_{irc-ideal-4}-SD_{φ10}.

Все соответствующие рекомбинанты формировали при анаэробной утилизации глюкозы профили основных секретированных метаболитов, сходные с таковым, продемонстрированным родителем штаммом ВОХ3.3 Δ4 (табл. 3). Основными продуктами утилизации глюкозы, сформированными штаммами, являлись уксусная кислота и этанол, выходы которых составляли ~0.5 и ~0.3 моль/моль, а также молочная кислота, выход которой достигал ~0.35 моль/моль.

Секрета штаммами значительной доли потребленной глюкозы в виде уксусной кислоты и

этанола, являющихся прямыми производными ацетил-КоА, ключевого предшественника в реакциях обращенного БОЖК, а также молочной кислоты, являющейся, наряду с этанолом, продуктом НАДН-потребляющих реакций, указывала на невысокую интенсивность функционирования в рекомбинантах целевого биосинтетического пути. Тем не менее, штаммы ВОХ3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fadE* и ВОХ3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fabI* секретировали заметные количества масляной, капроновой и каприловой кислот (табл. 4), являющихся четырех-, шести- и восьмиуглеродными продуктами полноценного однократного, двухкратного и трехкратного обращений БОЖК. При этом количество синтезированной штаммами масляной кислоты кратно превосходило количество сформированных ими шести- и восьмиуглеродных карбоксилатов. По-видимому, это было связано, в первую очередь, с недостаточно высокой специфичностью ацил-КоА-С-ацетилтрансферазы AtoB к ацил-КоА-субстратам, содержащим в углеводородной цепи более 4 атомов углерода [21]. Действительно, этот фермент предпочтительно принимает участие в катализе терминальных стадий деградации липидов, тогда как в расщепление более высокомолекулярных интермедиатов вовлекается 3-кетоацил-КоА-тиолаза FadA [21].

Использованные в настоящей работе рекомбинантные продуценты являлись модельными, тогда как при конструировании промышленных штаммов указанная проблема может быть решена при совместном усилении в клетках экспрессии генов *atoB* и *fadA* под контролем промоторов обладающих различной силой и регуляцией. Тем не менее, полученные данные позволяли заключить, что использование FabI в качестве ацил-КоА-дегидрогеназы в большей степени способствует многократному обращению БОЖК, нежели применение с данной целью FadE. Действительно, количество синтезированных штаммом ВОХ3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fabI* капроновой и каприловой кислот в 3.8 и 2.6 раз превосходило аналогичные показатели штамма ВОХ3.3 Δ4 P_{irc-id-4}-*fadE*. Однако, в настоящее время фер-

ментативные свойства FadE и FabI, как ацил-КоА-дегидрогеназ/еноил-КоА-редуктаз, изучены мало. Сообщалось о значительно различающихся показателях специфической ацил-КоА-дегидрогеназной активности для этих белков, составляющей 0.019 и 0.001 мкмоль/мг/мин для FadE и FabI в отношении бутирил-КоА для штаммов, экспрессирующих соответствующие гены в составе идентичных базовых плазмид [10]. При этом данные о константе Михаэлиса в отношении кротонил-КоА, полученные для очищенного варианта рекомбинантного FabI, свидетельствуют о его крайне низком сродстве к соответствующему субстрату.

Таким образом, с точки зрения прикладной биотехнологии, достижение эффективного обращения БОЖК должно основываться, на наш взгляд, на направленной манипуляции уровнями экспрессии ключевых генов с анализом эффективности конверсии субстрата в целевые продукты для последующего выбора стратегии рационального конструирования промышленных продуцентов, а не на данных об их ферментативной активности. Вместе с тем, сообщалось о специфической активности YdiO в отношении бутирил-КоА, составляющей 0.003 мкмоль/мг/мин, что сравнимо с показателем FabI [10]. Однако, штамм VOX3.3 Δ4 P_{trc-id-4}-ydiO при анаэробной утилизации глюкозы не синтезировал заметных количеств маркерных соединений, свидетельствующих о полном функциональном обращении БОЖК (табл. 4). Ацил-КоА-дегидрогеназа, принимающая участие в *E. coli* в анаэробном БОЖК, является, по аналогии с кластридиями, сложным ферментативным комплексом, вовлекающим в свое функционирование флавопротеины, обеспечивающие транспорт электронов к терминальному акцептору. Соответствующие белки в *E. coli* кодируют гены оперона ydiQRST [11], поэтому для обеспечения активности анаэробной ацил-КоА-дегидрогеназы YdiO экспрессия генов данного оперона была дополнительно усилена в клетках штамма VOX3.3 Δ4 P_{trc-id-4}-ydiO. Итоговый рекомбинант VOX3.3 Δ4 P_{trc-id-4}-ydiO P_{trc-id-4}-ydiQRST синтезировал полный спектр продуктов трехкратного обращения БОЖК (табл. 4) с эффективностью, тем не менее, сниженной по отношению к штаммам VOX3.3 Δ4 P_{trc-id-4}-fadE и VOX3.3 Δ4 P_{trc-id-4}-fabI. В данной связи нельзя было исключить необходимости участия других коллатеральных ферментов в обеспечении максимальной функциональной активности в *E. coli* анаэробной ацил-КоА-дегидрогеназы YdiO/YdiQRST, аналогичной таковой, принимающей участие в консервации энергии в клетках облигатных анаэробов и требующей скоординированного действия множества ферментов, вовлеченных в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза [22]. С учетом сложности обеспечения полноценной

функциональной активности анаэробной ацил-КоА-дегидрогеназы для обращения БОЖК в клетках рекомбинантов, полученные данные свидетельствовали о предпочтительном использовании аэробных ферментов для форсированной инверсии данного пути в биосинтетическую сторону.

В результате проведенных исследований охарактеризована способность нативных ацил-КоА-дегидрогеназ обеспечивать в рекомбинантных штаммах *E. coli* многократное обращение БОЖК для потенциальной продукции востребованных промышленностью соединений. Установлено, что максимальная эффективность оборачиваемости цикла достигается повышением уровня экспрессии в рекомбинантных штаммах гена, кодирующего еноил-АЦП-редуктазу/ацил-КоА-дегидрогеназу FabI. Альтернативой может служить усиление экспрессии гена ацил-КоА дегидрогеназы FadE при соблюдении оптимального баланса между активностями ферментов, вовлеченных в целевой биосинтетический путь.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park J., Rodríguez-Moyá M., Li M., Pichersky E., San K.Y., Gonzalez R. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 39. № 11. P. 1703–1712.
2. Martin C.H., Dhamankar H., Tseng H.C., Sheppard M.J., Reisch C.R., Prather K.L. // Nat. Commun. 2013. V. 4. № 1414. <https://doi.org/10.1038/ncomms2418>
3. Zhang K., Sawaya M.R., Eisenberg D.S., Liao J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 52. P. 20653–20658.
4. Clomburg J.M., Blankschien M.D., Vick J.E., Chou A., Kim S., Gonzalez R. // Metab. Eng. 2015. V. 28. P. 202–212.
5. Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R. // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 5. P. 556–561.
6. Zhou S., Hao T., Xu S., Deng Y. // Biotechnol. Adv. 2020. V. 43. № 107575. [doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107575](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107575)
7. Kim S., Cheong S., Chou A., Gonzalez R. // Curr. Opin. Biotechnol. 2016. V. 42. P. 206–215.
8. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 3. P. 463–469.
9. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
10. Vick J.E., Clomburg J.M., Blankschien M.D., Chou A., Kim S., Gonzalez R. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. № 4. P. 1406–1416.
11. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1210–1214.

12. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
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. Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Биотехнология. 2006. Т. 3. С. 6–16.
16. 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.
17. Fischer C.R., Tseng H.C., Tai M., Prather K.L., Stephanopoulos G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 1. P. 265–275.
18. Bergler H., Wallner P., Ebeling A., Leitinger B., Fuchsbi-chler S., Aschauer H., Kollenz G., Högenauer G., Tur-nowsky F. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 8. P. 5493–5496.
19. Cho B.K., Knight E.M., Palsson B.Ø. // Microbiology. 2006. V. 152. № 8. P. 2207–2219.
20. Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 4. P. 829–389.
21. Clark D.P., Cronan J.E. // EcoSal Plus. 2005. V. 1 № 2. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.4>
22. Buckel W., Thauer R.K. // Chem. Rev. 2018. V. 118. № 7. P. 3862–3886.

Evaluation of the Efficiency of Functional Reversal of the Fatty Acid β -Oxidation in *Escherichia coli* upon the Action of Various Native Acyl-CoA Dehydrogenases

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

^a Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

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

Using *Escherichia coli* strain MG1655 *lacI*^Q, $\Delta ackA$ -*pta*, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta fadE$, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, $\Delta yciA$ as a core strain, the efficiency of the reversal of fatty acid β -oxidation upon the action of native cellular enzymes capable of serving as acyl-CoA dehydrogenases was examined. Increased expression of *fadE*, *fabI*, and *ydiO/ydiQRST* genes encoding the corresponding enzymes was ensured in derivatives of the core strain by the substituting of their native regulatory regions with the artificial regulatory element P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}. A three-turns reversal of the cycle in the engineered recombinants was demonstrated that was accompanied by the considerable secretion of butyric, caproic, and caprylic acids. The highest level of six- and eight-carbon carboxylates production was achieved upon the overexpression of the *fabI* gene, while the lowest levels of secretion of the corresponding compounds were demonstrated by the strain with the enhanced expression of the *ydiO* and *ydiQRST* genes. The recombinant with the individually enhanced expression of *ydiO* solely did not produce detectable amounts of the derivatives of the complete and successful β -oxidation reversal.

Keywords: acyl-CoA dehydrogenase, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering, *Escherichia coli*