

*На правах рукописи*



Шмонова Екатерина Александровна

**ДЕГИДРОШИКИМАТДЕГИДРАТАЗА ИЗ *CORYNEBACTERIUM  
GLUTAMICUM* И ЕЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА  
3,4-ДИГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация выполнена в Лаборатории №1 Акционерного общества «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»).

**Научный руководитель:** **Дорошенко Вера Георгиевна**  
доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории №1 АО «АГРИ», г. Москва

**Официальные оппоненты:** **Манухов Илья Владимирович**  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики Физтех-школы физики и исследований им. Ландау Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный

**Пометун Анастасия Александровна**  
доктор химических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино

Защита диссертации состоится 20 июня 2024 года, начало в 16:00, на заседании диссертационного совета 02.1.003.06 на базе НИЦ «Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» и на сайте [www.nrcki.ru](http://www.nrcki.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 02.1.003.06,  
кандидат биологических наук

А.С. Жирник

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Биотехнологическое получение промышленно значимых и биологически активных соединений из возобновляемого сырья является перспективной альтернативой их традиционному химическому синтезу из нефтепродуктов. Последний энерго- и ресурсозатратен, а также менее экологичен.

Для микробиологического синтеза полезных соединений требуется конструирование высокоэффективных продуцентов, которые получают в настоящее время методами метаболической инженерии и синтетической биологии. В качестве платформ для конструирования продуцентов используются микроорганизмы, физиология и молекулярная биология которых известна, а также имеется эффективный генетический инструментарий. Среди бактерий перечисленным критериям, как известно, удовлетворяют лабораторные штаммы *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. На основе этих бактерий были созданы промышленные продуценты различных аминокислот. В настоящее время *C. glutamicum* и *E. coli* разрабатываются в качестве платформ для производства товарных химикатов, биотоплива, косметики и фармацевтических препаратов. Путем интеграции синтетической биологии, стратегий метаболической инженерии и информации об организмах, полученной с использованием «омикс»-технологий, создаются новые пути биосинтеза целевых веществ.

3,4-дигидроксibenзойная, или протокатеховая, кислота (3,4-DHBA) относится к естественным ароматическим метаболитам некоторых микроорганизмов. Она является сильным антиоксидантом и обладает рядом других полезных свойств. 3,4-DHBA может быть использована в фармацевтике и косметике. 3,4-DHBA синтезируется из 3-дегидрошикимовой кислоты (DHS) с помощью дегидрошикиматдегидратазы (DSD) (EC: 4.2.1.118). Этот фермент был обнаружен, в первую очередь, в почвенных микроорганизмах (прототипом является Qa-4 из *Neurospora crassa*), где он является частью катаболизма шикимовой и хинной кислот. Позже был охарактеризован биосинтетический фермент AsbF, синтезирующий 3,4-DHBA в качестве компонента сидерофора в патогенных видах *Bacillus*.

DHS является интермедиатом общего ароматического пути, что позволяет конструировать путь синтеза 3,4-DHBA из глюкозы в клетках микроорганизмов. Кроме того, было показано, что из 3,4-DHBA можно получать такие промышленно значимые соединения, как катехол, ванилин, *цис,цис*-муконовую кислоту (ссМА) и др.

К началу нашей работы были систематизированы данные о структурном разнообразии DSD (Peek et al., 2017). Были выделены 4 класса таких ферментов: бактериальные однодоменные (AsbF) и двудоменные, однодоменные из грибов (Qa-4) и мембраносвязанные. Некоторые DSD были охарактеризованы биохимически. Несмотря на то, что для отдельных DSD было продемонстрировано их применение для синтеза целевых продуктов,

сравнительный анализ каталитических свойств разных ферментов для продукции целевого соединения в выбранном организме не проводился.

Изучение ферментов из промышленно значимых непатогенных организмов имеет первостепенное значение, так как для микробиологического производства некоторых соединений бывает актуально использование генов одного организма (self-cloning). Было известно, что *C. glutamicum*, в отличие от *E. coli*, может катаболизировать шикимовую и хинную кислоты. Гены ферментов этого пути были идентифицированы, но сами ферменты, в том числе и DSD, не были охарактеризованы биохимически. Таким образом, изучение DSD из *C. glutamicum* актуально, как для более полной характеристики этой промышленно значимой бактерии, так и с точки зрения потенциального использования этого фермента.

### **Цель и задачи исследования**

Цель настоящей работы – молекулярно-биологическое исследование дегидрошикиматдегидратазы QsuB из *C. glutamicum*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Характеристика QsuB на основании её структуры;
2. Изучение биохимических свойств QsuB;
3. Получение продукции 3,4-DHBA с помощью QsuB в ферментации;
4. Сравнение QsuB с дегидрошикиматдегидратазами других типов.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

Впервые охарактеризована двудоменная дегидрошикиматдегидратаза QsuB из *C. glutamicum*. Белки QsuB и N-концевой домен QsuB, ответственный за дегидрошикиматдегидратазную активность, были выделены и исследованы на олигомерный состав и биохимические свойства. Каталитические свойства QsuB и N-QsuB исследованы *in vivo* с помощью модельных продуцентов 3,4-DHBA на основе *E. coli*, содержащих гены *qsuB* и *n-qsuB*. На основании *in vivo* и *in vitro* исследований QsuB и N-QsuB, сделан вывод о необходимости C-концевого домена для поддержания структурной стабильности QsuB.

Впервые проведен сравнительный анализ дегидрошикиматдегидратаз трёх классов: двудоменной QsuB и однодоменных AsbF и Qa-4 из бактерий и грибов, соответственно. Определены биохимические характеристики, включая ингибирование продуктом реакции, которые существенны для практического использования этих ферментов.

Сделано предположение по практическому использованию дегидрошикиматдегидратаз, связанных с катаболическим и биосинтетическим путями.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации представлялись на конкурсах молодых ученых АО «АГРИ» (2018, 2020); на конференции - The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research (2018); на онлайн симпозиуме EMBO | EMBL Symposium: New Approaches and Concepts in Microbiology (2021).

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы: 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и тезисы доклада на научной конференции.

**Личный вклад соискателя** состоял в анализе литературных данных, определении стратегий исследования, проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке материалов к публикациям, представлении полученных результатов на конференциях.

## Структура и объем работы

Диссертация состоит из стандартных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и обозначений, приложений. Работа изложена на 111 страницах и включает 31 рисунок, 14 таблиц и 167 цитируемых источников.

## Положения, выносимые на защиту

1. Дегидрошикиматдегидратаза из *C. glutamicum*, кодируемая геном *qsuB*, состоит из двух доменов. N-концевой домен N-QsuB отвечает за дегидрошикиматдегидратазную активность. C-концевой домен необходим для образования тетра- и октомеров QsuB.
2. С помощью модельных продуцентов 3,4-DHBA на основе *E. coli* исследованы свойства QsuB и N-QsuB, проявляющиеся *in vivo*. Показано, что штамм, экспрессирующий полноразмерный QsuB, продуцирует значительно больше 3,4-DHBA, чем штамм, экспрессирующий его укороченный вариант.
3. Проведено сравнение биохимических свойств дегидрошикиматдегидратаз QsuB, Qa-4 и AsbF, относящихся к разным классам. Установлено, что ферменты QsuB и Qa-4 имеют на порядки более высокую активность, чем AsbF. Последний обладал значительно более высоким сродством к субстрату и был более подвержен ингибированию конечным продуктом 3,4-DHBA, чем другие ферменты.
4. С помощью модельных продуцентов, экспрессирующих гены дегидрошикиматдегидратаз различных типов, продемонстрировано преимущество ферментов QsuB и Qa-4 для получения продукции 3,4-DHBA в клетках *E. coli*. Выявлено преимущество модельных продуцентов на основе *C. glutamicum*, способной накапливать большую биомассу, по сравнению со штаммами *E. coli*.

## Благодарности

Автор выражает признательность научному руководителю д.б.н. Дорошенко В.Г. за консультативную помощь на всех этапах выполнения диссертации. Автор выражает благодарность к.б.н. Смирнову С.В. (АО «АГРИ», Москва) за помощь в проведении экспериментов по очистке и определению олигомерного состава белков, к.х.н. Нольде Д.Е. (ИБХ РАН, Москва) за помощь в моделировании димеров и их анализе.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Почвенная бактерия *C. glutamicum* утилизирует хинат и шикимат в качестве источников углерода. Эти вещества, присутствующие в растительных отходах, катаболизируются до 3,4-DHBA и далее до  $\beta$ -кетoadипата с помощью ферментов, кодируемых опероном *qsuABCD* и кластером генов *pca*, соответственно (Рисунок 1). Метаболизм хината/шикимата до 3,4-DHBA и общий ароматический путь (синтез хоризмовой кислоты из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата) имеют общие интермедиаты 3-дегидрохинат, 3-дегидрошикимат и шикимат.

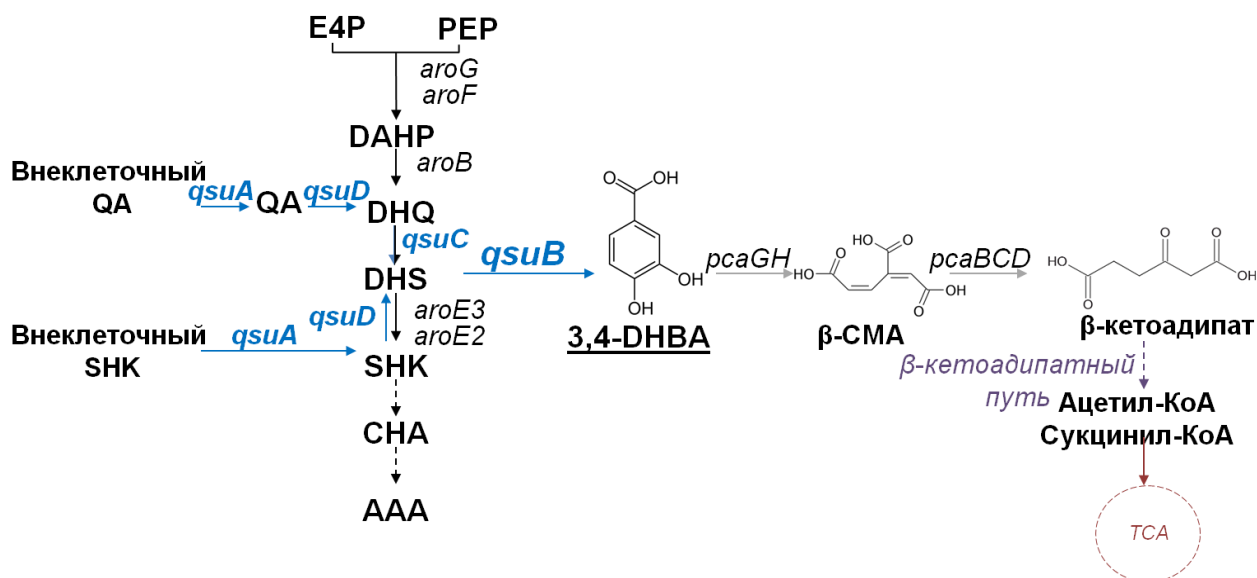


Рисунок 1 – Общий ароматический путь и деградация хината/шикимата в *C. glutamicum* (синий цвет)

Обозначения веществ: AAA – ароматические аминокислоты;  $\beta$ -СМА –  $\beta$ -карбокситрис,трис-муконовая кислота; СНА – хоризмат; ДАНР – 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат; DHS – 3-дегидрошикимат; DHQ – 3-дегидрохинат; E4P – эритрозо-4-фосфат; SHK – шикимат; PEP – фосфоенолпируват; QA – хинат.

Около стрелок реакций указаны гены *C. glutamicum*, кодирующие изоферменты ДАНР-синтазы (*aroG*, *aroF*), дегидрохинатсинтазу (*aroB*), шикиматдегидрогеназы (*aroE2*, *aroE3*), 3-карбокситрису-муконовую циклоизомеразу (*pcaBCD*), протокатехат-3,4-диоксигеназу (*pcaGH*), хинат/шикимат пермеазу (*qsuA*), дегидрошикиматдегидратазу (*qsuB*), 3-дегидрохинатдегидратазу (*qsuC*), хинат/шикиматдегидрогеназу (*qsuD*).

Источником дегидрошикиматдегидратазы QsuB в нашей работе являлась хромосомная ДНК штамма *C. glutamicum* AJ1511 (бесплазмидный вариант лабораторного штамма ATCC13869).

### 1. Классификация дегидрошикиматдегидратазы QsuB из *C. glutamicum* на основании гомологии её аминокислотной последовательности

Множественное выравнивание последовательностей дегидрошикиматдегидратаз (Рисунок 2) показало существование пяти классов таких ферментов с учётом недавно охарактеризованной однодоменной DSD QuiC2 из *Listeria monocytogenes* (Xue et al., 2020).

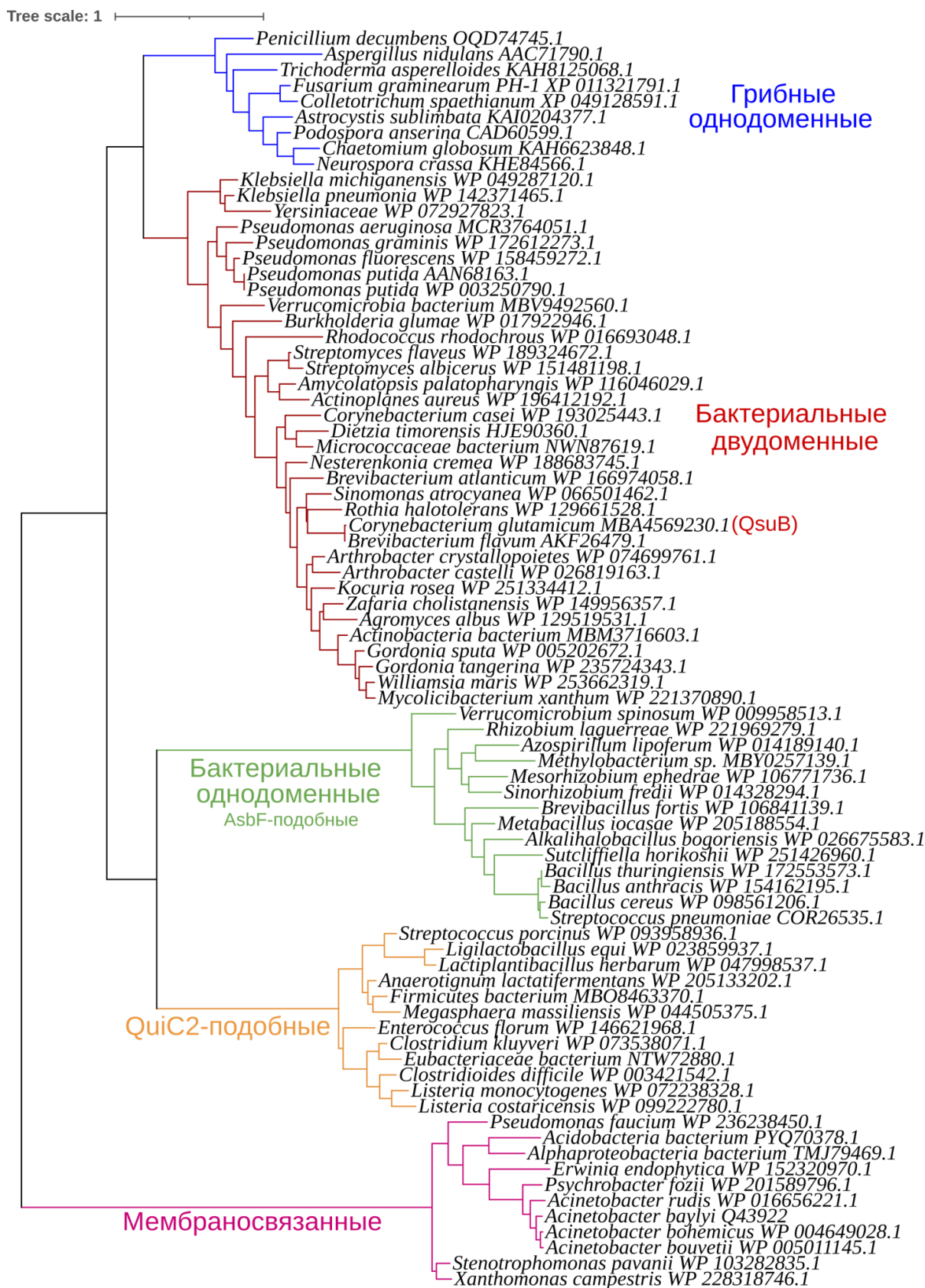


Рисунок 2 – Пять классов дегидрошикиматдегидратаз на основе филогенетического анализа

Дерево максимального правдоподобия было создано с помощью Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Каждая из четырех основных групп DSD подтверждается значением бутстрэп > 95%. Для бактериальных двудоменных DSD при построении дерева использовали последовательности только N-концевых доменов.

Анализ гомологов QsuB с помощью алгоритма blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) выявил наличие двух доменов в структуре белка. N-концевой домен (1 – 272 а.о.), гомологичный дегидрошикиматдигидратазам, был соединен линкером (20 а.о.) с C-концевым доменом (292 – 618 а.о.), который, как и у других двудоменных DSD, имел гомологию с 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназой (HPPD) (~ 30 %).

На основании гомологии QsuB и двудоменной DSD QuiC1 из *Pseudomonas putida* (39,9%), для которой имелась кристаллическая структура (PDB: 5HMQ, загружена из банка данных белков (PDB) (<http://www.rcsb.org>, по состоянию на 19 февраля 2020 г.) была построена трехмерная структура QsuB с помощью программы I-TASSER (Roy et al., 2010) (Рисунок 3).

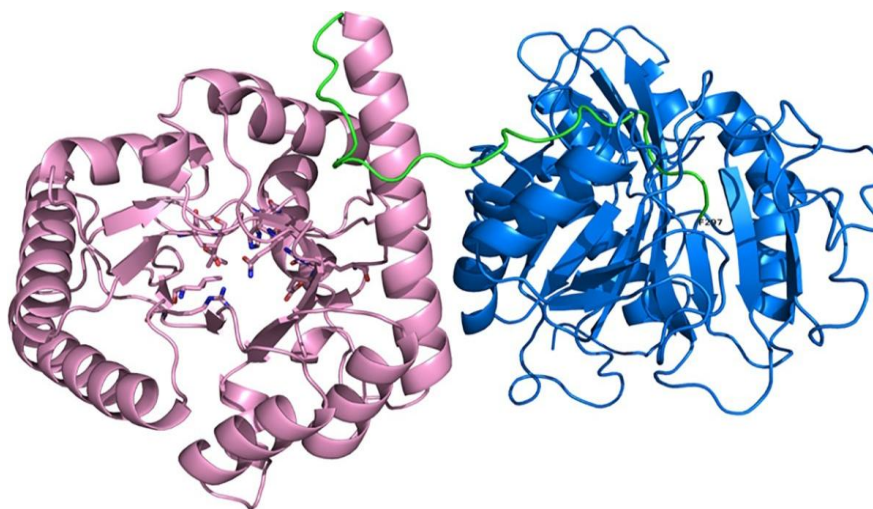


Рисунок 3 – Предсказанная структура мономера QsuB

N, C-концевые домены и линкер показаны розовым, синим и зеленым цветами, соответственно. Остатки активного центра DSD выделены красным и синим цветами. Стрелкой указан концевой остаток линкера Phe297, по которому был удалён C-концевой домен в N-QsuB.

## 2. Рекомбинантная экспрессия и определение олигомерного состояния QsuB и его N-концевого домена

Чтобы исследовать необходимость обоих доменов в синтезе 3,4-DHBA, были получены производные плазмиды pET22b, экспрессирующие полноразмерный QsuB и N-QsuB, в T7-системе. QsuB и N-QsuB были хорошо видны на электрофореграммах белков клеточного экстракта и составляли примерно 15 % от общего количества белков (Рисунок 4).

С помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) было установлено, что QsuB (Рисунок 5А) образует мультимерные структуры в водном буфере. Это были октамерные – 60 %, тетрамерные – 25 % и мономерные – 15 % формы (Рисунок 5В). Все фракции QsuB были протестированы на активность DSD. Она составляла  $35 \pm 3$ ,  $36 \pm 4$ ,  $46 \pm 7$  мкмоль/мин/мг для моно-, тетра- и октамерных форм, соответственно.

N-QsuB в водном буфере присутствовал, в основном, в виде мономеров (80 %) (Рисунки 5Б и Г).



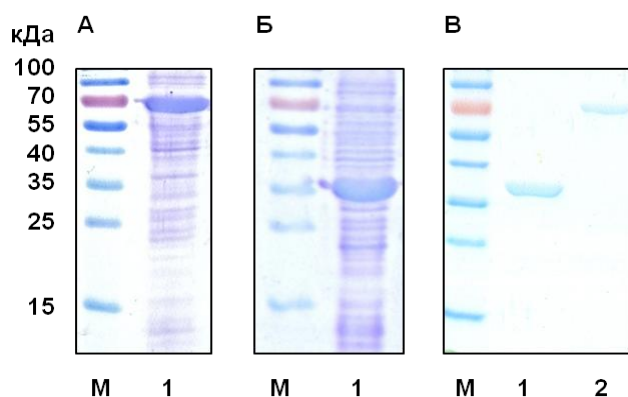


Рисунок 4 – Экспрессия QsuB и N-QsuB в T7-системе

Экстракты клеток после индукции ИПТГ анализировали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). М, маркер молекулярного веса. А. Дорожка 1, грубый экстракт клеток BL21(DE3)/pET22b-*qsuB*. Б. Дорожка 1, грубый экстракт клеток BL21(DE3)/pET22b-*n-qsuB*. В. Очищенные (6His-tag) белки: дорожка 1, N-QsuB (~ 34 кДа); дорожка 2, QsuB (~ 70 кДа).

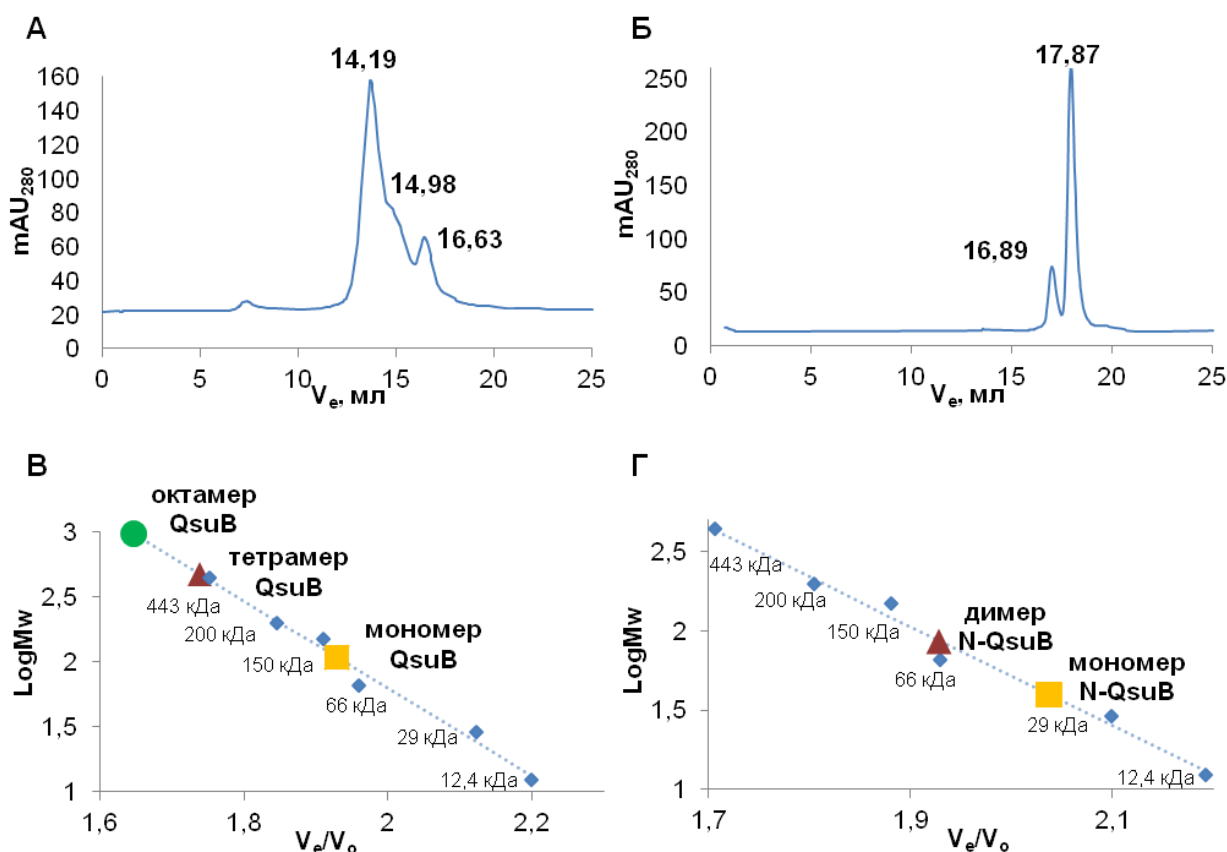


Рисунок 5 – Определение олигомерного состава QsuB и N-QsuB

Определение молекулярной массы проводили с помощью SEC. Белки детектировали путем мониторинга поглощения при 280 нм ( $mAU_{280}$ ). А. Гель-фильтрационный анализ QsuB: объемы элюции ( $V_e$ ) для мономерной, тетрамерной и октамерной форм составляли 16,63 мл, 14,98 мл и 14,19 мл, соответственно. Б. Гель-фильтрационный анализ N-QsuB: значения  $V_e$  мономерной и димерной форм составляли 17,87 мл и 16,89 мл, соответственно. Калибровочные кривые молекулярной массы для QsuB (В) и N-QsuB (Г) представляют собой зависимость  $mAU_{280}$  от  $V_e/V_0$ , где  $V_0$  – объем пустой колонки.  $V_0$  определяли экспериментально, как  $V_e$  синего декстрана (2000 кДа). Стандарты белков: цитохром с (12,4 кДа), карбоангидраза (29 кДа), альбумин (66 кДа), алкогольдегидрогеназа (150 кДа),  $\beta$ -амилаза (200 кДа), апоферритин (443 кДа) и тиреоглобулин (669 кДа), представлены синими ромбами.

### 3. Исследование функции С-концевого домена QsuB

Исходя из выявленной гомологии С-концевого домена с оксигеназой  $\alpha$ -кетокислот, мы предположили, что этот домен может проявлять 3,4-DHBA-диоксигеназную активность. Действительно, в процессе деградации 3,4-DHBA обычно подвергается расщеплению кольца, катализируемому диоксигеназой (Рисунок 1). Для проверки этого предположения, очищенный QsuB инкубировали в присутствии 3,4-DHBA в течение 60 мин с мониторингом УФ-спектра. Изменений в УФ-спектре, свидетельствующих о появлении  $\beta$ -карбоксии-*цис,цис*-муконовой кислоты ( $\beta$ -СМА), продукта диоксигеназной активности, а так же других изменений выявлено не было (Рисунок 6).

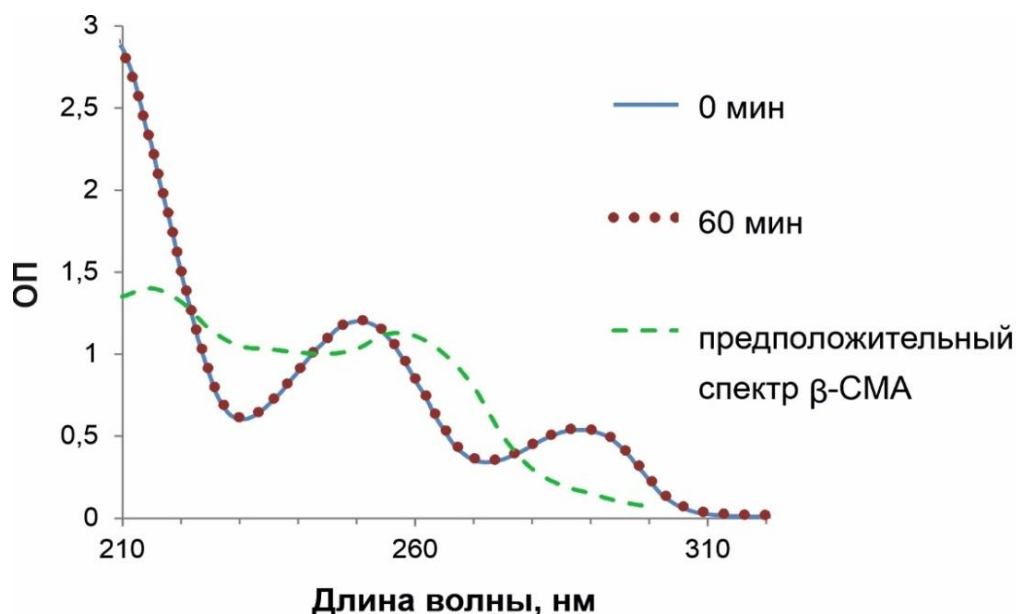


Рисунок 6 – Стабильность 3,4-DHBA в присутствии QsuB

УФ-спектр реакционной смеси, содержащей очищенный QsuB, до и после 60-минутной инкубации с 3,4-DHBA был одинаковым. УФ-спектр  $\beta$ -СМА показан Войтас-Василевской с соавт. (1988).

С-концевой домен мог участвовать в образовании мультимерных структур. По аналогии с QuiC1, гексамерная единица которого состояла из трёх димеров, мы предположили, что наблюдаемые в водном буфере октамерные и тетрамерные формы QsuB могли образовываться из димеров. Димеры белков QsuB и N-QsuB были смоделированы на основе димера QuiC1 с использованием системы молекулярной графики PyMOL (версия 1.2r3pre, Schrodinger, LLC). Анализ димеров проводился с помощью сервиса PISA ([https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html), по состоянию на 19 февраля 2020 г.) (Krissinel, Henrick, 2007). Димеры QsuB образовывались, в основном, за счёт образования водородных связей между N- и С-концевыми доменами разных мономеров. Поэтому, димер QsuB был более устойчивым ( $\Delta G = -31,8$  ккал/моль), чем димер N-QsuB ( $\Delta G = -1,0$  ккал/моль).

## 4. Биохимические свойства QsuB и N-QsuB

### 4.1 Анализ активности DSD для QsuB и N-QsuB

Тестирование активности DSD *in vitro* проводили спектрофотометрически, наблюдая за изменением абсорбции при 290 нм (Рисунок 7).

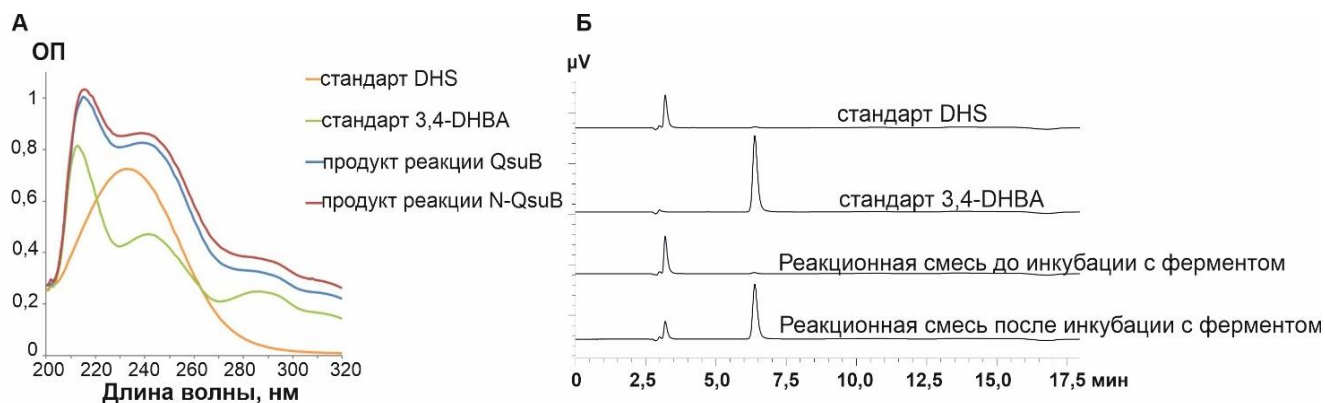


Рисунок 7 – Анализ реакционных смесей с помощью УФ-спектрофотометрии (А) и ВЭЖХ (Б) до и после инкубации с DSD

Меченные 6His-tag, очищенные белки QsuB и N-QsuB стимулировали превращение DHS в 3,4-DHBA (Рисунок 7А). Стандартная реакция проводилась при 20 °С в кювете объемом 1 мл в течение 1 мин и содержала фермент (20 нМ QsuB, 50 нМ N-QsuB), 0,1 М Трис-НСl буфер (рН 7,5), 10 мМ соли металла и 0,1 – 5 мМ DHS. Идентичность продукта реакции *in vitro* 3,4-DHBA была подтверждена с помощью ВЭЖХ (Рисунок 7Б).

### 4.2 Определение кинетических свойств QsuB и N-QsuB

Активность известных дегидрошикиматдегидратаз зависела от присутствия двухвалентных катионов. Поэтому каталитические активности QsuB и N-QsuB тестировали в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Максимальную активность для полноразмерного и укороченного ферментов обеспечивали ионы  $\text{Co}^{2+}$ . Определение зависимости активности от рН в присутствии  $\text{Co}^{2+}$  показало, что оптимальный рН находится в диапазоне 8,0 – 8,4. (Таблица 1).

Кинетические параметры QsuB и N-QsuB (Таблица 1) определяли по кинетическим кривым, полученным при физиологическом рН 7,5 (Рисунок 8). Как видно из Таблицы 1, удаление С-концевого домена QsuB приводило к снижению значений  $K_m$  и  $k_{cat}$  в два и три раза, соответственно, без существенного изменения  $K_{eff}$  ( $k_{cat}/K_m$ ). Таким образом, удаление С-концевого домена, хотя и снижало активность, но повышало специфичность фермента к субстрату.

Ингибирование QsuB и N-QsuB 3,4-DHBA было проанализировано с помощью метода относительных скоростей (Yoshino, Murakami, 2009). N-QsuB ингибировался неконкурентно, т.е. 3,4-DHBA связывалась с ферментом или фермент-субстратным комплексом с одинаковой аффинностью ( $K_i = K'_i \sim 0,69$  мМ) в сайте, отличном от сайта связывания субстрата. Для QsuB

было установлено ингибирование смешанного типа ( $K_i \sim 0,38$  мМ;  $K'_i \sim 0,96$  мМ). В этом случае,  $K_i < K'_i$ , т.е. связывание 3,4-DHBA происходит преимущественно со свободным ферментом.

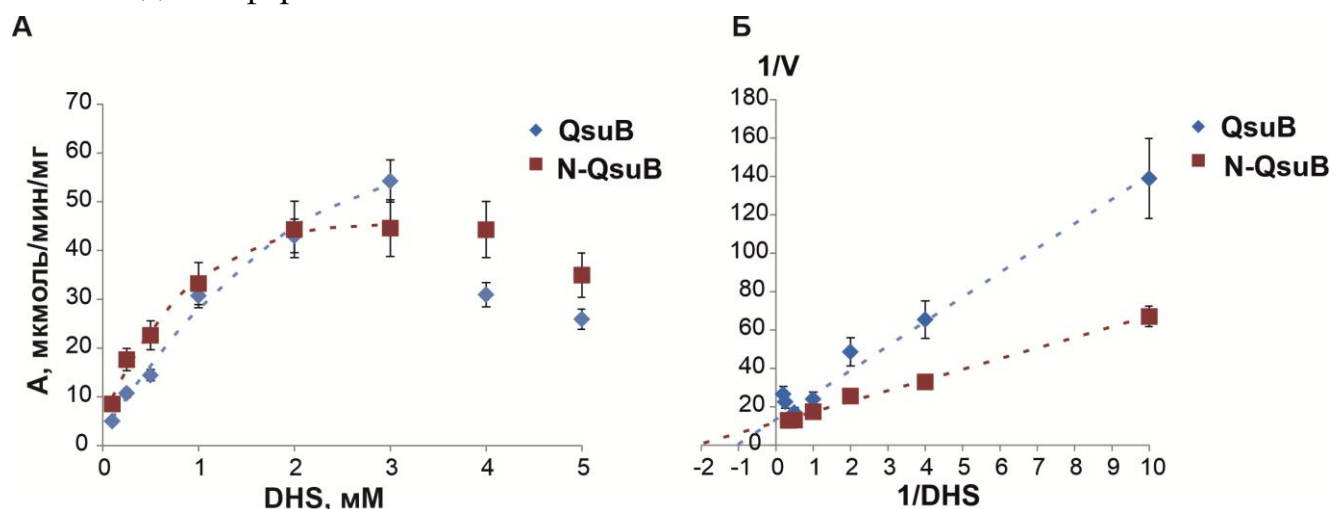


Рисунок 8 – Кинетические кривые QsuB и N-QsuB (pH 7,5)

А. Зависимость активности белка от концентрации субстрата.

Б. Двойные реципрокные графики кинетических кривых (20 нМ QsuB, 50 нМ N-QsuB).

Таблица 1 – Кинетические свойства<sup>a</sup> QsuB и N-QsuB

DSD	$K_m$ (DHS), мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , 10 <sup>-3</sup> /мкМ/с	Оптимальные		
				Металл-кофактор	pH	T °C
QsuB	960 ± 80	60,8 ± 0,9	60 ± 12	Co <sup>2+</sup>	8,0 – 8,4	23 – 25
N-QsuB	470 ± 70	23,4 ± 0,4	50 ± 6			не определялось

<sup>a</sup> Кинетические свойства QsuB и N-QsuB определяли при pH 7,5, 20°C.

Из сравнения  $K_i$  для N-QsuB и QsuB следовало, что удаление С-концевого домена привело к снижению ингибирования свободного фермента продуктом реакции.

N-QsuB имел более высокое сродство к субстрату и меньше ингибировался конечным продуктом, поэтому представлял интерес для изучения *in vivo*.

## 5. Конструирование продуцентов 3,4-DHBA на основе *E. coli*, экспрессирующих QsuB и его N-концевой домен

Для тестирования QsuB и N-QsuB *in vivo* штаммы-продуценты 3,4-DHBA получали с помощью методов рекомбинационной инженерии, позволяющих создавать прецизионные (с заданной нуклеотидной последовательностью) модификации хромосомы *E. coli* (Рисунок 9). Клетки *E. coli* были выбраны в качестве платформы, поскольку они не продуцируют и не утилизируют 3,4-DHBA. Сначала был получен штамм *E. coli* MG1655Δ*aroE*, который должен был накапливать DHS.

Ген *qsuB* был клонирован на интеграционном векторе рАН162 под контролем ИПТГ-индуцируемого промотора  $P_{lacUV5}$  и интегрирован в хромосому MG1655 $\Delta$ *aroE*. Штамм MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5-n-qsuB}$  был получен из MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5-qsuB}$  делетированием 3'-части *qsuB* (Рисунок 9).

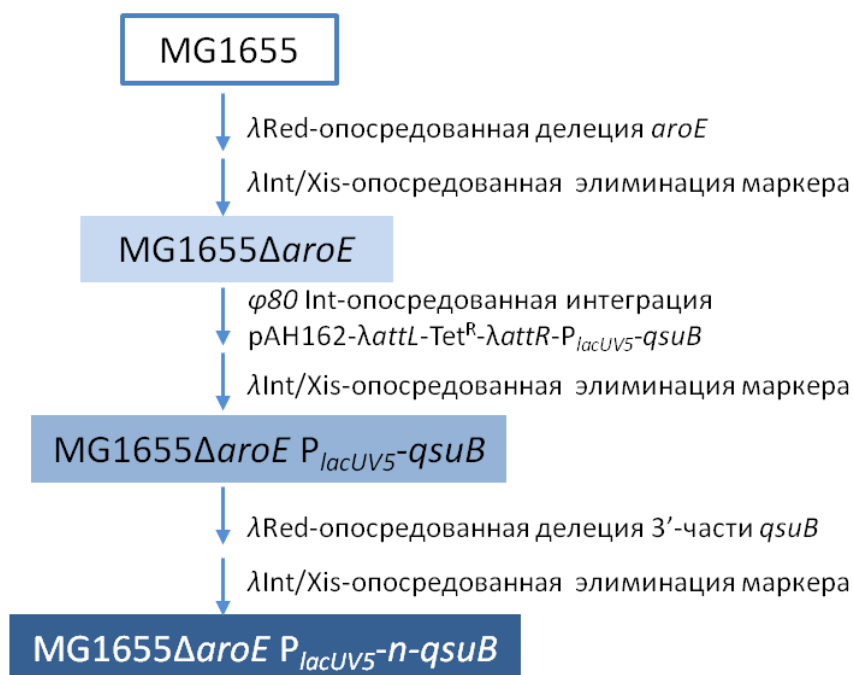


Рисунок 9 – Конструирование продуцентов 3,4-ДНВА *E. coli*, экспрессирующих QsuB и N-QsuB, на основе штамма MG1655 (GeneBank: U00096)  
Для получения делеций  $\Delta$ *aroE* и  $\Delta$ 3'-*qsuB* использовался  $\lambda$ Red- метод, модифицированный в АО «АГРИ» (Каташкина с соавт., 2005). Для интеграции *qsuB* в хромосому штамма MG1655 $\Delta$ *aroE* использовался метод Dual In/Out, разработанный в АО «АГРИ» (Minaeva et al., 2008).

## 6. Продукция 3,4-ДНВА из глюкозы с помощью QsuB и N-QsuB в клетках *E. coli*

Полученные штаммы тестировали на продукцию 3,4-ДНВА в ферментации с глюкозой, в качестве источника углерода (Таблица 2). Ферментацию проводили на комплексной среде с добавками ароматических витаминов: 4-гидроксibenзойной, *para*-аминобензойной, 2,3-дигидроксibenзойной кислот.

Штамм MG1655 $\Delta$ *aroE* продуцировал DHS (Таблица 2, строки 1 – 4). Штаммы с  $P_{lacUV5-qsuB}$  (Таблица 2, строки 5 – 8) и с  $P_{lacUV5-n-qsuB}$  (Таблица 2, строки 9 – 12) накапливали 3,4-ДНВА в культуральной жидкости обратно пропорционально накоплению DHS. Добавление  $Co^{2+}$ , в качестве оптимального кофактора, увеличивало накопление не только 3,4-ДНВА, но и DHS. Вероятно, увеличение DHS было вызвано увеличением потока углерода в ароматический путь за счёт повышения активности ДАНР-синтаз, являющихся металл-зависимыми ферментами (Рисунок 1).

Во всех случаях штамм MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5-n-qsuB}$  продуцировал меньше 3,4-ДНВА, чем MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5-qsuB}$ . В оптимальных условиях, т.е. при добавлении 10 мкМ  $Co^{2+}$ , QsuB практически полностью преобразовывал субстрат

в продукт, в отличие от N-QsuB (Таблица 2, строки 8 и 12). Таким образом, QsuB был более оптимален для продукции 3,4-DHBA *in vivo*, чем его укороченный однодоменный вариант.

Таблица 2 – Продукция 3,4-DHBA из глюкозы (40 г/л) в пробирках

№	Штамм MG1655ΔaroE	DHS, г/л	3,4-DHBA, Глю (44 ч),		1 мМ ИПТГ	CoCl <sub>2</sub> , мкМ
			г/л	г/л		
1	–	3,7 ± 0,1	< 0,1	5 ± 1	–	–
2		4 ± 1	< 0,1	10 ± 1	+	–
3		5,1 ± 0,1	< 0,1	4,0 ± 0,1	–	10
4		5,0 ± 0,1	< 0,1	5 ± 1	+	
5	P <sub>lacUV5</sub> - <i>qsuB</i>	2,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	10 ± 1	–	–
6		~ 0,1	3,2 ± 0,3	8 ± 3	+	–
7		3,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	6 ± 1	–	10
8		~ 0,2	3,9 ± 0,1	7 ± 1	+	
9	P <sub>lacUV5</sub> - <i>n-qsuB</i>	3,4 ± 0,2	~ 0,1	10 ± 1	–	–
10		2,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	8 ± 4	+	–
11		5,1 ± 0,1	< 0,1	6 ± 1	–	10
12		4,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	6 ± 1	+	

## 7. Сравнение QsuB с дегидрошикиматдегидратазами других типов

До нашей работы (Shmonova et al., 2022) сравнение дегидрошикиматдегидратаз разных типов в одинаковых экспериментальных условиях не проводили. Для сравнения с QsuB были выбраны известные однодоменные ферменты: Qa-4 из *Neurospora crassa* и AsbF из *Bacillus thuringiensis*.

### 7.1 Рекомбинантная экспрессия дегидрошикиматдегидратаз в *E. coli*

Гены *asbF* и *qa-4* (кодон-оптимизированные для *E. coli*) были так же, как и *qsuB*, клонированы в векторе pET22b и экспрессированы в T7-системе. Анализ грубых экстрактов клеток BL21(DE3), содержащих плазмиды pET22b-*asbF*, pET22b-*qa-4* и pET22b-*qsuB*, выявил более интенсивную полосу белка AsbF по сравнению с таковыми для Qa-4 и QsuB в SDS-PAGE (Рисунок 10). Разница в количестве этих белков, видимо, была вызвана разным уровнем экспрессии гетерологичных генов. Последний зависел от области инициации трансляции (Translation Initiation Region - TIR), которая включала как общую для всех последовательность перед ATG кодоном (~ 25 нуклеотидов), так и 5'-последовательности кодирующей рамки (~ 35 нуклеотидов). Действительно, количественная оценка эффективности трансляции клонированных генов, проведённая с помощью UTR Designer (Seo et al., 2014), показала, что TIR RBS<sub>φ10</sub>-*asbF* могла обеспечивать в пять и четыре раза более высокую трансляцию по сравнению с TIR RBS<sub>φ10</sub>-*qsuB* и TIR RBS<sub>φ10</sub>-*qa-4*, соответственно.

AsbF, Qa-4 и QsuB были очищены как рекомбинантные DSD с С-концевой 6His-tag меткой. Полученные образцы белков использовали для анализа активности DSD.

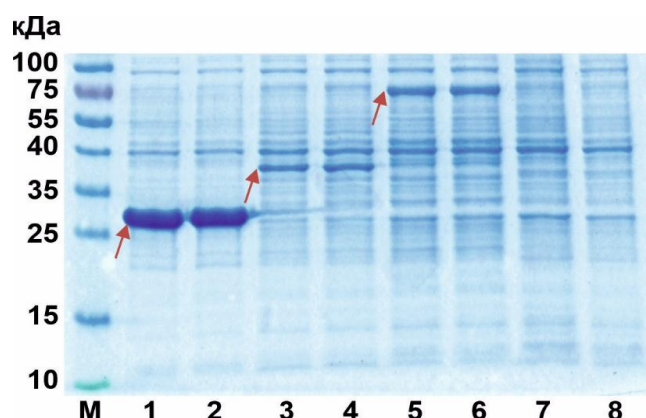


Рисунок 10 – SDS-PAGE белков из грубых экстрактов клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-DSD

Красные стрелки указывают на целевой белок. Дорожка: 1-2 – AsbF, 3-4 – Qa-4, 5-6 – QsuB, 7-8 – отрицательный контроль без DSD. Общая концентрация белка на каждой дорожке была равна 10 мкг.

## 7.2 Сравнение свойств дегидрошикиматдегидратаз различных типов

Сравниваемые очищенные ферменты тестировали на активность DSD после обработки ЭДТА, в присутствии  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Как и QsuB, AsbF и Qa-4 не проявляли активности DSD после обработки ЭДТА. В отличие от QsuB, AsbF и Qa-4 были более активны в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ , что соответствовало литературным данным. Дальнейшие эксперименты *in vitro* проводили с предпочтительным для каждого фермента кофактором.

Ферменты Qa-4 и QsuB характеризовались более высокой активностью, чем AsbF (Рисунок 11). AsbF, в свою очередь, был более специфичен к субстрату (Таблица 3).

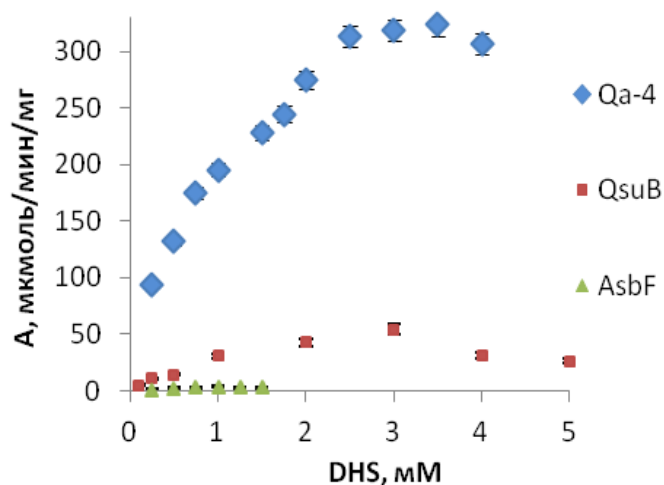


Рисунок 11 – Кинетические кривые Qa-4, QsuB и AsbF (pH 7,5; 20 °C)

Если каталитические параметры QsuB были определены нами впервые (Shmonova et al., 2020), то для Qa-4 и AsbF эти параметры соответствовали по порядкам величин уже известным (Ströman et al., 1978; Harrington et al., 2017; Fox et al., 2008).

Таблица 3 – Каталитические свойства DSD (pH 7,5; 20 °C)

Фермент	$K_m$ (DHS), мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , 10 <sup>-3</sup> /мкМ/с
AsbF	36 ± 7	1,1 ± 0,1	29 ± 7
Qa-4	600 ± 20	219 ± 1	370 ± 70
QsuB	960 ± 80	61 ± 1	60 ± 12

Все три фермента были также впервые исследованы на предмет ингибирования продуктом реакции (Shmonova et al., 2020, 2022). Этот параметр мог быть полезным при выборе фермента для микробиологического синтеза 3,4-DHBA. Для сравнения определяли концентрации полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>) 3,4-DHBA (Рисунок 12).

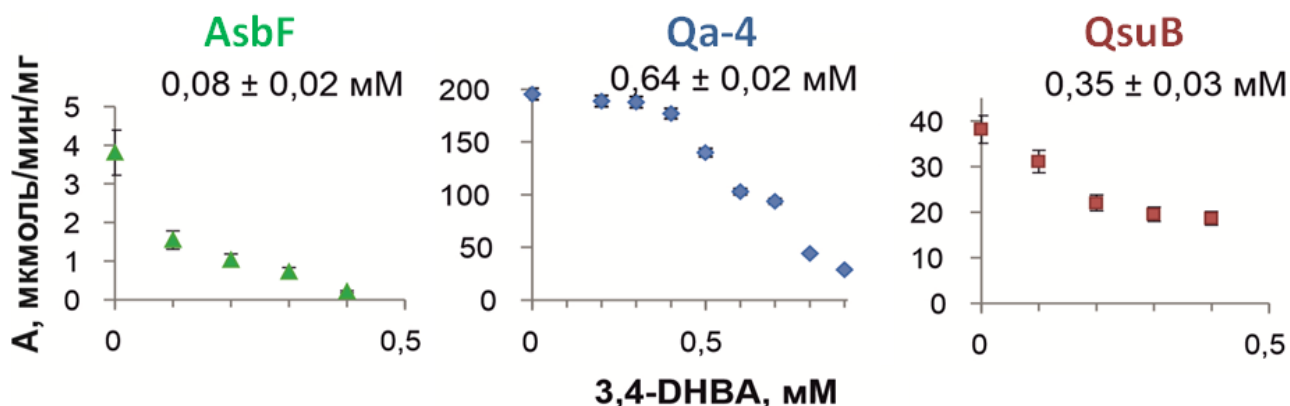


Рисунок 12 –Профили ингибирования AsbF (А), Qa-4 (Б) и QsuB (В) 3,4-DHBA. Значения IC<sub>50</sub> указаны в верхней части графиков.

AsbF был более чувствительным к добавлению 3,4-DHBA с IC<sub>50</sub> в 4 и 8 раз ниже, чем у QsuB и Qa-4, соответственно.

Мы предположили, что ингибирование AsbF продуктом реакции, а так же его более низкая активность могут быть связаны с блокированием 3,4-DHBA в его активном центре. Сравнение активного центра AsbF с QsuB и Qa-4 показало, что у последних ферментов отсутствуют некоторые аминокислотные остатки с объемными боковыми цепями, которые могут удерживать 3,4-DHBA в активном центре AsbF (Shmonova et al., 2022).

### 7.3 Конструирование продуцентов 3,4-DHBA на основе *E. coli*, экспрессирующих AsbF и Qa-4 и их сравнение со штаммом MG1655Δ*aroE* P<sub>lacUV5</sub>-*qsuB*

Для сравнения активностей дегидрошикиматдегидратаз *in vivo* в клетках *E. coli* гены *asbF* и *qa-4* были интегрированы в хромосому штамма MG1655Δ*aroE*



в тот же сайт ( $\phi 80attB$ ), который использовался для интеграции *qsuB* ранее. Для этого были сконструированы интеграционные плазмиды рАН162- $\lambda attL$ -Tet<sup>R</sup>- $\lambda attR$ - $P_{lacUV5}$ -*asbF* и рАН162- $\lambda attL$ -Tet<sup>R</sup>- $\lambda attR$ - $P_{lacUV5}$ -*qa-4*. Плазмидный репликон с маркером устойчивости к тетрациклину, как и прежде, удаляли с помощью  $\lambda$  Int/Xis рекомбиназы.

Изогенные штаммы MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*asbF*, MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*qa-4* и MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*qsuB* тестировали на продукцию 3,4-ДНВА в ферментации в пробирках (Таблица 4). Для полной индукции генов дегидрошикиматдегидратаз добавляли ИПТГ. Штамм MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*asbF* продуцировал 0,2 г/л 3,4-ДНВА только в присутствии ИПТГ (Таблица 4, строка 4). Штаммы MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*qa-4* и MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*qsuB* накапливали ~ 2 и 1 г/л 3,4-ДНВА без индукции (Таблица 4, строки 5, 7) и ~ 2,7 г/л при добавлении ИПТГ (Таблица 4, строки 6, 8). Все штаммы также накапливали DHS в количествах, обратно пропорциональных синтезируемой 3,4-ДНВА.

Низкая продукция 3,4-ДНВА для штамма MG1655 $\Delta$ *aroE*  $P_{lacUV5}$ -*asbF* могла быть обусловлена ингибированием фермента, так как уровень трансляции TIR RBS $_{lacUV5}$ -*asbF*, определенный *in silico*, превосходил уровни трансляции TIR RBS $_{lacUV5}$ -*qsuB* и TIR RBS $_{lacUV5}$ -*qa-4* в 5 и 6 раз, соответственно.

Штаммы, экспрессирующие QsuB и Qa-4, демонстрировали одинаковую продукцию 3,4-ДНВА при добавлении ИПТГ и практически не накапливали DHS в этих условиях. Это означало, что более высокие каталитические свойства Qa-4 могли не проявиться в штамме MG1655 $\Delta$ *aroE* из-за недостаточного синтеза предшественника DHS.

Таблица 4 – Продукция 3,4-ДНВА из глюкозы (40 г/л) в пробирках

№	Штамм MG1655 $\Delta$ <i>aroE</i>	ОП <sub>540</sub>	DHS, г/л	3,4-ДНВА, г/л	Глю (44ч), г/л	1 мМ ИПТГ
1	–	31 ± 1	3,4 ± 0,2	<0,1	9,5 ± 0,2	–
2	–	31 ± 1	3,3 ± 0,1	<0,1	10,0 ± 0,3	+
3	$P_{lacUV5}$ - <i>asbF</i> <sub><math>\phi 80attB</math></sub>	30 ± 1	2,3 ± 0,1	<0,1	9,9 ± 0,3	–
4	$P_{lacUV5}$ - <i>asbF</i> <sub><math>\phi 80attB</math></sub>	31 ± 1	2,3 ± 0,1	0,20 ± 0,01	9,5 ± 0,1	+
5	$P_{lacUV5}$ - <i>qa-4</i> <sub><math>\phi 80attB</math></sub>	29 ± 1	0,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	11,0 ± 0,4	–
6	$P_{lacUV5}$ - <i>qa-4</i> <sub><math>\phi 80attB</math></sub>	29 ± 1	0,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	12,0 ± 0,8	+
7	$P_{lacUV5}$ - <i>qsuB</i> <sub><math>\phi 80attB</math></sub>	30 ± 1	2,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	10,2 ± 0,2	–
8	$P_{lacUV5}$ - <i>qsuB</i> <sub><math>\phi 80attB</math></sub>	30 ± 1	0,2 ± 0,1	2,7 ± 0,2	11,0 ± 1,5	+

#### 7.4 Конструирование плазмидных продуцентов 3,4-ДНВА на основе *C. glutamicum*

Для проверки активностей AsbF, Qa-4 и QsuB *in vivo* в клетках *C. glutamicum* гены этих ферментов были клонированы в векторе рVK9-*lacI* под контролем ИПТГ-индуцируемого промотора  $P_{trc-id2}$ . Плазмиды вводили в

сконструированный с помощью рекомбинационной инженерии штамм-реципиент K118. Этот штамм был получен на основе *C. glutamicum* AJ1511 (GenBank: AP017557.2). В последний были введены делеции, инактивирующие деградацию 3,4-ДНВА (*DpsaHG*) и основную шикиматдегидрогеназу (*DaroE3*).

Делеции были получены с помощью рекомбинационного метода, основанного на системе RecE/RecT профага *Rac E. coli* (Lobanova et al., 2022). В результате двойной рекомбинации по гомологичным плечам в хромосому встраивался фрагмент ДНК, содержащий ген маркера устойчивости к хлорамфениколу, фланкированный мутантными сайтами *lox*, *lox71-cat-lox66* (Рисунок 13). Маркер удаляли с помощью рекомбиназы Cre (Gorshkova et al., 2018).

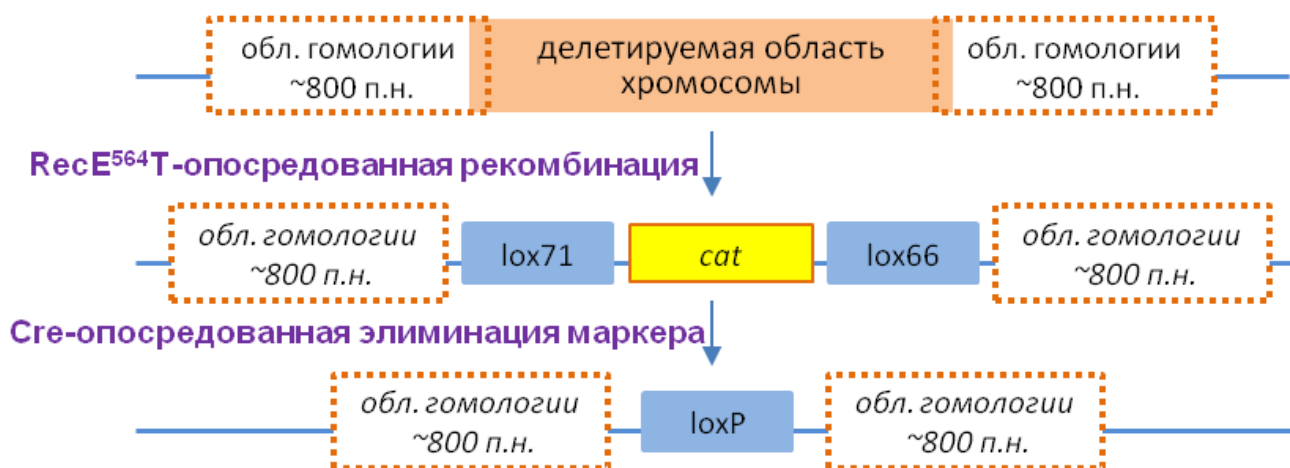


Рисунок 13 – Схема получения немаркированных делеций в хромосоме *C. glutamicum*

## 7.5 Сравнение продуцентов 3,4-ДНВА на основе *C. glutamicum*

K118 содержал нативный ген *qsuB* в составе оперона *qsuABCD*, который активировался шикиматом, хинатом и хоризматом. Предполагалось, что вклад нативной DSD будет значительно ниже, чем вклад ферментов, гены которых будут присутствовать на плазмиде. Ферментацию проводили на комплексной среде, содержащей ароматические аминокислоты, до полного потребления глюкозы (Таблица 5).

Гены *asbF* и *qa-4*, клонированные на плаزمиде, не были оптимизированы для *C. glutamicum*. Последовательность *asbF* практически не содержала редких для *C. glutamicum*, но оптимальных для *E. coli* кодонов лейцина UUA (3 кодона), тогда как в случае *qa-4* таких кодонов было много (26 кодонов). Неоптимальная экспрессия гена *qa-4*, вероятно, была причиной низкой продукции штамма K118 с плазмидой *pVK9-lacI-P<sub>trc-id2</sub>-qa-4* (Таблица 5, строка 7). Если без ИПТГ накопление 3,4-ДНВА штаммами, экспрессирующими *AsbF* и *Qa-4* (Таблица 5, строки 2, 3), было равно штамму с вектором (Таблица 5, строка 1), то в присутствии ИПТГ, штамм, содержащий плазмиду с геном *asbF* продуцировал больше 3,4-ДНВА (Таблица 5, строка 6), чем штамм с *qa-4* (Таблица 5, строка 7). Продукция 3,4-ДНВА в присутствии *AsbF* в *C. glutamicum* была выше, чем в

*E. coli*. Возможно, на это повлияли, как амплификация гена *asbF*, так и более высокая биомасса *C. glutamicum*, достигаемая в ферментации.

Наибольшая продукция 3,4-ДНВА, ~ 2,7 г/л, была получена для K118 с плазмидой pVK9-*lacI*-P<sub>*trc-id2*</sub>-*qsuB* без индукции ИПТГ (Таблица 5, строка 4). Этот штамм имел высокую активность DSD даже без добавления ИПТГ, видимо, за счет неполной репрессии промотора и высокой специфической активности QsuB.

В присутствии ИПТГ штамм K118/pVK9-*lacI*-P<sub>*trc-id2*</sub>-*qsuB* рос медленнее, накапливал меньшую биомассу, что привело к снижению продукции 3,4-ДНВА (Таблица 5, строка 8). Вероятно, возрастание активности QsuB при индукции ИПТГ привело к дефициту DHS, который требуется для синтеза менахинона, единственного хинона, присутствующего в *C. glutamicum*, необходимого для функционирования дегидрогеназ. Менахинон синтезируется из СНА, который в штамме  $\Delta$ *aroE3* образуется при участии минорных шикиматдегидрогеназ (*aroE2*, *qsuD*) (Рисунок 1). Действительно, введение плазмиды pVS7-*aroG4* с геном ДАНР-синтазы *E. coli* AroG4, устойчивой к добавлению ароматических аминокислот, восстановило накопление биомассы. Продукция 3,4-ДНВА в биплазмидном штамме K118/pVK9-*lacI*-P<sub>*trc-id2*</sub>-*qsuB*/pVS7-*aroG4* в присутствии ИПТГ восстановилась до уровня штамма с pVK9-*lacI*-P<sub>*trc-id2*</sub>-*qsuB* без индукции. Примесь DHS практически отсутствовала. Вероятно, штамм K118/pVK9-*lacI*-P<sub>*trc-id2*</sub>-*qsuB*/pVS7-*aroG4* имел дополнительный потенциал к накоплению 3,4-ДНВА после дальнейшего увеличения синтеза DHS.

Таблица 5 – Продукция 3,4-ДНВА в *C. glutamicum* K118 (Глю – 50 г/л) в пробирках

№	Плаزمида	ОП <sub>540</sub>	DHS, г/л	3,4-ДНВА, г/л	t <sup>a</sup> , ч	1 мМ ИПТГ
1	pVK9	85±1	0,6±0,1	0,7±0,1	24	
2	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>asbF</i>	84±1	0,6±0,1	0,7±0,1	24	
3	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>qa-4</i>	81±1	0,5±0,1	0,6±0,1	24	–
4	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>qsuB</i>	90±1	<0,1	2,7±0,1	24	
5	pVK9	85±1	0,5±0,1	0,7±0,1	24	
6	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>asbF</i>	84±2	0,2±0,1	1,5±0,3	24	
7	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>qa-4</i>	83±3	0,2±0,1	1,2±0,1	24	+
8	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>qsuB</i>	62±2	<0,1	2,2±0,2	29	
9	pVK9/ pVS7	84±6	0,5±0,1	0,6±0,1	24	
10	pVK9/ pVS7- <i>aroG4</i>	87±1	0,8±0,1	0,7±0,1	24	+
11	pVK9- <i>lacI</i> -P <sub><i>trc-id2</i></sub> - <i>qsuB</i> / pVS7- <i>aroG4</i>	82 ±6	<0,1	2,7±0,1	27	

t<sup>a</sup> – время культивирования до полного потребления глюкозы.

Таким образом, фермент QsuB оказался наилучшим для получения продукции 3,4-ДНВА в *C. glutamicum*. Qa-4 мог быть недооценён, в силу неоптимальной экспрессии гена *qa-4*. В целом, модельные продуценты на основе *C. glutamicum* накапливали больше биомассы и обеспечивали продукцию 3,4-ДНВА за более короткое время ферментации (~ 24 ч), чем *E. coli* (~ 48 ч).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выбор фермента, совмещённый с выбором микроорганизма-хозяина для получения целевого соединения микробиологическим способом, является необходимой стадией при конструировании продуцента.

В работе изучалась связь каталитических свойств фермента и его способности к получению продукта реакции в клетках бактерий на примере дегидрошикиматдегидратазы, вновь охарактеризованной QsuB из *C. glutamicum* и отличающихся от неё по структуре AsbF из *B. thuringiensis* и Qa-4 из *N. crassa*.

На основании определённых биохимических характеристик мы пришли к выводу, что природная функция фермента, участие в катаболизме хината/шикимата или биосинтезе сидерофора, определяет его свойства. Для ферментов катаболизма низкое сродство к субстрату 3-дегидрошикимату обеспечивает его доступность для синтеза ароматических аминокислот и других ароматических соединений, которые образуются из хоризмата. Биосинтетический AsbF имел сродство к субстрату сравнимое и даже более низкое, чем шикиматдегидрогеназы ( $K_m \sim 100 - 200$  мкМ). Этот фермент ингибировался 3,4-ДНВА ( $IC_{50} \sim 0,08$  мМ), чтобы не допустить переизбытка этого продукта и обеспечить синтез ароматических соединений.

Высокая специфическая активность Qa-4 и QsuB, наряду с менее выраженным ингибированием конечным продуктом, были решающими для достижения более высоких титров 3,4-ДНВА в сконструированных модельных продуцентах на основе *E. coli* и *C. glutamicum*. В целом, можно порекомендовать катаболические DSD для получения 3,4-ДНВА микробиологическим способом, а биосинтетический AsbF для конструирования путей получения других продуктов-производных 3,4-ДНВА.

Что касается выбора бактерии-хозяина для производства 3,4-ДНВА, то *C. glutamicum* обладает рядом преимуществ перед *E. coli*.

Полисахариды клеточной стенки *E. coli* могут быть причиной аллергии у человека и животных. *C. glutamicum* обладает статусом GRAS (Generally Recognized as Safe), то есть считается безопасной для орального использования человеком и животными. Во-вторых, эта бактерия обладает, как правило, более высокой устойчивостью к различным соединениям, чем *E. coli*. Это может быть обусловлено различиями в метаболизме, как нами было показано на примере устойчивости к саркозину (Doroshenko et al., 2023). В наших опытах штамм *C. glutamicum* накапливал больше биомассы и обеспечивал продукцию 3,4-ДНВА за более короткое время, что делает его более перспективным для дальнейшей оптимизации.

## ВЫВОДЫ

1. QsuB из *C. glutamicum* относится к двудоменным ферментам. Домен N-QsuB ответственен за дегидрошикиматдегидратазную активность ( $k_{cat}$   $23,4 \pm 0,4$  с<sup>-1</sup>). С-концевой домен необходим для олигомеризации и максимальной активности фермента ( $k_{cat}$   $60,8 \pm 0,9$  с<sup>-1</sup>).

2. Определены биохимические характеристики QsuB: зависимость от металла-кофактора, с предпочтением к  $Co^{2+}$ ;  $K_m$   $960 \pm 80$  мкМ;  $k_{eff}$   $(60 \pm 12) \times 10^{-3}$ /мкМ/с;  $T_{оптим}$  23 – 25 °С;  $pH_{оптим}$  8,0 – 8,4; смешанный тип ингибирования продуктом реакции.

3. Проведено сравнение *in vitro* QsuB с однодоменными ферментами: Qa-4 из *N. crassa* и AsbF из *B. thuringiensis*. Ферменты катаболизма хината/шикимата QsuB и Qa-4 имели на порядок более высокие  $k_{cat}$  и  $K_m$  и были менее подвержены ингибированию 3,4-ДНВА ( $IC_{50}$   $0,35 \pm 0,03$ ;  $0,64 \pm 0,02$  мМ), чем биосинтетический AsbF ( $IC_{50}$   $0,08 \pm 0,02$  мМ).

4. С использованием QsuB, Qa-4 и AsbF продемонстрировано получение продукции 3,4-ДНВА в штаммах *E. coli* (~ 3; 3 и 0,2 г/л) и *C. glutamicum* (~ 3; 1,5 и 1,5 г/л).

5. Модельный продуцент на основе *C. glutamicum* накапливал больше биомассы и обеспечивал продукцию 3,4-ДНВА за более короткое время, чем *E. coli*, что свидетельствует о перспективности *C. glutamicum* в качестве платформы для получения 3,4-ДНВА.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Экспериментальные работы

1. Shmonova E.A., Voloshina O.V., Ovsienko M.V., Smirnov S.V., Nolde D.E., Doroshenko V.G. Characterization of the *Corynebacterium glutamicum* dehydroshikimate dehydratase QsuB and its potential for microbial production of protocatechuic acid // PloS One. – 2020. – Т. 15. – №8. – e0231560.
2. Shmonova E.A., Savrasova E.A., Fedorova E.N., Doroshenko V.G. Comparative Analysis of Catabolic and Anabolic Dehydroshikimate Dehydratases for 3,4-DHBA Production in *Escherichia coli* // Microorganisms. – 2022. – Т. 10. – № 7. – 1357.
3. Doroshenko V.G., Slesareva A.E., Shmonova E.A., Kivero A.D. Sarcosine sensitivity in *Escherichia coli* is mediated by activation of the glycine cleavage system // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2023. – Т. 87. – № 8. – С. 916-924.

### Материалы конференций и симпозиумов

4. Shmonova E.A., Voloshina O.V., Ovsienko M.V., Doroshenko V.G. Characterization of *Corynebacterium glutamicum* dehydroshikimate dehydratase QsuB // The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research. – Moscow, Russia. – 24-25 September, 2018. – С. 62.