

УДК 66.047

### УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ L-ТРЕОНИНА ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПУТЁМ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЦИТРАМАЛАТСИНТАЗЫ

Т.В. Выборная, Д.М. Бубнов, С.С. Филиппова, С.П. Синеокий

НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, 117545

Целью представленной работы было конструирование штамма *Escherichia coli*, отличающегося высокой продуктивностью L-треонина (треонина). Важнейшей задачей при конструировании штаммов продуцентов является инактивация путей деградации целевого продукта. На сегодняшний день известны три пути деградации треонина в клетках *E. coli*, осуществляемые группами ферментов: треониндегидрогеназами, треонинальдолазами и треониндеаминазами. Главную роль в деградации треонина играет треониндегидрогеназа, кодируемая геном *tdh*. Показано, что инактивация гена оказывает положительный эффект на продукцию треонина [1], [2]. Предположительно существует еще один ген, кодирующий НАД-зависимую треониндегидрогеназу, *yiaY* [3]. В литературе встречаются противоречивые данные о фенотипе штаммов с делецией по гену *yiaY* [3, 4]. Инактивация гена *ltaE*, кодирующего треонинальдолазу, также приводит к увеличению продукции треонина [5]. Активностью треонинальдолазы обладает фермент серингидрокси метилтрансфераза, кодируемый геном *glyA* [6]. Однако инактивировать *glyA* в штамме продуценте нецелесообразно, так как в отсутствие GlyA штамм становится ауксотрофом по глицину [7]. В клетках *E. coli* синтезируются две треониндеаминазы, кодируемые генами треониндеаминазы, *ilvA* и *tdcB*. Делеция гена *tdcB* способствует повышению продукции треонина так же, как и инактивация других генов пути деградации треонина [8].

С целью повышения уровня продукции треонина мы предложили инактивировать все возможные пути деградации аминокислоты, а именно конструировать штамм, несущий делеции *Δtdh*, *ΔyiaY*, *ΔltaE*, *ΔtdcB*, *ΔilvA*. Штамм, несущий указанные делеции, не способен катаболизировать треонин, однако он также не способен синтезировать изолейцин. Для восстановления прототрофности по изолейцину без потери конверсии треонина было предложено экспрессировать в штамме продуценте гетерологичный ген *cimA* из *Leptospira interrogans*, кодирующий цитрамалатсинтазу [9]. CimA осуществляет реакцию превращения пирувата в цитрамалат. Несмотря на то, что в клетках *E. coli* данный фермент не синтезируется, цитрамалат может быть превращен в альфа-кетобутират ферментами изопропилмалатизомеразой и изопропилмалатдегидрогеназой, кодируемыми генами биосинтеза пути лейцина, *leuCD* и *leuB*, соответственно. Далее из альфа-кетобутирата синтезируется изолейцин. Таким образом, посредством экспрессии гетерологичного гена *cimA* *L. interrogans* в клетках *E. coli*, несущих делецию *ΔilvA*, изолейцин синтезируется по альтернативному пути, не из треонина, а из пирувата.

Конструирование высокопродуктивного штамма проводили на основе ранее разработанного в ГосНИИгенетика штамма *E. coli* В-632 [10]. После введения в геном делеции гена *ilvA* результирующий штамм В926 накапливал треонин на 25 % выше по сравнению с родительским в условиях пробирочной ферментации 14,4 и 11,5 г/л, соответственно. Экспрессию гена *cimA* в хромосоме проводили как под регуляцией конститутивного, так и регулируемого промоторов. С целью подбора оптимального уровня экспрессии гена *cimA* была разработана система для индуцируемой экспрессии генов на основе промотора P<sub>LtetO-1</sub>. Данная система является универсальной и не требует специальной подготовки штамма.

Регуляция экспрессии целевого гена происходит посредством добавления в среду индуктора, ангидротетрациклина (АТс). По результатам ряда ферментаций проведен подбор концентрации индуктора, при которой достигается максимальная продукция треонина, а именно свыше 100 г/л при концентрации АТс 25 нг/мл в ферментере. В данных условиях штамм обнаруживает максимальную конверсию глюкозы в треонин, равную 45 %. Показано, что при увеличении уровня сверхэкспрессии гена *simA* приводит к увеличению уровня компенсации ауксотрофности и переключению метаболизма с синтеза треонина на синтез биомассы.

В представленной работе продемонстрирована возможность использования альтернативного пути синтеза изолейцина в штаммах *E. coli* продуцентах треонина. Дальнейшее развитие работы предполагает скрининг ферментов цитрамалатсинтаз из различных источников и направленную модификацию ферментов с целью уменьшения сродства к пирувату, а также подбор конститутивных промоторов с оптимальным уровнем экспрессии, обеспечивающих, максимальное накопление треонина в ферментационной среде.

*Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61017x0011) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Биндер Т.П., Брэдшоу Д.С., Ванг М.Д., Лио Х.Д., Свишер С.Л., Хэнк П.Д. Штамм микроорганизма *Escherichia coli* – продуцент L-треонина, способ получения продуцирующего L-треонин штамма *E.coli* и способ получения L-треонина (варианты). Патент РФ RU2212448
2. Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Molecular systems biology*. 2007, 3 (1), 1349.
3. Ma F., Wang T., Ma X., et al. Identification and characterization of protein encoded by orf382 as L-threonine dehydrogenase. *J Microbiol Biotechnol*. 2014, 24. 748–755.
4. Baba T., Ara T., Hasegawa M., et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*. 2006, 2 (1).
5. Рыбак К.В., Сливинская Е.А., Саврасова Е.А., Казиева Е.Д., Ахвердян В.З. Способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован ген *ltaE*. Патент РФ RU2304166, C12N1/21, C12P13/08, C12R1/19 2007.
6. Schirch L.V., Gross T. Serine transhydroxymethylase identification as the threonine and allothreonine aldolases. *Journal of Biological Chemistry*. 1968, 243 (21), 5651–5655.
7. Pizer L.I. Glycine synthesis and metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1965, 89 (4), 1145–1150.
8. Пак, Д.У., Ли, Б.Ч., Ким, Д.Ч., Ли, Д.Х., Чо, Д.У., Пак, У.Х. Способ получения L-треонина. Патент РФ RU2288265
9. Xu H., Zhang Y., Guo X., et al. Isoleucine biosynthesis in *Leptospira interrogans* serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine-independent pathway. *Journal of bacteriology*. 2004, 186 (16), 5400–5409.
10. Т.В. Выборная, Т.В. Юзбашев, А.С. Федоров и др. Использование альтернативного пути синтеза изолейцина в штаммах *Escherichia coli* продуцентах треонина. *Биотехнология*. 2019, 35(4)