

На правах рукописи

Киверо Александр Дмитриевич

**Создание эффективного процесса
биотрансформации L-изолейцина в
4-гидроксиизолейцин методами
метаболической инженерии
Escherichia coli.**

Специальность:

03.01.06- Биотехнология (в том числе и бионанотехнология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2012 год

Работа выполнена в лаборатории №3 Закрытого Акционерного Общества
“Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика” (ЗАО АГРИ).

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Сергей Васильевич Смирнов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Складнев Дмитрий Анатольевич
Институт микробиологии им. С.Н.
Виноградского РАН, главный научный
сотрудник

доктор биологических наук, профессор
Синеокий Сергей Павлович
Государственный научно-
исследовательский институт
Генетики и селекции промышленных
микроорганизмов, заведующий
лабораторией № 14.

Ведущая организация: **Учреждение Российской академии наук
Центр “Биоинженерия” РАН**

Защита состоится « » апреля 2012 г. в 10 час.30 мин. на заседании
объединённого диссертационного совета ДМ 212.204.13 в Российском химико-
технологическом университете имени Д. И. Менделеева по адресу:
125047, г. Москва, Миусская пл., д. 9, в 443 аудитории (конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре
РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «____» _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ДМ 212.204.13

Шакир Ирина Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

На протяжении столетий жители Средиземноморья, северной Африки, Индии использовали семена фенугрека (*Trigonella foenum-graecum L.*) в качестве природного лекарственного средства для улучшения пищеварения, лечения лихорадки, бронхита, усиления лактации у кормящих матерей. Отдельное внимание исследователей привлекали антидиабетические свойства экстрактов из семян фенугрека. Изучение “молекулярных основ” биологической активности фенугрека привело исследователей к открытию инсулинотропной активности (2S, 3R, 4S)-4-гидроксиизолейцина (4-HIL) - свободной неканонической аминокислоты, в большом количестве содержащейся в его семенах (до 30-50% относительно общего пула всех свободных аминокислот). Было показано, что 4-HIL стимулирует секрецию инсулина β -клетками островков Лангерганса, изолированных из поджелудочной железы крысы и человека (Sauvaire, Y. et al, 1998). При этом действие 4-HIL строго зависит от концентрации глюкозы, т.е. существенное усиление секреции инсулина в присутствии 4-HIL наблюдалось лишь при концентрации глюкозы от 6 мМ и выше. В отличие от множества современных химических лекарственных препаратов (например - производных сульфонилмочевины), действие 4-HIL строго пропорционально концентрации глюкозы (Jackson et al., 1981; Jennings et al.1989), что позволяет регулярно использовать 4-HIL в качестве пищевой добавки, не опасаясь возникновения состояния гипогликемии.

Помимо своей инсулинотропной активности, 4-HIL улучшает инсулинорезистентность клеток скелетных мышц и печени посредством активации фосфоинозитид-3 (PI3) киназной активности, ассоциированной с субстратом инсулинового рецептора (IRS-1) (Jette et al 2009). Исследования на грызунах показали, что 4-HIL является эффективным средством постоянного контроля над весом тела, гликемией и инсулинемией (Jette et al 2009). Таким образом, 4-HIL является перспективной диетической добавкой для лечения и предотвращения диабета второго типа.

В настоящее время сформировался рынок биологически активных добавок, содержащих 4-HIL. Во-первых, считают, что его инсулинотропная активность (при отсутствии инсулинорезистентности) помогает запастись энергией в мышечной ткани (в виде гликогена) и способствует, таким образом, ее пролиферации у спортсменов,

занимающихся наращиванием мышечной массы. С другой стороны, 4-НП предлагается использовать как антигипогликемический компонент комплексных биологически активных пищевых добавок.

В настоящее время, потребность в 4-НП удовлетворяется только за счет его экстракции из семян фенугрека. Однако, необходимость введения стадий очистки 4-НП от сопутствующих биогенных компонентов (включая биологически неактивные изомеры 4-НП) приводит к существенному удорожанию конечного препарата ($\approx 100\$/\text{грамм}$ очищенного 4-НП), что в свою очередь, сказывается на цене содержащих 4-НП комплексных БАДов и ограничивает рынок их сбыта. Кроме того, на стоимость 4-НП влияет также сезонность получения сырья (семян фенугрека). Маркетологами подсчитано, что для массового продвижения 4-НП на рынке пищевых добавок к продуктам питания, необходимо на порядок снизить его себестоимость.

Предложенные на сегодняшний день методы химического синтеза 4-НП сложны и дороги, а, следовательно, не могут решить поставленную задачу (Wang et al., 2002; Rolland-Fulcrand et al., 2004). Кроме того, одним из последних мировых маркетинговых трендов является активное продвижение на рынок “натуральных продуктов” (natural foods), содержащих “биогенные” компоненты и не включающие “химически синтезированные суррогаты”.

Для крупной биотехнологической компании (например, Ajinomoto), специализирующейся на промышленном производстве аминокислот, в том числе L-изолейцина, биотрансформация последнего в 4-НП является очевидным решением поставленной выше задачи. В этом случае, согласно экономическим расчетам, удалось бы существенно снизить себестоимость 4-НП, обеспечив, таким образом, его эффективное продвижение на рынке пищевых добавок.

Таким образом, задача создания эффективного процесса биотрансформации L-изолейцина в 4-НП, пригодного для использования в промышленных масштабах является достаточно актуальной.

Цели и задачи работы.

Цель представляемой диссертационной работы - создание на основе клеток *E. coli* штамма, обладающего способностью к высокоэффективной биотрансформации L-изолейцина в 4-НПЛ. В процессе работы решались следующие задачи:

1. Идентификация и клонирование гена *ido*, кодирующего L-изолейцин-4-гидроксилазу (IDO) в штамме *Bacillus thuringiensis* 2-е-2.
2. Создание экспрессионного плазмидного вектора, обеспечивающего эффективную продукцию L-изолейцин диоксигеназы в клетках *E. coli*.
3. Метаболическая инженерия *E. coli* с целью обеспечения высокой эффективности биотрансформации L-изолейцина в 4-НПЛ.
4. Оптимизация метаболизма глюкозы *E. coli* для более экономичной биотрансформации L-изолейцина.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В ходе работы впервые идентифицирован и клонирован ген *ido*, кодирующий L-изолейцин-4-гидроксилазу в геноме штамма *Bacillus thuringiensis* (2-е-2). Установлена аминокислотная последовательность, соответствующая процессированной активной форме IDO.

Впервые предложена и реализована схема модификации метаболизма *E. coli* для эффективной биотрансформации субстрата в его целевую гидрокси-форму на основе взаимообусловленности клеточного роста и реакции гидроксилирования. Сконструированный по указанной схеме штамм *E. coli* MG1655 (*sucAB::λattB-P_{tac}*, *aceAK::λattB*, *zwf,edd,eda::λattB*, *brnQ::λattB-P_L-brnQ*)[pEL-IDO(Lys, 2-е-2)] внедряется в настоящее время для промышленного производства 4-НПЛ. Предложенный подход позволил снизить себестоимость производства 4-НПЛ на порядок по сравнению с технологией его экстракции из семян фенугрека. В дальнейшем сконструированный штамм может быть использован (при соблюдении определённых условий) для гидроксилирования других субстратов, что имеет очевидное практическое значение.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из 6 разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и Методов, Результатов и Обсуждения, Выводов и Списка литературы;

иллюстрирована 10 таблицами и 33 рисунками. Библиография содержит 153 наименований.

Апробация работы.

Результаты работы представлены на Всероссийском симпозиуме «Биотехнология микробов». Москва. 20 – 23 октября, 2004 г; Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее». Москва, МГУ. 27 - 29 января, 2011 г.; 6-th International Congress "Biotechnology - state of the art and prospects of development", Moscow, Russia, March 21-25, 2011г.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основные результаты и их обсуждение

1. Идентификация гена *ido* из *Bacillus thuringiensis* (2-e-2).

Результаты экспериментов по выращиванию проростков фенугрека в присутствии меченого C^{14} -L-изолейцина однозначно показывали, что 4-ННЛ является продуктом прямого гидроксирования L-изолейцина (Leslie Fowden et. al. 1973, Рис. 1). Позже, было показано, что в клетках проростков фенугрека эта реакция катализируется Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимой диоксигеназой (IDO). В силу необратимости и эффективности диоксигеназной реакции, биотрансформация L-изолейцина в 4-ННЛ бактериальными клетками, продуцирующими IDO, является оптимальным вариантом для создания соответствующего биотехнологического производства. Поэтому, на протяжении ряда лет, нашими коллегами из Киотского университета велись интенсивные поиски этого фермента.

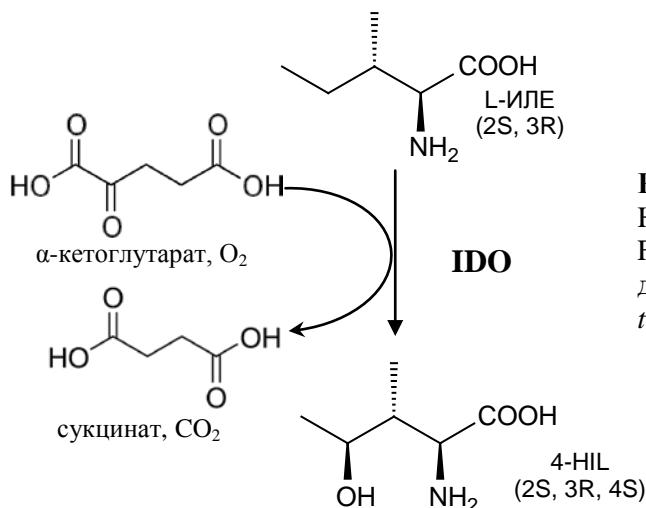


Рисунок 1. Структура молекулы 4-ННЛ и схема его синтеза с помощью Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимой диоксигеназы IDO из *Bacillus thuringiensis* 2-e-2.

В результате скрининга порядка 2000 микроорганизмов был отобран штамм *Bacillus thuringiensis 2-e-2*, в грубых клеточных экстрактах которого обнаружена активность стерео-специфической Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимой L-изолейцин-диоксигеназы (Рис.1).

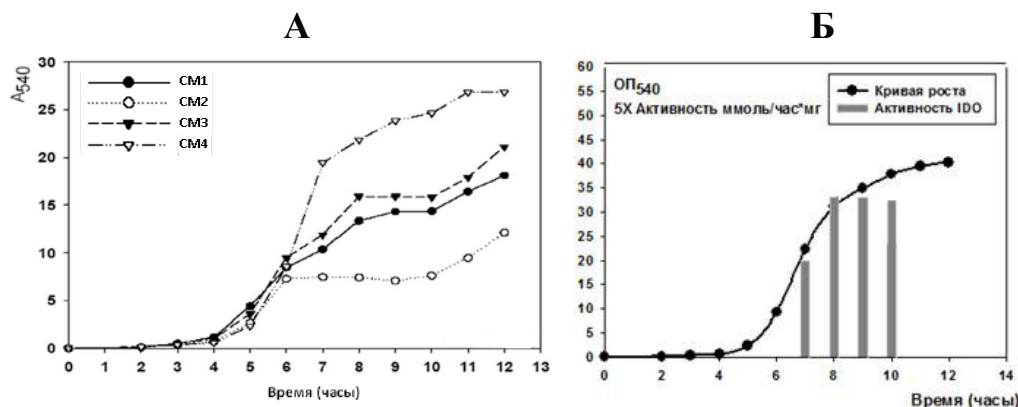


Рисунок 2. Выбор условий культивирования *Bacillus thuringiensis 2-e-2*. А Кривые роста штамма *Bacillus thuringiensis 2-e-2*, культивируемого на синтетических средах СМ1-4; **Б** Уровень активности IDO в клетках штамма *Bacillus thuringiensis (2-e-2)* в зависимости от времени культивирования на среде СМ4.

Для идентификации и клонирования соответствующего гена из *Bacillus thuringiensis 2-e-2*, мы применили современный подход, основанный на идентификации белка по масс-спектру его триптических пептидов, предполагая, что очищенный белок IDO можно будет идентифицировать среди всех открытых рамок считывания штамма *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* ATCC 35646 с известной последовательностью генома. Для выделения IDO в количестве достаточном для анализа, необходимо было получить биомассу с максимально возможной удельной активностью. С этой целью был изучен профиль активности IDO в процессе роста периодической культуры клеток *Bacillus thuringiensis 2-e-2* на различных синтетических средах в 1 л. ферментере. Максимальная индукция активности IDO была достигнута при культивировании *Bacillus thuringiensis 2-e-2* на богатой комплексной среде СМ4 (Рис. 2 А). Было показано, что профиль удельной активности IDO характеризуется относительно высоким и “узким” максимумом в области перехода клеточной культуры из логарифмической фазы роста в стационарную.

Максимум временной зависимости удельной активности IDO приходился примерно на 10 час процесса культивирования (Рис. 2 Б). Поэтому, для выделения IDO мы использовали биомассу, выращенную в течение 10 часов.

Разработанная процедура очистки IDO из клеточного лизата *Bacillus thuringiensis* 2-e-2 включала ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе, фракционирование осаждением при использовании сульфата аммония, гель-фильтрацию (FPLC на колонке Superdex 200 HR) и финальную ионообменную хроматографию (FPLC на колонке Source 15Q) (Таблица 1).

Сравнительный анализ белкового состава фракций, полученных на разных этапах очистки (методом электрофореза в ПААГ) и данных по кратности очистки на каждом этапе (Табл. 1), позволили идентифицировать мажорную зону белка, соответствующего IDO активности (Рис. 3) Анализ масс-спектра триптических пептидов белка, элюированного из ПААГ показал, что IDO соответствует открытой рамки считывания RBTH_06809 из генома штамма *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* ATCC 35646.

Таблица 1. Очистка IDO из клеточного лизата *Bacillus thuringiensis* (2-e-2).

Шаг	Всего белка (мг)	Полная активность (нмоль/мин)	Удельная активность (нмоль/мин*мг)	Степень очистки
Клеточный лизат	3072±301	19046±2051	6.1±0.6	1
ДЭАЭ-сефароза	1500±179	18750±2080	12.5±1.1	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	109±10	12514±1320	115±12	19
Superdex 200 HR 10/30A	6.0±0.5	1356±142	226±24	38
Source 15Q	0.031±0.003	21±2	700±68	117

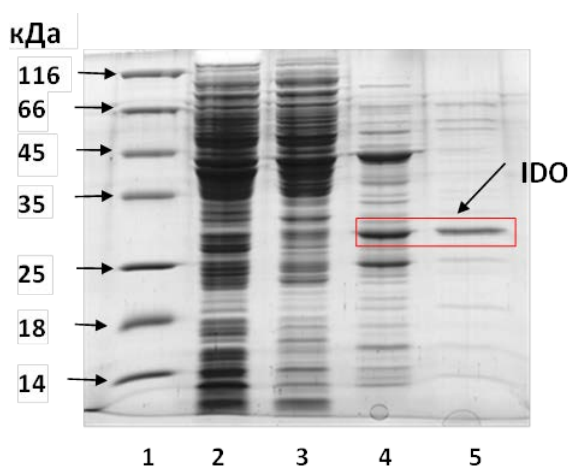


Рисунок 3. Электрофоретический анализ белков из фракций, полученных на разных стадиях очистки IDO в ПААГ в денатурирующих условиях. Линии: 1 – маркер молекулярных весов; 2 – клеточный лизат; 3 – после осаждения сульфатом аммония; 4 – после колонки Superdex 200 HR 10/30A; 5 – после колонки Source15Q.

В качестве дополнительного контроля был использован сиквенс N-концевой аминокислотной последовательности элюированного белка. Определенная последовательность NH₂-Lys-Met-Ser-Gly-Phe-Ser также присутствовала внутри RBTH_06809 (см. также Рис. 4). Таким образом, было показано, что L-изолейцин-4-гидроксилазу кодирует ген RBTH_06809.

2. Клонирование гена *ido* и его экспрессия в клетках *E. coli*.

Согласно экспериментальным данным, N-концевым аминокислотным остатком активной IDO является Lys (12), в то время как из анализа генома следует, что Met (6) является очевидным стартом трансляции RBTH_06809 (Рис. 4).

Фрагмент сиквенса генома *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* ATCC35646 (RBTH_06809 ORF).

```

      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14
      MetGluValPheIleMetThrPheValLeuSerLysMetSer
5'... gtggaggtttttataatgacgtttgttccttagtaaaatgag....3'
      SD

```

1 – аннотированный старт трансляции RBTH_06809

6 – возможный старт начала трансляции RBTH_06809

12 –N- концевая аминокислота IDO из *Bacillus thuringiensis 2-e-2*

Рисунок 4. Определение старта трансляции мРНК гена *ido*.

Это несоответствие могло быть следствием специфического процессинга IDO, влияющего на ее активность. Поэтому, мы решили клонировать ген *ido* таким образом, чтобы Lys(12) оказался первым аминокислотным остатком в синтезированной IDO после пост-трансляционного отщепления N-формилметионина.

В качестве источника гена *ido* нами была использована хромосомная ДНК штаммов *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* ATCC 35646 и *Bacillus thuringiensis 2-e-2*. В обоих случаях, олигопраймеры для ПЦР-амплификации целевого гена были синтезированы согласно нуклеотидной последовательностью RBTH_06809. В результате были сконструированы плазмиды рMW119-IDO (Lys, 2-e-2/ATCC), в составе которых ген *ido*(Lys, 2-e-2) из *Bacillus thuringiensis 2-e-2* и ген *ido*(Lys, ATCC) из *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* ATCC 35646 экспрессировались под контролем промотора лактозного оперона. Анализ активности IDO в клеточных лизатах плазмидных штаммов двух типов показал, что удельная активность в клетках экспрессирующих *ido*(Lys, 2-e-2) выше, чем в клетках экспрессирующих *ido*(Lys, ATCC). Первичную структуру клонированных генов *ido*(Lys, 2-e-2/ATCC) определяли с помощью сиквенирования. Анализ полученных данных выявил значительные расхождения в первичных структурах трех фрагментов. Было обнаружено 21 несоответствие между сиквенсом RBTH_06809 и *ido*(Lys, ATCC/2-e-2), и, как следствие, 5 несоответствий в аминокислотных последовательностях соответствующих белков. С другой стороны, сравнение последовательностей

клонированных генов *ido*(Lys, 2-e-2) и *ido*(Lys, ATCC) выявило только четыре несоответствия в кодирующих частях, что привело только к одному значимому отличию в белках (Arg116His). Из предположения, что именно эта замена может быть причиной различий в активностях IDO(Lys, 2-e-2) и IDO(Lys, ATCC), мы выбрали IDO (Lys, 2-e-2) для последующих экспериментов.

С целью увеличения уровня экспрессии *ido*, мы переклонировали соответствующий *Bam*HI-*Sac*I фрагмент на мультикопийный вектор pELAC. Удельная активность IDO в клеточных лизатах плазмидного штамма MG1655[pELAC-IDO (Lys, 2-e-2)] составила порядка 300 нмоль/мин*мг (в условиях индукции лактозного (P_{lacUV5}) промотора). Вектор pELAC, будучи производной плазмиды pET22 (b+), содержал копию гена лактозного репрессора *lacI*. Таким образом, для полной индукции синтеза IDO требовалось добавление ИПТГ. Чтобы избежать этого ограничения и добиться конститутивной экспрессии *ido* мы сконструировали производный вектор pEL-IDO (Lys, 2-e-2), в котором ген *lacI* был делетирован.

3. Разработка “динамической” биотрансформации L-изолейцина в 4-НП: сопряжение клеточного роста и гидроксирования L-изолейцина в штамме 2Δ.

Целью данного этапа нашей работы было модифицировать метаболизм *E. coli* таким образом, чтобы процесс гидроксирования L-изолейцина являлся необходимым условием роста клеток. Такой "динамический" подход представлялся нам более предпочтительным (с точки зрения биотехнологии), чем "статический" вариант, в котором сложнее поддерживать стерильность и активность выращенной биомассы.

Уникальным свойством диоксигеназной реакции является сопряжение реакций гидроксирования субстрата и окисления (декарбоксилирующего) α -кетоглутарата до сукцината (Hausinger RP 2004). Поэтому в случае, когда другие пути синтеза сукцината заблокированы, активность IDO может шунтировать ЦТК. Очевидно, что при этом, окисление L-изолейцина является необходимым условием для роста клеток (Рис. 5). В кишечной палочке сукцинат может быть синтезирован: 1) из α -кетоглутарата с помощью α -кетоглутаратдегидрогеназы (EC 1.2.4.2), 2) из

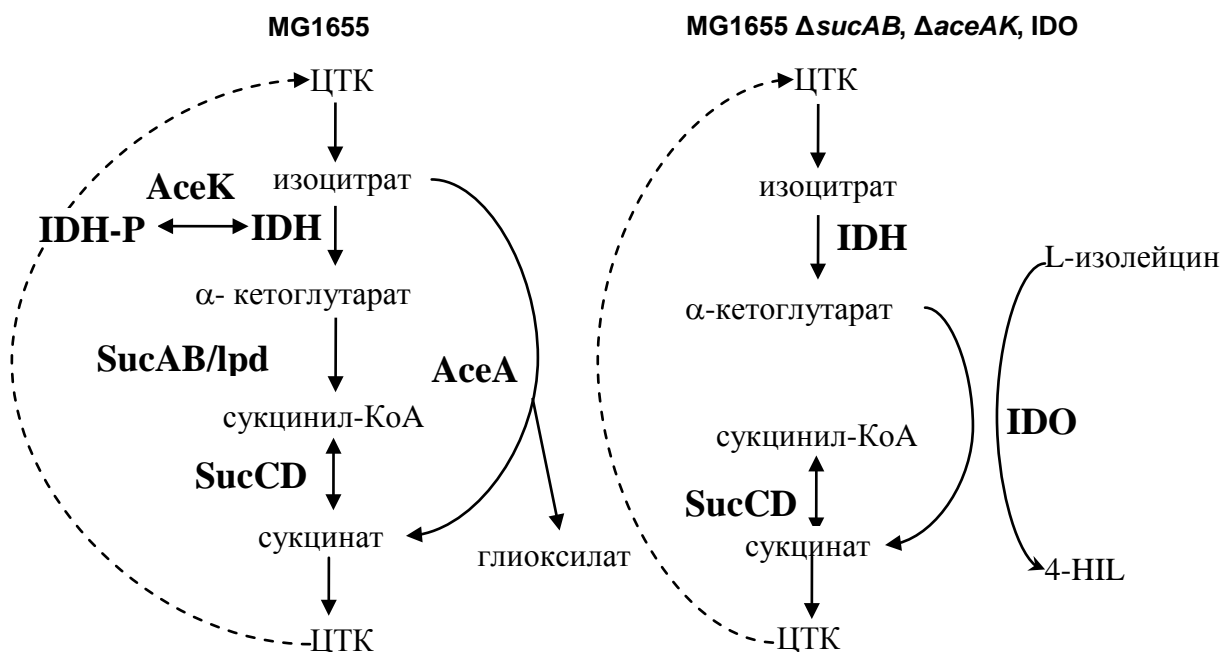


Рисунок 5. Шунтирование ЦТК в штамме 2Δ [pELAC-IDO(Lys, 2-e-2)] за счет сопряжения реакций гидроксирования L-изолейцина и окисления α-кетоглутарата. Обозначения: IDH – изоцитратдегидрогеназа; SucCD – сукцинил-КоА синтетаза; AceK – киназа/фосфатаза изоцитратдегидрогеназы; SucAB/lpd – α-кетоглутаратдегидрогеназы; AceA – изоцитратлиаза.

изоцитрата с помощью изоцитратлиазы (EC 4.1.3.1), 3) из оксалоацетата через восстановительную ветвь ЦТК, 4) из L-глутамата и L-аргинина с помощью ферментов пути катаболизма γ-аминобутирата. (Самсонова и др. 2005). Однако, для блокирования синтеза сукцината в *E. coli* в аэробных условиях на среде с глюкозой/глицерином в качестве источника углерода достаточно делеции генов *sucA* *sucB* и *aceA*. Введение в штамм с генотипом Δ*sucA* Δ*sucB* Δ*aceA* активной IDO восстанавливает рост клеток в присутствии L-изолейцина, шунтируя, таким образом, заблокированный ЦТК. Способность штамма 2Δ с активной IDO расти на среде без L-изолейцина указывает на возможность использования эндогенно синтезированного L-изолейцина для шунтирования ЦТК. Этот факт, в свою очередь, указывает на возможность создания штамма-продуцента 4-НПЛ путем соответствующей метаболической реконструкции штамма-продуцента L-изолейцина.

Кроме указанных выше основных делеций, штамм 2Δ содержал ряд дополнительных модификаций оптимизирующих процесс биотрансформации. Поскольку киназа/фосфатаза изоцитратдегидрогеназы / (EC 2.7.11.5, AceK) может инактивировать изоцитратдегидрогеназу и ослаблять синтез α-кетоглутарата нами была введена делеция гена *aceK*. Для улучшения транспорта L-изолейцина внутрь клетки был усилен синтез его специфического Na⁺-зависимого транспортера BrnQ

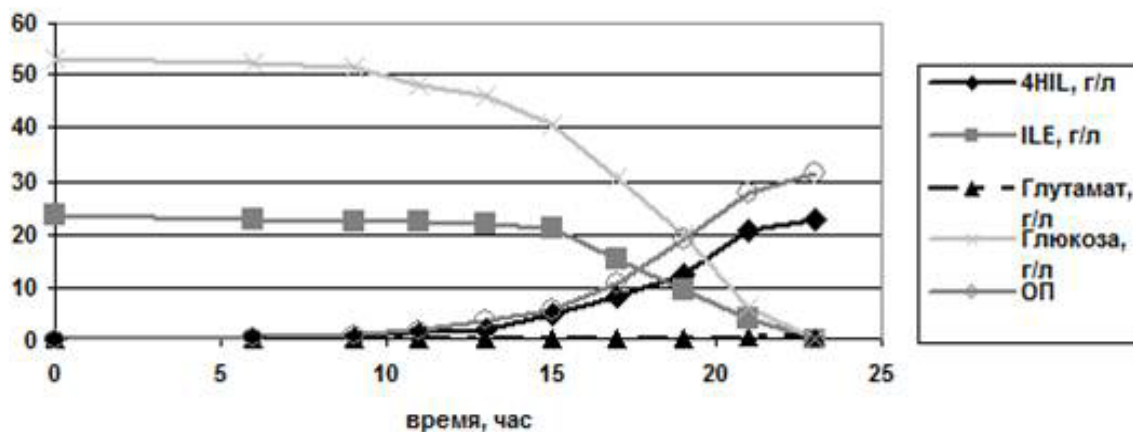


Рисунок 6. Основные параметры биотрансформации L-изолейцина в 4НПЛ с помощью штамма 2Δ [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)]. Обозначения: ILE – L-изолейцин, ОП – оптическая плотность культуры при $\lambda=540$ нм

(Onishi et al.1998).

Для биотрансформации 200 мМ L-изолейцина растущими клетками штамма 2Δ [pEL-IDO(Lys, 23)] потребовалось примерно 22 часа и 300 мМ глюкозы, при этом на момент окончания процесса, оптическая плотность клеточной культуры достигала значения $ОП_{540} \approx 32$ (Рис. 6). Из приведенных данных видно, что возрастание оптической плотности коррелировало с увеличением концентрации 4-НПЛ, подтверждая тем самым гипотезу о сопряжении биотрансформации с клеточным ростом. Это позволяло поддерживать активное гидроксирование в течение всего биотехнологического процесса с эффективностью конверсии 88%.

4. Повышение экономичности процесса биотрансформации: перераспределение углеродного потока от синтеза биомассы к реакции гидроксирования L-изолейцина.

Как было отмечено выше, процесс биотрансформации с использованием растущих клеток штамма 2Δ [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)] сопровождался потреблением 1.5 молей глюкозы на 1 моль добавленного L-изолейцина, в то время как из стехиометрии “идеального” процесса следует, что для гидроксирования 1 моля L-изолейцина необходимо всего лишь 0.5 моля глюкозы. Следовательно, теоретически возможно уменьшить концентрацию изначально добавляемой глюкозы в среде в три раза. Для этого надо перераспределить углеродные потоки в штамме 2Δ таким образом, чтобы: 1) минимизировать интегрированный углеродный поток, идущий на формирование биомассы, и 2) увеличить “оборачиваемость” ЦТК так, чтобы для формирования 1г биомассы требовалось как можно больше его оборотов.

Ранее, с помощью METAFoR анализа нами было показано, что делетирование генов (*edd*, *eda*), кодирующих ферменты ЭДП, в штамме *E. coli* MG1655 не влияет на ростовые характеристики клеток, однако увеличивает долю протеиногенного аспартата, образовавшегося из синтезированного в ЦТК оксалоацетата (Рис. 7, Табл. 2). Полученные данные можно было интерпретировать с одной стороны как увеличение “оборачиваемости” ЦТК по отношению к скорости карбоксилирования фосфоенолпирувата (при неизменном потоке углерода на образование биомассы), а с другой, как усиление потока углерода от малата к пирувату (за счет работы малатного

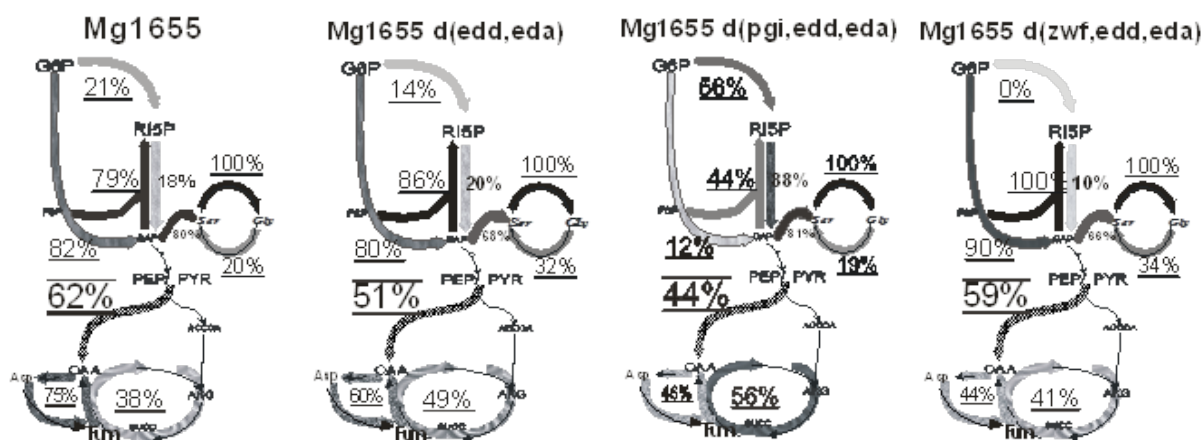


Рисунок 7. Распределение вкладов различных путей метаболизма в синтез ключевых интермедиатов центрального метаболизма в штаммах MG1655, MG1655 Δ (*edd,eda*), MG1655 Δ (*zwf,edd,eda*) и MG1655 Δ (*pgi,edd,eda*).

фермента), компенсирующее уменьшение стационарного пула пирувата вследствие блокирования ЭДП. В обоих случаях имеет место перераспределение углеродных потоков потенциально выгодное для процесса биотрансформации. Однако, проявление этой потенции в виде уменьшения отношения потребленная глюкоза/4-NP возможно только в условиях ограничения скорости клеточного роста, так, чтобы часть углеродного потока была перенаправлена от биосинтетических процессов к ЦТК. Для ограничения скорости клеточного роста можно было предложить два подхода. Первый заключается в совместной блокировке ЭДП и гликолиза на стадии синтеза фруктозо-6-фосфата (делеция генов *pgi*, *edd*, *eda*). В этом случае поток углерода от глюкозы к ЦТК идет через пентозофосфатный путь, при этом наблюдается существенное замедление скорости роста [Sauer et al 2004]. Однако данная модификация метаболизма приводит к значительному увеличению выхода биомассы и уменьшению скорости потока углерода к ацетил-КоА (предшественнику

α -кетоглутарата), косвенно оцениваемого по уменьшению синтеза ацетата (Табл. 2). В этом случае не происходит перенаправление углеродного потока к ЦТК, напротив, еще большая часть углерода идет на синтез биомассы, но, с низкой скоростью. Таким образом, этот подход оказался не эффективным.

Другой подход заключался в одновременной инактивации ЭДП и окислительной ветви пентозофосфатного пути (ОВПФП). В этом случае перенаправление общего углеродного потока к ЦТК могло бы происходить за счет существенного ослабления потока углерода на синтез рибоз, вследствие относительно низкой скорости работы неокислительной ветви пентозофосфатного пути (трансальдозазная и транскетолазная реакции) в указанном направлении. Действительно, нами было показано, что совместная блокировка ЭДП и ОВПФП в штамме дикого типа MG1655 (делеция генов *zwf,edd,eda*) приводит к снижению количества накопленной биомассы и увеличению синтеза ацетата (Таблица 2), предполагая усиление потока углерода через гликолиз к ацетил-КоА.

Таким образом, можно было предположить, что совместная инактивация ПФП и ЭДП в 2 Δ штамме приведет к желаемой оптимизации процесса биотрансформации. Для подтверждения сделанных предположений и с целью выяснить, блокировка

Таблица 2. Ростовые характеристики штаммов

Ростовые характеристики\Штамм	MG1655	MG1655 $\Delta(edd,eda)$	MG1655 $\Delta(edd,eda, zwf)$	MG1655 $\Delta(edd,eda, pgi)$
OD	7.0 \pm 0.2	6.7 \pm 0.2	5.9 \pm 0.2	8.1 \pm 0.2
Время потребления глюкозы (СТ), ч	6.5	6.5	8.5	14.6
μ_{max} , час ⁻¹	0.66 \pm 0.03	0.70 \pm 0.04	0.49 \pm 0.03	0.39 \pm 0.02
S _{max} , г/л*ч*оп.ед	0.80 \pm 0.04	0.72 \pm 0.04	0.64 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03
Накопленный ацетат, г/л	0.35 \pm 0.02	0.39 \pm 0.02	0.94 \pm 0.03	<0.02

какого из двух путей – ЭДП или ОВПФП оказывает наибольшее влияние на параметры биотрансформации, нами были сконструированы производные штамма 2 Δ с заблокированным ЭДП (2 Δ $\Delta edd,eda$), заблокированной ОВПФП (2 Δ Δzwf) и совместно заблокированными ЭДП и ОВПФП (2 Δ $\Delta zwf,edd,eda$). Каждый штамм, включая контрольный 2 Δ , после введения в него плазмиды pEL-IDO(Lys, 2-e-2), был использован для биотрансформации L-изолейцина в 4-NIL в стандартных условиях. (Далее для простоты мы будем указывать только названия штаммов, подразумевая, что в каждый из них введена плаزمида pEL-IDO(Lys, 2-e-2)).

Таблица 3. Основные параметры биотрансформации L-изолейцин/4-НПЛ.

Штамм ¹⁾	СТ, ч	ОП ₅₅₅	Потреблённые		Синтезированные		Y, %	Накопленный Глутамат, мМ
			Гл., мМ	Пе, мМ	4-НПЛ, мМ	4-НПЛ, г		
2Δ	22	32	300	200	156±2	11.9±0.1	88	2.0±0.5
2Δ <i>Δedd,eda</i>	22	33	300	200	150±2	11.9±0.1	87	3±0.5
2Δ <i>Δzwf</i>	25	27	300	188	132±1	10.8±0.1	82	9±0.5
2Δ <i>Δzwf,edd,eda</i>	25	22	230	200	163±2	11.0±0.1	88	2±0.5
	29	20	300	200	142±1	10.5±0.1	80	26.5±0.5
2Δ <i>Δzwf,edd,eda</i>	26	24	230	200	156±2	12.0±0.1	88	3±0.5

Обозначения: Гл. – глюкоза, Пе – L-изолейцин

¹⁾ Все штаммы содержали плазмиду pEL-IDO(Lys, 2-e-2)

Эксперименты показали что, инактивация только ЭДП не приводит к существенным изменениям параметров биотрансформации, так как процессы биоконверсии с использованием штамма 2Δ *Δedd,eda* и контрольного штамма 2Δ практически ничем не отличались (Табл. 3, Рис. 8).

Напротив, блокирование ОВПФП в штамме 2Δ привело к существенным изменениям (Табл. 3). Количество синтезированного 4-НПЛ и биомассы в процессе биотрансформации с использованием штамма 2Δ *Δzwf* снизилось на 10%. При этом, на момент полного исчерпания глюкозы наблюдалось остаточное количество L-изолейцина и L-глутамата. Вследствие этого соотношение потребленная глюкоза/4-НПЛ увеличилось. Из метаболической схемы гидроксилирования L-изолейцина в

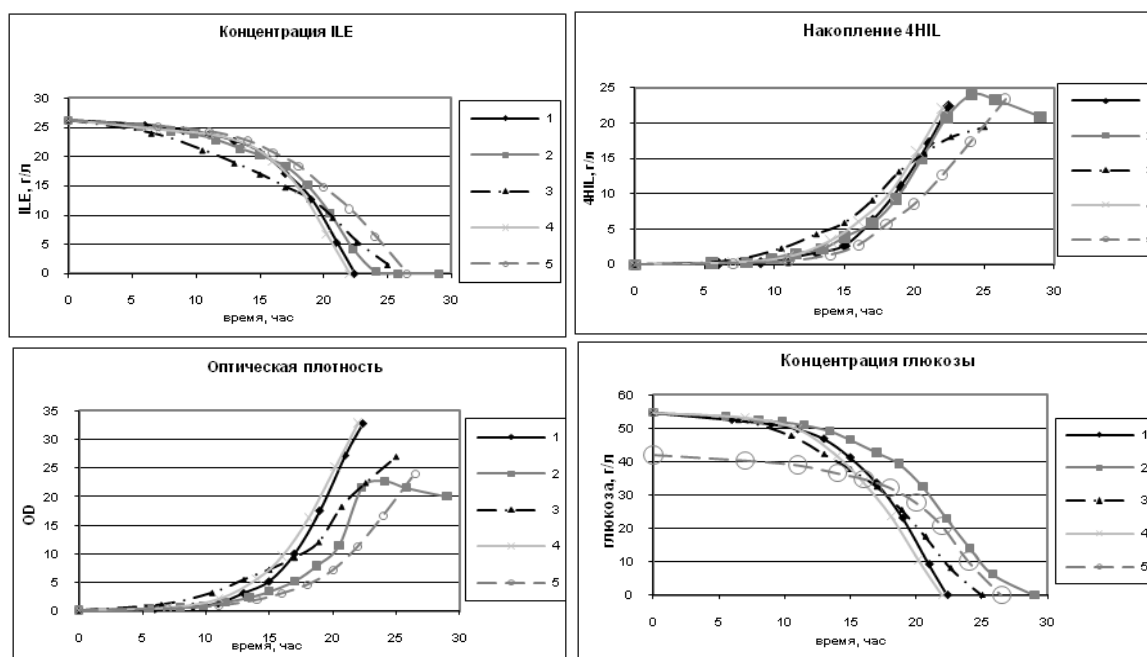


Рисунок 8. Характеристики биотрансформации L-изолейцина в 4-НПЛ. 1 – штамм 2Δ[pEL-IDO(Lys, 2-e-2)] 300мМ глюкозы, 2 - штамм 2Δ *Δzwf,edd,eda* [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)] 300мМ глюкозы, 3 - штамм 2Δ *Δzwf* [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)] 300мМ глюкозы, 4 - штамм 2Δ *Δedd,eda* [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)] 300мМ глюкозы, 5 – штамм 2Δ *Δzwf,edd,eda* [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)] 230мМ глюкозы.

штамме 2Δ следует, что сопряжение роста клеток и гидроксирования L-изолейцина будет работать только при низком пуле сукцината, необходимом для синтеза сукцинил-КоА, достаточного для поддержания заданной скорости роста. Иными словами, практически все молекулы сукцината, образованные в реакции гидроксирования должны дойти по ЦТК до α-кетоглутарата, чтобы снова принять участие в окислении L-изолейцина. В случае, если пул сукцината превысит определенное пороговое значение, гидроксирование L-изолейцина уже не будет являться строго необходимым условием роста. При этом, как следствие, будет наблюдаться увеличение соотношения потребленная глюкоза/4-НП, т.е. снизится эффективность процесса. Можно предположить, что поток углерода в штамме 2Δ Δ*zwf*, ранее расходованный на синтез биомассы, оказался частично перенаправленным в ЦТК в виде оксалоацетата. Это, в свою очередь, должно было вызвать увеличение пула сукцината выше критического, и рассогласование роста и гидроксирования L-изолейцина. Как следствие, рост субпопуляции клеток со сниженной активностью IDO (например вследствие снижения копийности плазмиды), в которых синтезированный α-кетоглутарат аминировался до L-глутамата и экскретируется в среду. Согласно рассуждениям, приведенным выше, дополнительное блокирование ЭДП в штамме 2Δ Δ*zwf*, должно перенаправить потоки в сторону уменьшения концентрации сукцината ниже пороговой величины.

Действительно, процесс биоконверсии при использовании нового штамма с заблокированными ЭДП и ОВПФП характеризовался эффективностью трансформации L-изолейцина в 4-НП близкой к контрольному штамму на момент полного потребления L-изолейцина (около 26 часов культивирования, Рис. 8). Вместе с тем, в процессе потребления оставшейся глюкозы для штамма 2Δ Δ*zwf,edd,eda* наблюдалось падение эффективности конверсии L-изолейцина в 4-НП и накопление 26.5 мМ глутаминовой кислоты, синтезированной из α-кетоглутарата (Табл. 3). Это указывало на избыточное количество глюкозы в исходной среде (достаточно 1.2 моля глюкозы на 1 моль изолейцина) и на то, что фермент, кодируемый геном *ilvE*, способен дезаминировать 4-гидрокси-изолейцин, перенося аминогруппу на α-кетоглутарат. Следует отметить, что выход биомассы штамма 2Δ Δ*zwf,edd,eda* достигал 22 единиц оптической плотности. Для контрольного штамма этот показатель составил 32 единицы. Культивирование штамма 2Δ Δ*zwf,edd,eda* на среде со сниженным

содержанием глюкозы (230 мМ) показало, что на момент ее полного исчерпания остаточный L-изолейцин отсутствовал.

Таким образом, за счет совместной инактивации ЭДП и ОВПФП в штамме 2Δ удалось добиться существенной оптимизации процесса, а именно: экономии 20% глюкозы и снижения выхода биомассы на 35% при сохранении коэффициента конверсии L-изолейцин/4-НПЛ на уровне 88%.

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы впервые идентифицирован и клонирован ген (*ido*), кодирующий L-изолейцин-4-гидроксилазу в геноме штамма *Bacillus thuringiensis* (2-e-2). Установлена аминокислотная последовательность, соответствующая процессированной активной форме IDO.

2. Проведена оптимизация экспрессии гена *ido* в составе плазмидного вектора в клетках *E. coli*.

3. Впервые предложена и реализована схема модификации метаболизма *E. coli* для эффективной биотрансформации L-изолейцина в 4-НПЛ на основе сопряжения клеточного роста и реакции гидроксирования. Сконструирован штамм *E. coli* 2Δ, способный после введения в него плазмиды pEL-IDO(Lys, 2-e-2) к эффективной биотрансформации L-изолейцина в 4-НПЛ.

4. Проведено перераспределение углеродных потоков от синтеза биомассы к ЦТК с целью более экономичной биотрансформации L-изолейцина в 4-НПЛ. Сконструирован и внедряется в производство штамм 2Δ Δ*zwf,edd,eda* [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)], позволяющий, при поддержании коэффициента конверсии L-изолейцин/4-НПЛ на уровне 88%, уменьшить на 20% потребление глюкозы и снизить на 35% выход биомассы по сравнению со штаммом 2Δ [pEL-IDO(Lys, 2-e-2)].

5. Предложенная схема может быть использована для гидроксирования других аминокислот при использовании соответствующих диоксигеназ.

Результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Киверо А.Д., Бочаров Э.В., Дорошенко В.Г., Соболев А.Г., Дубинный М.А., Арсеньев А.С. Изучение потоков углерода при утилизации глюкозы в

- Escherichia coli* MG1655 с помощью 2D [1H,13C] ЯМР спектроскопии // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. т. 44. № 2. С. 168-175.
2. Smirnov SV, Kodera T, Samsonova NN, Kotlyarova VC, Rushkevich NY, **Kivero AD**, Sokolov PM, Hibi M, Ogawa J, Shimizu S Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. V. 88(3) P. 719 -726.
 3. **А.Д. Киверо**, А.Е. Новикова, С.В. Смирнов Модификация центрального метаболизма *E. coli* для оптимизации процесса биотрансформации L-изолейцина в 4-гидроксиизолейцин методом энзиматического гидроксирования. // *Биотехнология.* 2011. №4. С. 26-32.
 4. **Kivero A.D.**, Benevolensky M.S., Yakovleva T.Yu., Bocharov E.V., Mashko S.V. Exploiting of the [C¹³-H¹]-NMR-spectroscopy for investigation of the Carbon flux distribution in the metabolic pathways of the *E.coli* strains with mutations in the genes encoding the enzymes of the Central metabolism // 1-st International Congress "Biotechnology - state of the art and prospects of development", Moscow, Russia, October 14-18, 2002. P. 191.
 5. **Киверо А.Д.**, Бочаров Э.В., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Бирюкова И.В., Минаева Н.И., Арсеньев А.С., Машко С.В. Изучение распределения потоков углерода в клетках *E.coli*, имеющих мутации в генах, кодирующих некоторые ферменты центрального метаболизма // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Биотехнология микробов». Москва. 20 – 23 октября, 2004. С. 43.
 6. **Kivero A. D.**, Novikova. A. E., Smirnov S. V. BIOTRANSFORMATION OF L-ISOLEUCINE INTO 4-HIL USING L-ISOLEUCINE-4-HYDROXYLASE: OPTIMIZATION OF THE PROCESS BY METHODS OF METABOLIC ENGINEERING // Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее». Москва, МГУ. 27 - 29 января, 2011. С. 9.
 7. **Kivero A.D.**, Kodera Tomohiro, Kotlyarova V. A., Rushkevich N. Yu., Samsonova N. N., Smirnov S. V. Synthesis of 4-hydroxyisoleucine by biotransformation method // 6-th International Congress "Biotechnology - state of the art and prospects of development", Moscow, Russia, March 21-25, 2011. P. 334.

