

УДК 577.2

## ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ТРЕОНИНА ШТАММОМ-ПРОДУЦЕНТОМ *Escherichia coli*

© 2024 г. Н. С. Плеханова<sup>1,3,\*</sup>, В. А. Лившиц<sup>2</sup>, Т. В. Хижняк<sup>1</sup>, М. С. Юркова<sup>1</sup>, А. Н. Федоров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”

“Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобные технологии”, Москва, 123182 Россия

<sup>3</sup>Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 125047 Россия

\*e-mail: plekhanovans@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2024 г.

После доработки 24.07.2024 г.

Принята к публикации 26.07.2024 г.

L-треонин – незаменимая аминокислота, широко используемая в сельском хозяйстве, фармацевтической и пищевой промышленности. В настоящем исследовании описан комплексный подход, основанный на создании штамма-продуцента L-треонина *Escherichia coli*, устойчивого к высоким концентрациям ацетата, с помощью адаптивной лабораторной эволюции и последующего индуцибельного повышения уровня экспрессии гена, кодирующего деацетилазу. Проверка штаммов на ферментационных средах с глюкозой, ксилозой и сахарозой показала значительное увеличение продуктивности. На ферментационных средах с глюкозой продуктивность для исходного штамма-продуцента треонина увеличилась на 15 и на 29% для устойчивого к ацетату штамма ТА-81, а на ферментационных средах с сахарозой на 14 и 15% соответственно. В случае роста на ксилозе положительный эффект от усиления деацетилазы наблюдался только для штамма ТА-81 (+26%).

**Ключевые слова:** ацетилирование остатков Nε-лизина в белках, деацетилаза CobB, аминокислоты, треонин, мутагенез, лабораторная адаптивная эволюция, накопление ацетата

DOI: 10.56304/S0234275824040082

### ВВЕДЕНИЕ

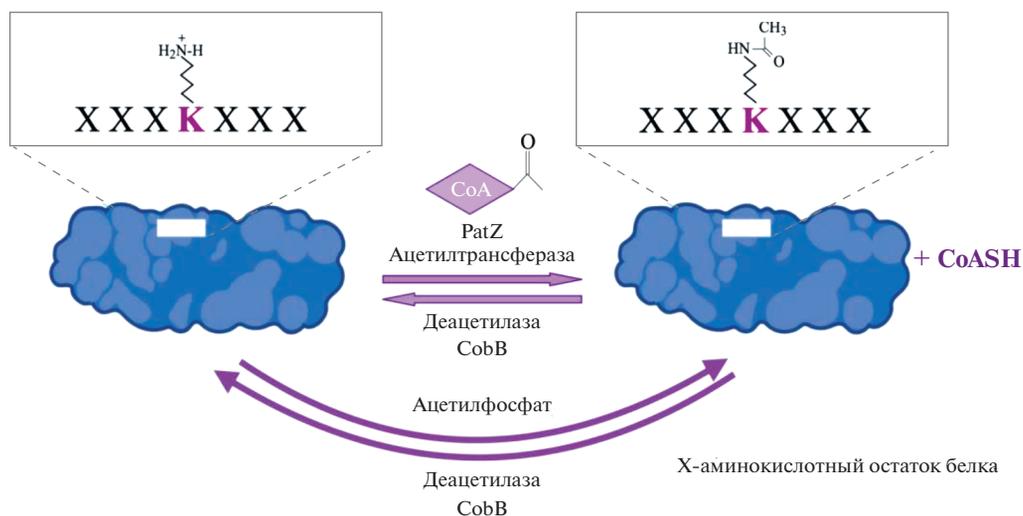
В природе лишь немногие бактерии способны естественным образом усваивать ацетат, среди них *Escherichia coli*, микроорганизм с преимуществами быстрого роста на дешевых средах и простыми протоколами для генетического редактирования. Данная бактерия на протяжении долгого времени широко используется для получения различных ценных химических веществ [1–3]. Тем не менее, проблема образования ацетата в культурах *E. coli*, выращенных в аэробных условиях, до сих пор остается актуальной, поскольку он ингибирует рост клеток и синтез целевых продуктов [4, 5], а также вызывает стрессовые реакции даже при низкой концентрации [6]. Более того, образование этого химического соединения представляет собой нецелевую конверсию источника углерода [7]. Для уменьшения генерации ацетата применялись различные стратегии, такие, как метаболическая инженерия штаммов [8–10] и контроль ферментационного процесса [11–15]. Однако о спо-

собе регулирования метаболизма ацетата в клетках *E. coli* с помощью процессов ацетилирования до сих пор очень мало сведений.

Клеточный метаболизм ацетата и ацетилирование белков тесно связаны. Последний представляет собой обратимую посттрансляционную модификацию, которая часто встречается в прокариотических клетках. Схема этого процесса приведена на рис. 1.

В основном ацетилированию подвержены ферменты метаболических путей, что, в свою очередь, влияет на их функцию, обеспечивая глобальную регуляцию всего метаболизма. Эта реакция модификации обратима благодаря действию деацетилазы; самой изученной деацетилазой *E. coli* является CobB [16–19]. Из литературных данных известно, что CobB требует НАД<sup>+</sup> в качестве кофактора, а ее субстратная специфичность довольно низкая. Активность CobB носит глобальный регуляторный характер, способствуя деацетилированию большого количества модифицированных аминокислотных остатков лизина в белках независимо от механизма, по которому они были ацетилированы [20].

Список сокращений: ОП – оптическая плотность, ЛАЭ – лабораторная адаптивная эволюция, УФ – ультрафиолет.



**Рис. 1.** Механизмы реализации процессов ацетилирования.  
**Fig. 1.** Mechanisms for implementing acetylation processes.

Целью данной работы было изучение влияния процесса деацетилирования на продукцию аминокислоты треонина в штамме-продуcente *E. coli*.

мощью праймеров P15-P16. В полученные штаммы была введена плаزمида pSENS, несущая ген *gfp* под конститутивным промотором фага T5.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

*Бактериальные штаммы, плазмиды и ростовые среды*

Полноценной питательной средой служила LB “ДиаМ” (Россия), минимальной – M9 (Sigma-Aldrich, США) [21]. Для получения твердых сред в жидкие добавляли бактоагар (Difco, США) в концентрации 1.5%. Все использованные в работе штаммы и плазмиды приведены в табл. 1, 2.

*Получение тест-культуры*

Гены *thrABC* в хромосоме *E. coli* инактивировали с применением Red-зависимой системы по методу, описанному в работе [22] с использованием вспомогательной плазмиды rKD20. Кассету  $\Delta thrABC::Km$  конструировали с помощью праймеров P13 и P14; проверяли делеции генов с по-

*Методы работы с ДНК*

Выделение ДНК проводили с использованием наборов Plasmid Miniprep и Cleanup Standard, согласно инструкциям производителя (“Евроген”, Россия). Электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли по стандартным методикам. Стандартный метод ПЦР воспроизводили с помощью амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Biorad, США). Химический синтез олигонуклеотидных праймеров для ПЦР выполнен фирмой “Синтол” (Россия). Нуклеотидный состав праймеров приведен в табл. 3.

*Конструирование плазмиды, несущей ген, кодирующий деацетилазу CobV*

Для создания стабильной многокопийной плазмиды, способной экспрессироваться в любом

**Таблица 1.** Бактериальные штаммы, использованные в работе  
**Table 1.** Bacterial strains used in the work

Штамм	Генотип	Источник
MG1655	F <sup>-</sup> <i>ilvG rfb-50 rph</i> <sup>-1</sup>	CGSC 6300
THR (продукт L-треонина)	MG1655 $\Delta tdh; rhtA23; pvic40$	ВКПМ В-2307
TA-81	THR-ЛАЭ	Данная работа
TA-71	THR-ЛАЭ	Данная работа
TM-29	THR-УФ-мутагенез	Данная работа
SENS-THR	MG1655 $\Delta thrABC/pSENS$	Данная работа

**Таблица 2.** Плазмиды, использованные в работе  
**Table 2.** Plasmids used in the work

Плазмида	Устойчивость к антибиотикам	Характеристики	Ссылка
pET15b	Amp	ori pBR322, P <sub>T7</sub> , T <sub>T7</sub>	Лабораторная коллекция
pCOB	Cm	pET15b-T5- <i>cobB-TrrnB</i>	Данная работа
pVIC40	Str	ori pRSF1010; <i>thrA*BC</i>	ВКПМ В-2307
pSENS	Amp	<i>T5-gfp</i>	Лабораторная коллекция

**Таблица 3.** Олигонуклеотиды, используемые в работе  
**Table 3.** Oligonucleotides used in the work

ID	Олигонуклеотид	Последовательность (5' → 3')
P1	Cm-EcoRI	TTTTTTGAATTCTGATCGGCACGTAAGAGGTTC
P2	Cm-PstI	TTTTTCTGCAGTTACGCCCGCCCTGCCAC
P3	T5-BglII	TTTTTAGATCTTCATAAAAAATTTAATTGCT
P4	T5-XbaI	TTTTTTTCTAGATAATTATAATTGTTATCCGCTCACAA
P5	TrrnB-BamHI	TTTTTTGGATCCATTTGTCCTACTCAGGAGAG
P6	TrrnB-HindIII	TTTTTTAAGCTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTC
P7	<i>cobB</i> -NcoI	TTTTTTCCATGGATGCTGTTCGCGTCGGGGT
P8	<i>cobB</i> -BamHI	TTTTTTGGATCCTCAGGCAATGCTTCCCGCT
P13	del- <i>thrABC</i> -R	GTAACGAGGTAACAACCATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC- GAAGTTCCTATACTTTCTAGAG
P14	del- <i>thrABC</i> -L	CATGAGAATTAATCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGTTC- GAAGTTCCTATTCTCTAG
P15	<i>thrABC</i> -up	ACACAGAAAAAAGCCCGCAC
P16	<i>thrABC</i> -down	GCAAACCCGGCCTGATTGA

штамме *E. coli*, был изменен коммерчески доступный вектор pET15b (Novagen, США). Для поддержания плазмиды в клетках в течение длительного культивирования маркер устойчивости к ампициллину был заменен на маркер устойчивости к хлорамфениколу с помощью праймеров P1 и P2. Промотор фага T7, способный распознаваться только РНК-полимеразой того же фага, был заменен промотором фага T5, который может быть распознан РНК-полимеразами *E. coli*, с помощью праймеров P3 и P4. Синтетический промотор фага T5 также находился под аналогичной репрессией *lacI*. С той же целью был изменен терминатор фага T7 на TrrnB с помощью праймеров P5 и P6. После этого в сконструированный вектор был клонирован ген, кодирующий деацетилазу CobB с помощью праймеров P7 и P8. В качестве матрицы для амплификации была использована хромосома штамма *E. coli* MG1655. Идентичность всех амплифицированных фрагментов ДНК была подтверждена секвенированием, а уровень синтеза белка был проверен в штамме *E. coli* MG1655.

### Трансдукция

Приготовление лизатов фага P1 *vir* и трансдукционные скрещивания этим фагом проводили в соответствии с общепринятыми методиками [23].

### Оценка накопления L-треонина в культуральной среде

Первоначально штаммы-продуценты L-треонина выращивали в течение 18–24 ч при температуре 37°C на чашках с LB-агаром, содержащим антибиотик стрептомицин. Для получения посевной культуры штаммы инкубировали в пробирках размером 20 × 200 мм, содержащих 2 мл LB с добавлением антибиотика, на ротационном шейкере (250 об./мин) при 37°C в течение 18 ч. Далее в ферментационную среду вносили 0.2 мл ночной культуры (10%). Оптическую плотность культуры измеряли с помощью спектрофотометра Thermo Fisher Scientific Genesys 150 (Германия). Количество образовавшегося треонина в среде определяли методом капиллярного электрофореза Agilent CE 7100 (США).

Ферментацию штаммов-продуцентов L-треонина проводили в течение 72 ч при 32°C и 240 об/мин. Состав ферментационной среды (г/л): глюкоза – 80.0/сахароза – 80.0/ксилоза – 80.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 22.0; NaCl – 0.8;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.8;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.02; тиамин–HCl – 0.0002; дрожжевой экстракт – 1.0;  $\text{CaCO}_3$  – 30.0; pH 7.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Ацетат в качестве дополнительного источника углерода и деацетилирование белков*

Как уже упоминалось, серьезной проблемой при промышленном культивировании штаммов *E. coli*, в том числе продуцентов аминокислот, является образование на средах с глюкозой значительного количества ацетата, который снижает конверсию моносахарида в целевой продукт и угнетает рост клеток [24]. Синтез клетками ацетата, на который расходуется до 15% глюкозы, может негативно влиять на энзиматическую активность ключевых ферментов центрального метаболизма в результате ацетилирования в них аминокислотных остатков лизина. В 2010 г. было обнаружено, что накопление ацетата является результатом катаболической репрессии ацетил-КоА-синтетазы (кодируемой геном *acs*), которая происходит в условиях быстрого роста и, соответственно, быстрого потребления глюкозы [25]. А уже в 2011 г. Castaño-Serezo с коллегами выяснили, что ацетил-КоА-синтетаза, которая катализирует реакцию превращения ацетата в ацетил-КоА, инактивируется ацетилированием [17].

Весь процесс использования ацетата для производства биохимических веществ можно разделить на три этапа: транспорт ацетата (из внешней среды во внутриклеточное пространство), ассимиляция ацетата (от ацетата до ацетил-КоА) и образование химических веществ (из ацетил-КоА в целевой продукт). Использование же внутриклеточного ацетата в качестве дополнительного источника углерода требует адаптации клеточного метаболизма, а в случае высоких концентраций – его перестройки. Согласно литературным данным, рост штамма *E. coli* дикого типа ингибируется в присутствии 128 мМ ацетата в культуральной среде [26]. Создать штаммы с устойчивостью к высоким концентрациям ацетата, а точнее, способные использовать накопленный ацетат в качестве дополнительного источника углерода, можно методами геномной инженерии, лабораторной адаптивной эволюции (ЛАЭ), а также при помощи мутагенеза. В данной работе были выбраны два последних метода, поскольку основной задачей было получение определенного фенотипа штаммов для изучения влияния процесса деацетилирования на клеточный метаболизм. Возникшие адаптив-

ные мутации, нацеленные на регуляторные механизмы, будут изучены отдельно.

При проведении ЛАЭ или мутагенеза появляется возможность отобрать штаммы с улучшенными характеристиками, приняв за основу тот факт, что скорость роста на высоких концентрациях ацетата (выше ингибирующей концентрации) прямо связана с успешной его ассимиляцией клетками.

### *Получение штаммов, характеризующихся ускоренным ростом на высоких концентрациях ацетата методом УФ-мутагенеза*

УФ-мутагенез традиционно используется в лабораторной практике как наиболее доступный способ улучшения свойств штаммов-продуцентов. УФ-облучение, которое проводят при длинах волн в диапазоне 200–300 нм (оптимально при 254 нм), вызывает транзиции, трансверсии, сдвиги рамки считывания и делеции. Хотя УФ-лучи не обладают сильной проникающей способностью, на практике УФ-мутагенез позволяет получить штаммы с улучшенными характеристиками [27].

На первом этапе данного исследования проводили УФ-облучение исходного штамма THR, ранее не подвергавшегося мутагенезу. Обработка суспензии клеток возрастающими дозами этого мутагена была достаточно эффективна и обеспечила рост клеток на высоких концентрациях ацетата в среде при облучении в течение 1–3 мин. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

### *Получение штаммов, характеризующихся ускоренным ростом на высоких концентрациях ацетата методом ЛАЭ*

ЛАЭ – метод, основанный на способности микроорганизмов быстро приспосабливаться к новым условиям внешней среды. Этот метод достаточно часто применяется для исследования молекулярных основ и динамики эволюции бактериальных культур, а также для направленного изменения метаболизма микроорганизмов [28–31].

Для селекции клеток, эффективно утилизирующих ацетат, в качестве исходного использовали штамм THR (см. табл.1). Культуру, выращенную в пробирках в жидкой среде, поддерживали в стадии экспоненциального роста ежедневным пересевом на свежую минимальную среду с ацетатом в качестве единственного источника углерода. Каждые 72 ч культивирования концентрацию ацетата повышали, а клетки высевали на агаризованную среду с ацетатом для получения индивидуальных клонов и последующей оценки скорости их роста и продукции аминокислоты. Схема эксперимента представлена на рис. 3.

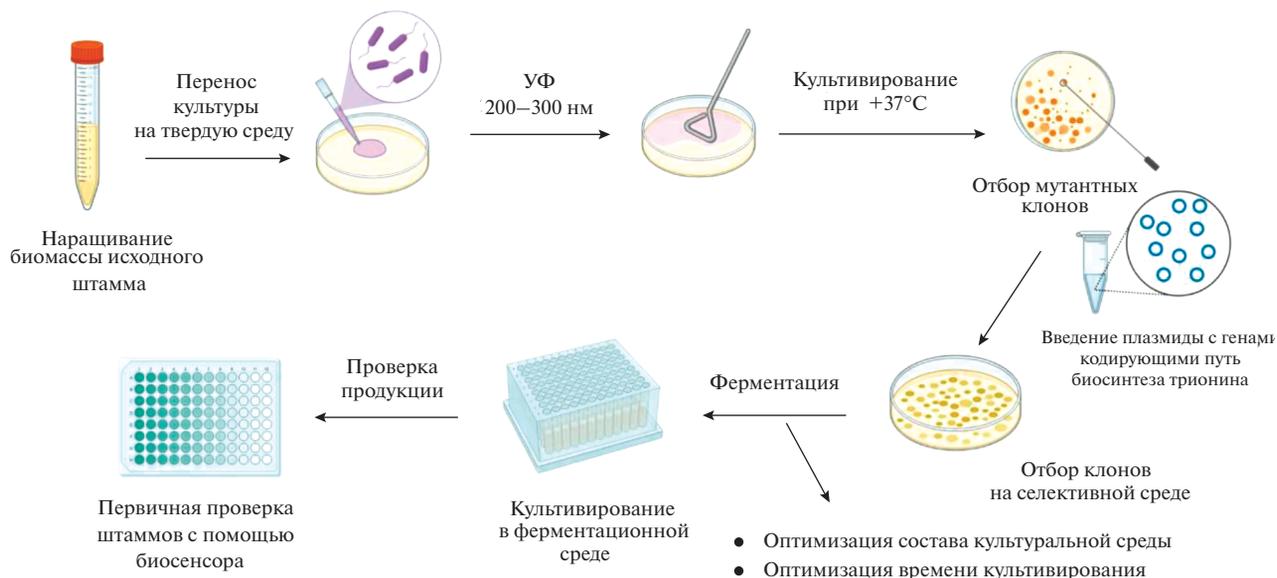


Рис. 2. УФ-МУТАГЕНЕЗ. Схема эксперимента.  
 Fig. 2. UV MUTAGENESIS. Experimental design.

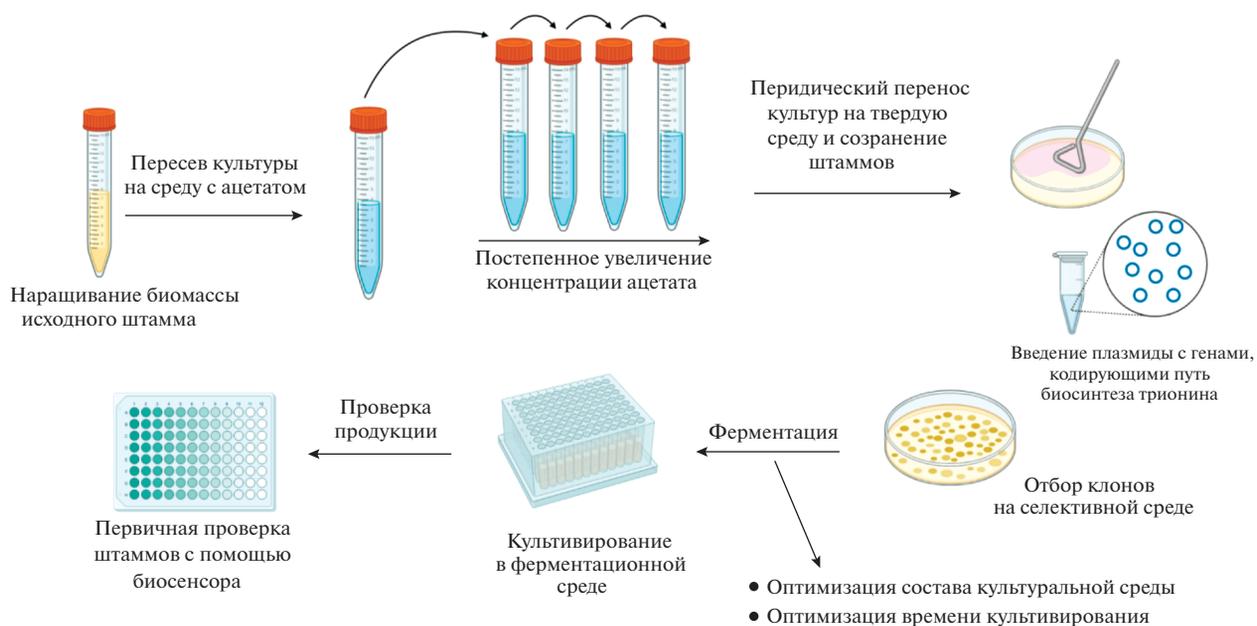
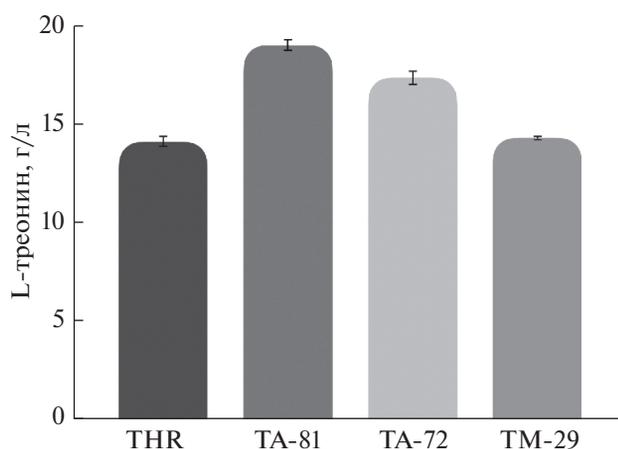


Рис. 3. АДАПТИВНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ. Схема эксперимента.  
 Fig. 3. ADAPTIVE LABORATORY EVOLUTION. Experimental design.



**Рис.4.** Оценка накопления треонина в культуральной среде глюкоза : ацетат = 3 : 1.

**Fig. 4.** Assessment of threonine accumulation in the culture medium glucose : acetate = 3 : 1

В результате, с помощью ЛАЭ и УФ-мутагеназа были получены штаммы, способные расти при высоких концентрациях (168 мМ) ацетата в качестве единственного источника углерода.

#### *Первичная проверка уровня синтеза целевого продукта в полученных штаммах-продуцентах*

Продуктивность полученных индивидуальных клонов штаммов THR была проанализирована в результате ферментации в глубоководном планшете на ферментационных средах, содержащих глюкозу в качестве основного источника углерода, а также ацетат в качестве дополнительного источника углерода в соотношении 3 : 1 соответственно.

Первичный анализ продукции треонина проводили с помощью специально созданной тест-культуры, генотип которой описан в табл. 1 (5 строка). Поскольку штамм SENS-THR несет делецию генов пути биосинтеза аминокислоты треонин, а именно делецию треонинового оперона (*thrABC*), такой штамм является ауксотрофом по этой аминокислоте и не способен расти на минимальной среде без добавления треонина. Рост данного штамма на минимальной среде с добавлением аликвот культуральной ферментационной среды штаммов-продуцентов THR будет прямо пропорционален накоплению треонина в результате ферментации. Для лучшей визуализации первичного скрининга в штамм SENS-THR была введена многокопийная плаزمиды pSENS, несущая ген *gfp* под регуляцией конститутивного промотора T5. Таким образом, представлялось возможным отобрать самые эффективные клоны, не прибегая к дорогостоящим и трудозатратным способам определения концентрации аминокислоты методами аналитической химии. Была построена

калибровочная кривая для разных концентраций треонина, растворенного в ферментационной среде.

В результате УФ-мутагенеза был отобран модифицированный штамм-продуцент треонина TM-29; в результате ЛАЭ – штаммы TA-81 и TA-72. При предварительной проверке накопления треонина с помощью тест-культуры pSENS данные штаммы превосходили контрольный штамм (THR) по оптической плотности THR-SENS (данные не представлены). Для дополнительной проверки этого результата проведена пробирочная ферментация на среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода и ацетат в качестве дополнительного источника углерода в соотношении 3 : 1 соответственно. Накопление полученными штаммами треонина определяли методом капиллярного электрофореза. Результаты представлены на рис. 4.

Согласно представленным результатам, метод ЛАЭ является наиболее подходящим для получения ацетат-устойчивых штаммов без потери их продуктивности.

#### *Идентификация мутаций, полученных в ходе адаптивной эволюции к росту на высоких концентрациях ацетата*

Для идентификации полученных мутаций, приводящих к устойчивости к высоким концентрациям ацетата, и для установления их локализации штаммы TA-81 и TA-72 были использованы в качестве донорного штамма при получении препарата фага P1 *in vitro*. Селекцию проводили на минимальной среде с ацетатом (168 мМ) в качестве единственного источника углерода. Получить клоны реципиентного штамма, способные расти в таких условиях, не удалось, что свидетельствует о том, что возникшие изменения генома штаммов TA-81, и TA-72 связаны с мутациями в нескольких генах, кодирующих ферменты, участвующие в разных путях ассимиляции ацетата. Идентифицировать подобные изменения возможно только с помощью полногеномного секвенирования штамма, что будет сделано позднее.

#### *Усиление уровня экспрессии гена *cobB**

На следующем этапе в штаммы THR и TA-81 была введена плазмиды pCOB, несущая ген *cobB*, кодирующий единственную описанную у *E. coli* деацетилазу. Целевой ген находится под регуляцией индуцибельного промотора T5. Накопление треонина в культуральной среде отобранных клонов с плазмидой оценивали в ходе пробирочной ферментации на средах с различными источниками углерода в течение 72 ч. Для индукции синтеза фермента деацетилазы через 48 ч к культивируемым штаммам в ферментационную среду были

добавлены лактоза и галактоза до конечных концентраций 10 мМ. В отличие от ИПТГ (Изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид), лактоза и галактоза способны утилизироваться клетками, поэтому после полного израсходования добавленного индуктора индуцированный ими синтез деацетилазы будет прекращен. Он будет осуществлен в самый оптимальный для деацетилирования период ферментации, поскольку процесс ацетилирования аминокислотных остатков лизина в белке зависит от условий роста бактерий. Так, например, ацетилирование белка увеличивается в стационарной фазе роста клеток [32] и в условиях ограничения азота [33].

Иными словами, удаление ацетильных групп с аминокислотных остатков лизина в белках инициируется только после того, как клетки штамма-продуцента начнут накапливать ацетат и запустится процесс неферментативного ацетилирования. Также конкуренция за кофактор НАД<sup>+</sup> между одним из ключевых ферментов гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой ГАФД и деацетилазой CobV не будет постоянной, что, в свою очередь, не скажется на уровне продукции треонина клетками, так как биосинтез данной аминокислоты является НАД<sup>+</sup>-зависимым. В качестве дополнительного контроля и лактоза, и галактоза были добавлены и в культуральную среду штаммов THR и TA-81, не несущих плазмиду pCOB. В этом случае оптическая плотность и уровень продукции треонина сохранялись на том же уровне, что и в контрольных штаммах THR и TA-81 без добавления лактозы и галактозы (данные не представлены).

Залог высокой эффективности штамма-продуцента — способность производить целевой продукт, используя источник углерода с высокой конверсией. Намного лучше, если штамм способен использовать разные источники углерода, не теряя своей эффективности, ведь себестоимость целевого продукта, получаемого с помощью микробного синтеза, в большой степени определяется стоимостью основного субстрата — источника углерода. Создание универсальных по потреблению источников углерода штаммов-продуцентов позволит производить целевой продукт, независимо от постоянного изменения цен на углеродные субстраты и невзирая на их локальную доступность.

*E. coli* может использовать множество различных источников углерода [34]. Каждый сахарный субстрат имеет уникальную систему, предназначенную для доставки его в клетку (через специальные транспортеры), ферменты для преобразования сахара в энергию и биомассу (метаболические ферменты) и регуляторные белки, которые контролируют время экспрессии этих белков (факторы тран-

**Таблица 4.** Результаты ферментаций штаммов-продуцентов треонина на средах с различными источниками углерода. Представлены усредненные результаты 3 независимых экспериментов

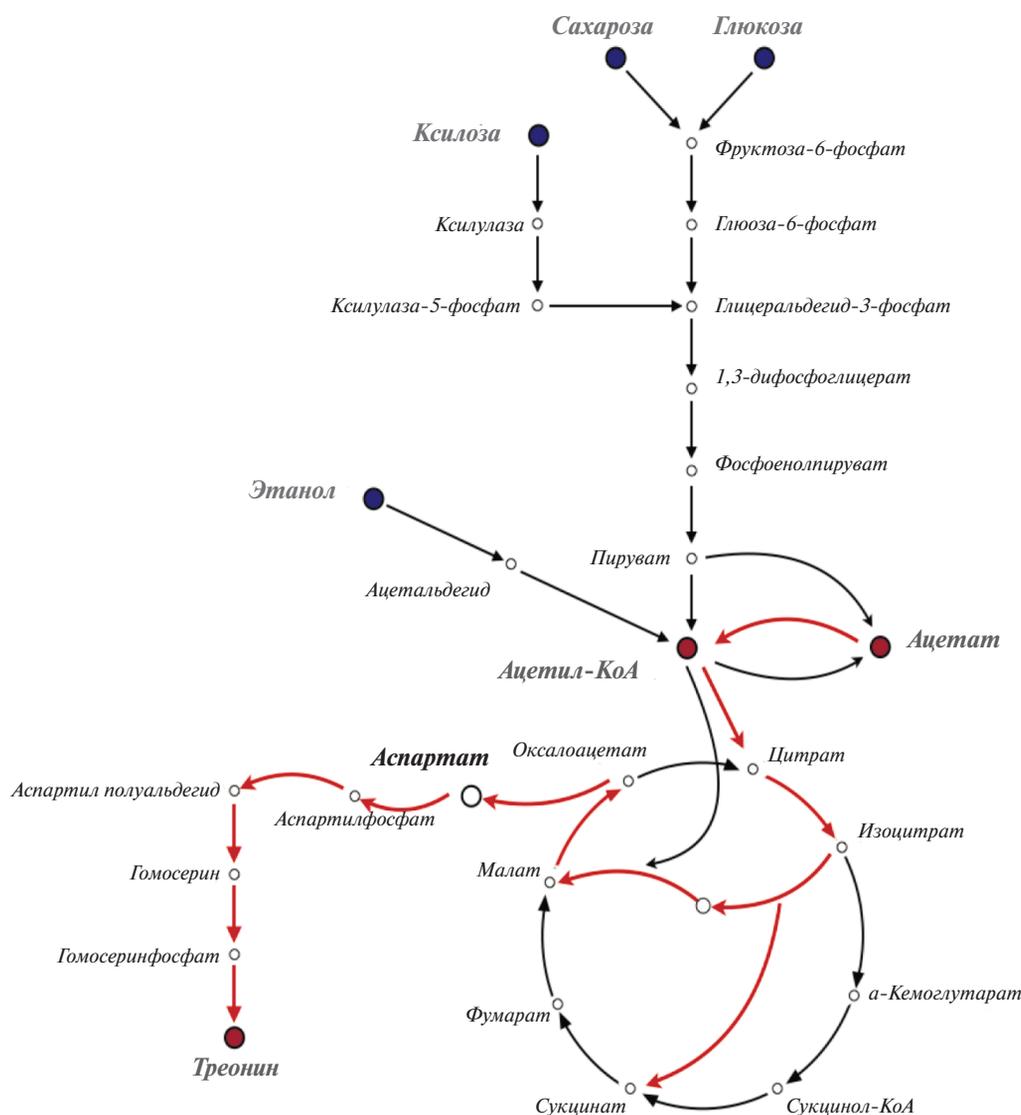
**Table 4.** Results of fermentations of threonine-producing strains on media with various carbon sources. The average results of 3 independent experiments are presented

Штамм	ОП <sub>600</sub>	Треонин, г/л	Продуктивность, г/л/ОП <sub>600</sub>
Ферментационная среда с глюкозой			
THR	7.0 ± 0.2	13.7 ± 0.2	<b>2.0</b>
THR-CobV	6.3 ± 0.1	14.4 ± 0.1	<b>2.3</b>
TA-81	6.5 ± 0.1	15.7 ± 0.5	<b>2.4</b>
TA-81-CobV	6.0 ± 0.1	18.8 ± 0.5	<b>3.1</b>
Ферментационная среда с ксилозой			
THR	6.9 ± 0.1	11.7 ± 0.5	<b>1.7</b>
THR-CobV	7.0 ± 0.1	12.0 ± 0.5	<b>1.7</b>
TA-81	6.9 ± 0.1	13.3 ± 0.2	<b>1.9</b>
TA-81-CobV	6.1 ± 0.1	15.0 ± 0.2	<b>2.4</b>
Ферментационная среда с сахарозой			
THR	1.9 ± 0.1	5.4 ± 0.1	<b>2.8</b>
THR-CobV	2.1 ± 0.1	6.7 ± 0.3	<b>3.2</b>
TA-81	2.2 ± 0.1	5.8 ± 0.3	<b>2.7</b>
TA-81-CobV	2.2 ± 0.2	7.0 ± 0.1	<b>3.1</b>
Ферментационная среда с этанолом			
THR	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	<b>0.3</b>
THR-CobV	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	<b>0.4</b>
TA-81	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.4	<b>0.3</b>
TA-81-CobV	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	<b>0.5</b>

скрипции). Наиболее изученными и понятными являются гексозные и пентозные сахара.

В качестве углеродных субстратов нами были выбраны несколько сахаров, имеющих различные химические структуры: глюкоза (гексоза), которая метаболизируется преимущественно по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, ксилоза (пентоза), которая метаболизируется по неокислительному пентозофосфатному пути, и сахароза (дисахарид), которая в первую очередь должна расщепиться на глюкозу и фруктозу.

Предпочтительным источником углерода для *E. coli*, как и для многих других бактерий, является глюкоза, обеспечивающая более высокую скорость роста по сравнению с другими сахарами. Различная скорость роста штамма на различных субстратах может стать причиной разных моделей ацетилирования аминокислотных остатков лизина в белках [35]. Также в качестве альтернативного источника углерода был выбран этанол, который способен напрямую преобразоваться в ацетил-



**Рис. 5.** Путь биосинтеза L-треонина и схема метаболизма ацетата клетками (выделена красным цветом) *Escherichia coli*.  
**Fig. 5.** Pathway of L-threonine biosynthesis and scheme of acetate metabolism by cells (highlighted in red) *Escherichia coli*.

КоА. Схемы метаболизма выбранных источников углерода представлены на рис. 5.

Анализ и сравнение уровня продукции треонина и оптической плотности всех штаммов на ферментационных средах с различными источниками углерода представлены в табл. 4.

Увеличение уровня экспрессии гена *cobV* приводит к удалению ацетильных групп с аминокислотных остатков лизина в белках. На сегодняшний день мало данных, показывающих, на активность каких ферментов и как именно влияет ацетилирование аминокислотных остатков лизина у *E. coli*. В результате деацетилирования свободные молекулы ацетата могут быть возвращены

в клеточный метаболизм, что, в свою очередь, приводит к увеличению выхода треонина. Как следует из данных табл. 4, штаммы, адаптированные к высоким концентрациям ацетата, демонстрируют более высокий уровень продукции треонина по сравнению с исходным штаммом при проведении ферментационного процесса на всех углеродных субстратах.

Для штаммов с увеличенным уровнем экспрессии гена *cobV* наибольший прирост продуктивности достигается при проведении ферментационного процесса на ксилозе – на 26.3%. Согласно литературным данным, клетки *E. coli* накапливают больше ацетата при росте на ксилозе, чем на глю-

козе [36], что, в свою очередь, может повышать степень неферментативного ацетилирования.

Таким образом, нами впервые показано, что усиление процесса деацетилирования, особенно в комплексе с усилением процесса ассимиляции ацетата, позволяет добиться повышения продукции треонина в штамме-производителе *E. coli* при культивировании на различных источниках углерода.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1071)

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, 10(5), 411–21. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)
2. Sharma A.K., Mahalik S., Ghosh C., Singh A.B., Mukherjee K.J. Comparative transcriptomic profile analysis of fed-batch cultures expressing different recombinant proteins in *Escherichia coli*. *AMB Express*. 2011, 1(1), 33. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-33>
3. Huang C.J., Lin H., Yang X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 39(3), 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>
4. Jensen E.B., Carlsen S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 5, 36(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bit.260360102>
5. El-Mansi M. Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 31(7), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0149-2>
6. Nakano K., Rischke M., Sato S., Märkl H. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 48(5), 597–601. <https://doi.org/10.1007/s002530051101>
7. March J.C., Eiteman M.A., Altman E. Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(11), 5620–5624. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5620-5624.2002>
8. Chou C.H., Bennett G.N., San K.Y. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44(8), 952–960. <https://doi.org/10.1002/bit.260440811>
9. Aristidou A.A., San K.Y., Bennett G.N. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnol. Prog.*, 1999, 15(1), 140–145. <https://doi.org/10.1021/bp980115v>
10. San K.Y., Bennett G.N., Aristidou A.A., Chou C.H. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1994, 2, 721:257–267. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb47399.x>
11. Akesson M., Hagander P., Axelsson J.P. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 5, 73(3), 223–230. <https://doi.org/10.1002/bit.1054>
12. Johnston W.A., Stewart M., Lee P., Cooney M.J. Tracking the acetate threshold using DO-transient control during medium and high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* in complex media. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 5, 84(3), 314–323. <https://doi.org/10.1002/bit.10772>
13. Kleman G.L., Chalmers J.J., Luli G.W., Strohl W.R. Glucose-stat, a glucose-controlled continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57(4), 918–923. <https://doi.org/10.1128/aem.57.4.918-923.1991>
14. Konstantinov K., Kishimoto M., Seki T., Yoshida T. A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 5, 36(7), 750–758. <https://doi.org/10.1002/bit.260360714>
15. Riesenbergs D., Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51(4), 422–430. <https://doi.org/10.1007/s002530051412>
16. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Post H., Fuhrer T., Cappadona S., Sánchez-Díaz N.C., Sauer U., Heck A.J., Altelaar A.F., Cánovas M. Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.*, 2014, 10(11), 762. <https://doi.org/10.15252/msb.20145227>
17. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Blanco-Catalá J., Iborra J.L., Cánovas M. cAMP-CRP co-ordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2011, 82(5), 1110–1128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07873.x>
18. Zhao K., Chai X., Marmorstein R. Structure and substrate binding properties of CobB, a Sir2 homolog protein deacetylase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 2004, 337(3), 731–741. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.060>
19. Starai V.J., Celic I., Cole R.N., Boeke J.D., Escalante-Semerena J.C. Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science*, 2002, 298(5602), 2390–2392. <https://doi.org/10.1126/science.1077650>
20. AbouElfetouh A., Kuhn M.L., Hu L.I., Scholle M.D., Sorensen D.J., Sahu A.K., Becher B., Antelmann H., Mrksich M., Anderson W.F., Gibson B.W., Schilling B., Wolfe A.J. The *E. coli* sirtuin CobB shows no preference for enzymatic and nonenzymatic lysine acetylation sub-

- strate sites. *Microbiologyopen*, 2015, 4(1), 66–83.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.223>
21. Sambrook, Joseph, Edward F. Fritsch, Tom Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. No. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press, 1989.
  22. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12), 6640–6645.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
  23. Saragliadis A., Trunk T., Leo J.C. Producing Gene Deletions in *Escherichia coli* by P1 Transduction with Excisable Antibiotic Resistance Cassettes. *J. Vis. Exp.*, 2018, 1, (139), 58267.  
<https://doi.org/10.3791/58267>
  24. Cheng L.-K., Wang J., Xu Q.-Y., Xie X.-X., Zhang Y.-J., Zhao C.-G., Chen N. Effect of feeding strategy on L-tryptophan production by recombinant *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol.*, 2012, 62, 1625–1634.  
<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0419-6>
  25. Valgepea K., Adamberg K., Nahku R., Lahtvee P.J., Arike L., Vilu R. Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Syst. Biol.*, 2010, 4, 166.  
<https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-166>
  26. Pinhal S., Ropers D., Geiselmann J., de Jong H. Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate. *J. Bacteriol.*, 2019, 201(13), e00147-19.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00147-19>
  27. Pathak S.S., Sandhu S.S., Rajak R.C. Mutation studies on fungal glucoamylase: a review. *Int. J. Pharma Bio. Sci.*, 2015, 5(2), 297–308.
  28. Rosenzweig R.F., Sharp R.R., Treves D.S., Adams J. Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics*, 1994, 137(4), 903–917.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/137.4.903>
  29. Helling R.B., Vargas C.N., Adams J. Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. *Genetics*, 1987, 116(3), 349–358.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/116.3.349>
  30. Horinouchi T., Tamaoka K., Furusawa C., Ono N., Suzuki S., Hirasawa T., Yomo T., Shimizu H. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMC Genomics*, 2010, 19, 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-579>
  31. Conrad T.M., Lewis N.E., Palsson B.Ø. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol. Syst. Biol.*, 2011, 5, 7(1), 509.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.42>
  32. Zhang J., Sprung R., Pei J., Tan X., Kim S., Zhu H., Liu C.F., Grishin N.V., Zhao Y. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics*, 2009, 8(2), 215–225.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M800187-MCP200>
  33. Weinert B.T., Iesmantavicius V., Wagner S.A., Schölz C., Gummesson B., Beli P., Nyström T., Choudhary C. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol. Cell.*, 2013, 51(2), 265–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.003>
  34. Gorke B., Stulke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, 6, 613–624.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
  35. Aidelberg G., Towbin B.D., Rothschild D., Dekel E., Bren A., Alon U. Hierarchy of non-glucose sugars in *Escherichia coli*. *BMC Syst. Biol.*, 2014, 8, 133.  
<https://doi.org/10.1186/s12918-014-0133-z>
  36. Schilling B., Basisty N., Christensen D.G., Sorensen D., Orr J.S., Wolfe A.J., Rao C.V. Global Lysine Acetylation in *Escherichia coli* Results from Growth Conditions That Favor Acetate Fermentation. *J. Bacteriol.*, 2019, 9, 201(9):e00768-18.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00768-18>

## The Effect of Deacetylation on Threonine Production by *Escherichia coli* Threonine Producing Strain

N. S. Plekhanova<sup>a, c, #</sup>, V. A. Livshits<sup>b</sup>, T. V. Khijniak<sup>a</sup>, M. S. Yurkova<sup>a</sup>, and A. N. Fedorov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup>*Kurchatov Complex of NBICS – Nature-like Technologies, Moscow, 123182 Russia*

<sup>c</sup>*Russian University of Chemical Technology named after D. I. Mendeleev, Moscow, 125047 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: plekhanovans@mail.ru*

**Abstract**—L-threonine is an essential amino acid that is used in the agricultural, pharmaceutical and food industries. In the present study, L-threonine production was significantly increased in a producer strain of *Escherichia coli* when grown on various carbon sources through an integrated approach to alter the strain's metabolism. First, increasing the ability of *E. coli* to assimilate acetate through adaptive laboratory evolution has reduced its negative impact on the fermentation process and threonine production. Secondly, strengthening the deacetylation process at the later stages of the fermentation process made it possible to achieve a significant increase in the productivity of the strains.

**Keywords:** Nε-lysine acetylation of proteins, deacetylase CobB, amino acids, threonine, mutagenesis, laboratory adaptive evolution, acetate accumulation