

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОДНОЭТАПНОГО БИОСИНТЕЗА ПОЛИЛАКТИДА МИКРООРГАНИЗМАМИ

Полилактид – биосовместимый термопластичный алифатический полиэфир, мономером которого является молочная кислота. Способность к биологическому разрушению под действием внеклеточных микробных деполимераз до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  делает полилактид чрезвычайно перспективным в практическом применении по сравнению с химическими полимерами, которые не разлагаются и поэтому накапливаются в окружающей среде.

Известно, что мономером полилактата является молочная кислота, которую в промышленности получают методом микробного брожения сахаров из возобновляемого сырья. Молочная кислота – одна из самых распространенных гидроксикарбоновых кислот в организмах и в основном синтезируется из пирувата с помощью лактатдегидрогеназы. Однако данных о микроорганизмах, продуцирующих полилактид не было известно, возможно из-за отсутствия метаболических путей для полимеризации молочной кислоты в природе. Поэтому, разработки генной инженерии сосредоточились на использовании ферментативных путей - полимеризации молочной кислоты на основе полигидроксиалканат биосинтетического пути [1].

В исследованиях [2] отмечено, что ферментативная полимеризация молочной кислоты обеспечивалась благодаря использованию пропионил-КоА-трансферазы и разработанной полигидроксиалканатсинтазы. Это может упростить действующий биохимический процесс гибридного производства полилактида к одностадийному ферментативному производству. Созданные микроорганизмы, способны как к биосинтетическим, так и полимеризирующим путям синтеза молочной кислоты, могут использоваться как фабрики клеток, превращающих недорогие источники углерода, такие как глюкоза и ксилоза, в полилактид .

Исследования группы ученых во главе с *Dudley Q. M.* [3] показали, что по сравнению с синтезом *in vitro* полилактида с помощью трансферазы КоА и инженерной полигидроксиалканатсинтазы, синтез *in vivo* полилактида с помощью микробного штамма имеет ряд преимуществ. Система синтеза *in vivo*, как правило, является более надежной по сравнению с системой *in vitro*, поскольку сохраняется стабильность ферментов и промежуточных продуктов (метаболитов),

несмотря на изменение параметров процесса в определенном диапазоне, таких как pH и температура. Кроме того, микробная система не требует очистки ферментов и регенерации ко-факторов, являющихся одними из самых дорогих процессов. Поскольку широкомасштабный процесс ферментации молочной кислоты хорошо отлажен, лабораторную систему синтеза полилактида *in vivo* можно легко перенести на промышленное производство.

Подходы для оптимизации метаболических путей с целью синтеза полилактида могут быть рационально подобраны на основе имеющейся информации о метаболических путях и вовлеченных ферментах. Например, ген *ldhA*, кодирующий лактатдегидрогеназу, превращающей пируват в лактат, может быть выбран мишенью амплификации для содействия биосинтеза полилактида. Амплификация осуществляется любым способом: заменой нативного промотора *ldhA* на промотор *trc*, который может сильнее экспрессировать ген *ldhA* по сравнению с нативным промотором путем удаления естественных регуляций нативного промотора или чрезмерной экспрессии гена *ldhA* на основе плазмидной системы. В исследовании *Jung Y. K.* и *Lee S.* [4] рассматривается другой подход, предусматривающий инактивацию метаболических путей, которые могут уменьшить метаболические потоки по направлению к лактату. В этом контексте ген *pflB*, кодирующий пируватформатлиазу, удаляли из хромосомы для повышения уровня пирувата, блокируя превращение пирувата в формиат. Предполагается, что увеличение количества пирувата будет направлено на синтез лактата.

Другой подход направлен на воспроизведение в системе *in silico* метаболической модели в масштабе генома. Он может идентифицировать хромосомные гены, которые следует удалить или чрезмерно экспрессировать для увеличения темпов производства полилактида, учитывая скорость роста клеток. В исследовании *Jung Y. K.* и соавторов [5] по результатам моделирования выбрали два целевых гена - ген *adhE*, кодирующий ацетальдегид/алкогольдегидрогеназу, и ген *acs*, кодирующий ацетил-КоА-синтетазу. Действительно, изъятие *adhE* и чрезмерная экспрессия *acs* путем замены природного промотора на более сильный промотор показали эффективность при синтезе полилактида.

Следовательно, для синтеза полилактида путем одностадийного ферментативного производства из возобновляемого сырья разработаны и построены неестественные метаболические пути при полимеризации молочной кислоты на основе хорошо известного микробного полиэфира - биосинтетического пути полигидроксиалканоата. По новому биосинтетическому пути полилактида молочная кислота может

быть превращена в лактил-КоА с помощью пропионил-КоА-трансферазы, а затем лактил-КоА может полимеризоваться в полилактид с помощью сконструированной полигидроксиалаконатсинтазы. Ключевым прорывом в построении этого пути было то, что природные полигидроксиалканоатсинтезы, обладающие лишь незначительной активностью в отношении лактил-КоА, успешно усовершенствованы для восприятия лактил-КоА с повышенной специфичностью субстрата и активности. Эта микробная система имеет ряд преимуществ перед современными процессами, заключающимися в ферментации с последующим химическим процессом полимеризации. Во-первых, это упрощает нынешний многоступенчатый процесс производства полилактида в одноступенчатое брожение с использованием возобновляемого сырья. Во-вторых, микробная система открывает возможность получения разных сополимеров, придающих более разнообразные свойства материалу. В-третьих, когда применяется одноступенчатый процесс брожения очистка полимеров является простым и экономически выгодным этапом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chung H., et al. Biobased production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015; 36: 73–84.
2. Choi S.Y., et al. Biocatalytic synthesis of polylactate and its copolymers by engineered microorganisms. *Methods Enzymol*. 2019; 627: 125–162.
3. Dudley Q. M., Karim A. S., & Jewett, M. C. Cell-free metabolic engineering: Biomanufacturing beyond the cell. *Biotechnology Journal*. 2015; 10: 69–82.
4. Ren Y., et al. Microbial synthesis of a novel terpolyester P(LA-co-3HB-co-3HP) from low-cost substrates. *Microbial Biotechnology*. 2017; 10: 371–380.
5. Mizuno S., et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxy-4-methylvalerate and 2-hydroxy-3-phenylpropionate units from a related or unrelated carbon source. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018; 125: 295–300.