

## Применение бактерий со сверхэкспрессией гена *cadA* для биоконверсии лизина в кадаверин

Анна Викторовна Ахова<sup>1✉, 2</sup>, Полина Михайловна Федоненко<sup>2, 3</sup>,  
Михаил Сергеевич Шумков<sup>4</sup>, Александр Георгиевич Ткаченко<sup>1, 5</sup>

<sup>1✉</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия, akhovan@mail.ru

<sup>2, 3</sup> Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

<sup>3</sup> p.fedonenko@mail.ru

<sup>4</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия, shumkovm@gmail.com

<sup>5</sup> agtkachenko@iegm.ru

**Аннотация.** Сконструирован штамм *Escherichia coli* со сверхэкспрессией гена *cadA*, кодирующего лизиндекарбоксилазу, и проведена оценка его способности конвертировать лизин в кадаверин в зависимости от pH среды. Клетки, сверхэкспрессирующие лизиндекарбоксилазу, получены на основе штамма *E. coli* BL21DE3, трансформированного плазмидой pET19b, несущей ген *cadA* из *E. coli* MC4100. Бактерии культивировали в 5 мл бульона LB при 37°C без перемешивания, сверхэкспрессию *cadA* запускали добавкой 1 mM изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (при ОП<sub>600</sub>=0.6), через 2 ч. клетки отмывали и переносили в среду с pH 7.4 или 4.0 с добавкой 5 г/л L-лизина гидрохлорида. Количество синтезированного кадаверина определяли методом ТСХ с предварительной дериватизацией дансилхлоридом. Максимальная скорость биоконверсии наблюдалась при культивировании клеток, сверхэкспрессирующих *cadA* в среде с pH 4.0 (2.8±0.7 ммоль кадаверина/г АСБ в час). Скорость биоконверсии в базовых условиях (pH 7.4, базовая экспрессия) была в 6.8 раз ниже. Конечная концентрация кадаверина при культивировании в среде с pH 7.4 и/или в условиях отсутствия сверхэкспрессии гена *cadA* составила 0.8–1 mM, в условиях сверхэкспрессии гена в нейтральной среде накапливалось до 1.2 mM кадаверина, а в кислой среде – 1.8 mM.

**Ключевые слова:** кадаверин, лизин, декарбоксилаза, сверхэкспрессия, цельноклеточные биокатализаторы

**Для цитирования:** Применение бактерий со сверхэкспрессией гена *cadA* для биоконверсии лизина в кадаверин / А. В. Ахова, П. М. Федоненко, М. С. Шумков, А. Г. Ткаченко // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 1. С. 54–60. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-1-54-60>.

**Благодарности:** работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ГР № 124020500028-4).

## MICROBIOLOGY

Original article

## The use of bacteria with overexpression of the *cadA* gene for the bioconversion of lysine into cadaverine

Anna V. Akhova<sup>1✉, 2</sup>, Polina M. Fedonenko<sup>2, 3</sup>, Mikhail S. Shumkov<sup>4</sup>,  
Alexander G. Tkachenko<sup>1, 5</sup>

<sup>1✉</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia, akhovan@mail.ru

<sup>2</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

<sup>3</sup> p.fedonenko@mail.ru

<sup>4</sup> Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, shumkovm@gmail.com

<sup>5</sup> agtkachenko@iegm.ru

**Abstract.** The article is devoted to construction of an *Escherichia coli* strain with overexpression of the *cadA* gene encoding lysine decarboxylase, as well as to assessment of its ability to convert lysine to cadaverine depending on the pH of the medium. The overexpressing strain was constructed on the base of *E. coli* BL21DE3 strain transformed with the pET19b plasmid carrying the *cadA* gene from *E. coli* MC4100. Bacteria were grown

in 5 mL of LB broth at 37 °C without stirring, overexpression of *cadA* was induced by the addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (at OD<sub>600</sub> = 0.6), after 2 hours the cells were washed and transferred to a medium with pH 7.4 or 4.0 with the addition 5 g/L L-lysine hydrochloride. The amount of synthesized cadaverine was quantified by TLC with preliminary derivatization with dansyl chloride. The maximum rate of bioconversion was observed when cells overexpressing *cadA* were cultivated in a medium with pH 4.0 (2.8 ± 0.7 mmol cadaverine/g dry weight per hour). The rate of bioconversion under basal conditions (pH 7.4, basal expression) was 6.8 times lower. The final concentration of cadaverine when cultivated in a medium with pH 7.4 and/or in the absence of overexpression of the *cadA* gene was 0.8-1 mM; under conditions of overexpression of the gene, up to 1.2 mM of cadaverine accumulated in a neutral medium, and 1.8 mM in an acidic medium.

**Keywords:** cadaverine, lysine, decarboxylase, overexpression, whole cell biocatalysts

**For citation:** Akhova A. V., Fedonenko P. M., Shumkov M. S., Tkachenko A. G. [The use of bacteria with overexpression of the *cadA* gene for the bioconversion of lysine into cadaverine]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 1 (2024): pp. 54-60. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-1-54-60>.

**Acknowledgments:** the work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (GR No. 124020500028-4).

## Введение

Для клонирования и экспрессии рекомбинантных генов в клетках бактерий разработаны специальные генно-инженерные системы. В общем случае, рекомбинантный ген вводится в бактериальную клетку в составе векторной молекулы, которая – с целью повышения копийности – сохраняется в цитоплазме в состоянии эписомы. Генетически модифицированные подобным образом микроорганизмы обычно используют для наработки рекомбинантных белков, но также возможно их применение в качестве целноклеточных биокатализаторов.

В частности, бактериальные клетки, способные к сверхэкспрессии лизиндекарбоксилазы за счет генетической модификации путем введения векторных молекул, пытаются использовать для биосинтеза кадаверина (1.5-диаминопентана). Особый интерес биосинтез кадаверина представляет потому, что на основе данного диамина могут быть получены пластики с улучшенными свойствами, а эффективный метод химического синтеза этого соединения не разработан [Kind et al., 2014; Huang et al., 2021]. В настоящее время существует два основных направления использования генетически модифицированных микроорганизмов для биосинтеза 1.5-диаминопентана: они либо выступают в качестве целноклеточных биокатализаторов одностадийной реакции конверсии лизина в кадаверин, либо применяются для синтеза целевого вещества из простых субстратов в процессе ферментации [Ma et al., 2017; Nærdal, 2017].

Одним из первых был получен биокатализатор для конверсии лизина в кадаверин на основе клеток *Escherichia coli*, сверхэкспрессирующих ген *cadA* [Nishi et al., 2006], кодирующий индуцибельную изоформу лизиндекарбоксилазы в клетках *E. coli*, проявляющую максимальную активность при pH 5–6. В дальнейшем на основе клеток, сверхэкспрессирующих *cadA*, были разработаны биокатализаторы с дополнительными модификациями, направленными на повышение выхода продукта [Kim et al., 2015; Ma et al., 2015]. Также реализованы разработки на основе сверхэкспрессии гена *ldcC*, кодирующего конститутивную лизиндекарбоксилазу *E. coli*, максимально активную в среде с нейтральным pH [Oh et al., 2015; Shin et al., 2018].

Основным источником генов лизиндекарбоксилаз для создания биокатализаторов служит *E. coli*, хотя спектр используемых микроорганизмов постепенно расширяется. Например, созданы генно-модифицированные штаммы *E. coli*, сверхэкспрессирующие лизиндекарбоксилазы из клеток *Klebsiella pneumoniae*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Hafnia alvei* [Oh et al., 2015; Kim et al., 2016; Kim et al., 2019].

С целью создания биокатализаторов для синтеза кадаверина из лизина, как правило, применяют генно-инженерные конструкции, обеспечивающие сверхэкспрессию лизиндекарбоксилазы в ответ на добавку индуктора, в частности, системы на основе плазмид pET и pKE [Kim et al., 2015; Oh et al., 2015]. Альтернативным подходом является помещение гена, кодирующего лизиндекарбоксилазу, под контроль сильного конститутивного промотора, что обеспечивает его постоянную сверхэкспрессию [Qian, Xia, Lee, 2011; Ting et al., 2021].

Цель работы – конструирование штамма *E. coli*, сверхэкспрессирующего ген *cadA*, и оценка его способности конвертировать L-лизин в кадаверин в зависимости от pH среды.

## Материалы и методы

### Объекты и условия культивирования

В качестве объекта исследования использован штамм *E. coli* BL21DE3, трансформированный сконструированной нами плазмидой pET19b\_cadA.

Бактериальные клетки, сохраняемые на скошенном агаре LB, переносили в 5 мл бульона LB (pH 7.4) с добавкой 1% глюкозы и культивировали при 37°C без перемешивания в течение 16–18 ч. В среду для культивирования клеток, несущих плазмиду pET19b\_cadA, добавляли 100 мкг/мл ампициллина. Полученную культуру разводили до плотности ОП<sub>600</sub> = 0.1–0.15 в 20 мл свежего бульона LB (pH 7.4) с добавкой (при необходимости) 100 мкг/мл ампициллина и культивировали при 37°C без перемешивания. По достижении культурой плотности ОП<sub>600</sub> = 0.6 для индукции сверхэкспрессии гена *cadA* добавляли 1 мМ изопрропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), после чего продолжали культивирование в описанных выше условиях в течение 2 ч. Затем бактериальную культуру центрифугировали (16 000 g, 3 мин.), и бактериальные клетки переносили в бульон LB с pH 7.4 или pH 4.0, содержащий 5 г/л L-лизина гидрохлорида (общий объем культуры составлял 5 мл). Культивирование проводили в описанных выше условиях.

#### **Определение оптической плотности культуры и концентрации абсолютно сухой биомассы**

Оптическую плотность измеряли при 600 нм (ОП<sub>600</sub>) в кювете с длиной оптического пути равной 1 см с использованием спектрофотометра UV-1280 (Shimadzu, Япония). Концентрацию абсолютно сухой биомассы (АСБ) в культуре рассчитывали, используя предварительно полученный калибровочный график зависимости данного показателя и оптической плотности культуры (ОП<sub>600</sub>).

#### **Конструирование штамма *E. coli* со сверхэкспрессией гена *cadA***

Нуклеотидную последовательность гена *cadA* амплифицировали с применением праймеров cadANdeI 5'-GTCatATGTTGGGAGGGCCTTTTTTAC-3' и cadABamH 5'-GGATCCGGCAAGCCACTCCCTTG-3' с использованием в качестве матрицы хромосомы *E. coli* MC4100 (сайты рестрикции подчеркнуты; различия с нуклеотидной последовательностью *E. coli* W3110, GenBank AP009048.1 показаны строчными буквами). Полученный ПЦР-продукт длиной 2 226 пар нуклеотидов клонировали в вектор pGEM-T easy (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. pGEM-T easy-вектор со вставкой секвенировали с использованием стандартных праймеров M13F/R, плазмиду с подтвержденной последовательностью гена *cadA* выделяли из клеток методом щелочного лизиса [Maniatis, Fritsch, Sambrook, 1982] и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и BamHI (Fermentas, Литва). Полученный ген *cadA* очищали электрофоретически, экстрагировали из агарозного геля с применением набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва) и лигировали в вектор pET19b (Novagen, США), предварительно также обработанный эндонуклеазами NdeI и BamHI. Полученную конструкцию pET19b\_cadA проверяли с помощью ПЦР и секвенирования с использованием стандартных праймеров T7Pro/Term, после чего трансформировали в штамм *E. coli* BL21DE3 (Invitrogen) для экспрессии рекомбинантных белков.

**Количественный анализ кадаверина** осуществляли методом тонкослойной хроматографии с предварительной дериватизацией дансилхлоридом [Akhova, Tkachenko, 2022].

**Статистический анализ результатов** проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc, США). Числовые данные в тексте представлены в виде среднее ± стандартное отклонение, на рисунке столбцы соответствуют среднему значению, отрезки (разбросы) – стандартной ошибке среднего.

## **Результаты и их обсуждение**

В данном исследовании проведена оценка способности бактерий *E. coli*, характеризующихся сверхэкспрессией гена *cadA*, кодирующего лизиндекарбоксилазу, осуществлять биконверсию лизина в кадаверин. Для создания продуцента структурная часть гена *cadA* была слита с T7lac-промотором в составе плазмидного вектора pET19b (рис. 1). Полученную плазмиду pET19b\_cadA трансформировали в штамм BL21DE3, представляющий собой производное *E. coli* BL21, в хромосому которого введен фаг λDE3, несущий ген РНК-полимеразы T7 под контролем *lacUV* промотора. Экспрессия последнего запускается добавкой изопрропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), что приводит к наработке РНК-полимеразы фага T7, обеспечивающей считывание целевого гена в составе эписомального вектора. Обязательными условиями сверхэкспрессии гена являлись присутствие плазмиды pET19b\_cadA в клетках и добавка ИПТГ в среду культивирования. Источником гена *cadA* послужил штамм MC4100.

Затем было проведено сравнение способности продуцировать кадаверин клетками с базовым уровнем экспрессии лизиндекарбоксилазы, и клетками, сверхэкспрессирующими ген *cadA*, а также исследовано влияние pH среды на процесс биоконверсии (рис. 2).

Максимальной скоростью биоконверсии лизина в кадаверин характеризовались клетки, сверхэкспрессирующие ген *cadA*, при культивировании на среде с pH 4.0. На второй час скорость биоконверсии в данных условиях составила 2.8±0.7 ммоль кадаверина/г АСБ в час, после чего наблюдалось снижение скорости процесса. В базовых условиях (pH среды 7.4, штамм без плазмиды) скорость биоконверсии равнялась 0.41±0.19 ммоль/г АСБ×ч, т.е. была почти в 7 раз меньше. Сверхэкспрессия гена *cadA* обеспе-

чивала более высокую продукцию кадаверина и при культивировании в нейтральной среде, но скорость продукции была ниже по сравнению с клетками, выращиваемыми при pH 4.0.

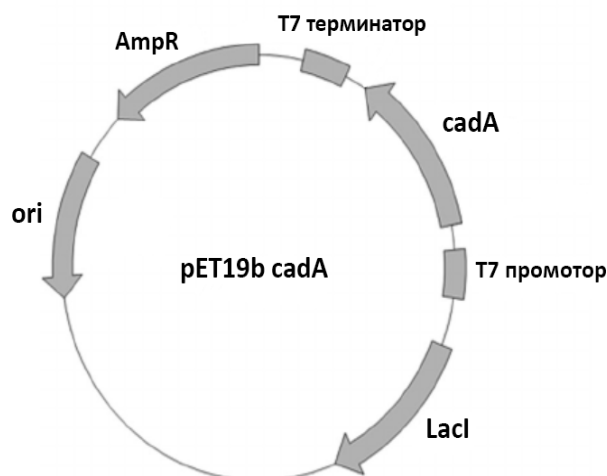


Рис. 1. Схема плазмиды pET19b\_cadA.

AmpR – ген, кодирующий β-лактамазу (резистентность к ампициллину); LacI – ген, кодирующий репрессор lac-оперона; ori – район начала репликации вектора

[Diagram of the pET19b\_cadA plasmid.

AmpR is a gene encoding β-lactamase (ampicillin resistance); LacI is a gene encoding a repressor of the lac operon; ori is the origin of replication]

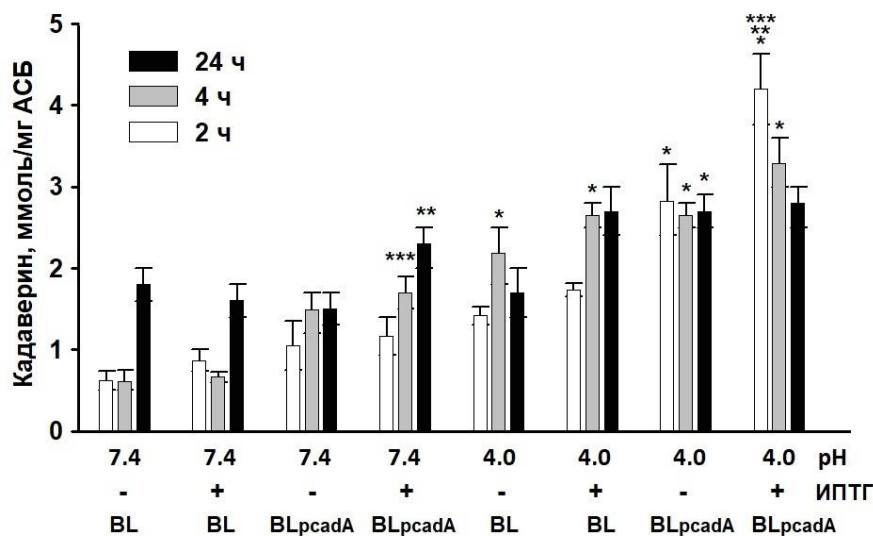


Рис. 2. Влияние pH среды и сверхэкспрессии гена *cadA* на продукцию кадаверина клетками *E. coli* BL21DE3.

«BL» – клетки, не несущие плазмиду pET19b\_cadA, «BLpcadA» – клетки, несущие плазмиду pET19b\_cadA.

«+» – добавка 1 мМ ИПТГ (индуктора сверхэкспрессии), «-» – без добавки ИПТГ.

\* – статистически значимое отличие от соответствующей культуры, выращиваемой на среде с pH 7.4;

\*\* – статистически значимое отличие от соответствующей культуры без добавки ИПТГ;

\*\*\* – статистически значимое отличие от культуры штамма, не несущего плазмиду, при культивировании в аналогичных условиях (t-тест,  $p \leq 0.05$ ,  $n \geq 3$ )

[The effect of the pH of the medium and overexpression of the *cadA* gene on the production of cadaverine by *E. coli* BL21 DE3 cells.

“BL” – cells that do not carry the pET19b\_cadA plasmid, “BLpcadA” – cells that carry the pET19b\_cadA plasmid.

“+” – the addition of 1 mM of IPTG (inducer of overexpression), “-” – without the addition of IPTG.

\* – statistically significant difference from the corresponding culture grown on a medium with a pH of 7.4;

\*\* – statistically significant difference from the corresponding culture without the addition of IPTG;

\*\*\* – statistically significant difference from the culture of a strain not carrying a plasmid when cultivated under similar conditions (t-test,  $p \leq 0.05$ ,  $n \geq 3$ )

Смещение pH среды в кислую сторону приводило к ускорению образования кадаверина как в условиях сверхэкспрессии, так и при базовой экспрессии гена *cadA* (в отсутствие плазмиды, без добавки ИПТГ). Увеличение лизиндекарбоксилазной активности в данном случае можно рассматривать как защитный ответ клетки на кислотный стресс, вызванный снижением pH среды [Meng, Bennett, 1992; Kanjee, Houry, 2013]. Кроме того, можно предположить, что повышение концентрации ионов водорода в среде сопровождалось смещением внутриклеточного pH в область, близкую к оптимальным значениям для лизиндекарбоксилазы CadA, что способствовало повышению скорости катализируемой ею реакции.

Можно также отметить тенденцию к увеличению продукции кадаверина клетками, несущими плазмиду сверхэкспрессии, при выращивании в среде с pH 4.0 без добавки индуктора ИПТГ, однако различия между трансформированными и не трансформированными плазмидой клетками не были статистически значимыми.

Установлено, что при всех вариантах условий культивирования конечная концентрация кадаверина в среде не превышала 2 мМ. При pH среды 7.4 и/или в условиях отсутствия сверхэкспрессии гена *cadA* итоговая концентрация кадаверина была в интервале 0.8–1 мМ. Сверхэкспрессия гена в нейтральной среде приводила к накоплению 1.2 мМ кадаверина, в кислой среде – к накоплению почти 1.8 мМ. Можно заключить, что данная концентрация является предельной для исследованного организма и лизиндекарбоксилазы CadA, выделенной из клеток *E. coli* MC4100. Прекращение процесса биоконверсии лизина в кадаверин, несмотря на достаточное количество субстрата в среде, может быть связано с ингибированием фермента по принципу обратной связи. Накопление кадаверина в среде до высоких концентраций оказывает в целом неблагоприятное воздействие на бактериальные клетки. Ранее показано, что добавка в среду культивирования 0.3–0.5 М гидрохлорида кадаверина вызывала частичный лизис клеток в культуре *E. coli* K12 [Qian, Xia, Lee, 2011]. Однако в процессе декарбоксилирования лизина с образованием кадаверина затрачивается ион водорода, а сам кадаверин, выделяющийся в среду, проявляет свойства основания. Это приводит к защелачиванию среды и смещению pH в область, неоптимальную для проявления активности фермента.

Таким образом, для повышения выхода целевого продукта, по-видимому, необходимо осуществлять культивирование штамма-продуцента в условиях поддержания оптимального значения pH и обеспечивать удаление конечного продукта реакции биоконверсии. Кроме того, решить данную проблему позволит поиск природных лизиндекарбоксилаз, толерантных к высокой концентрации конечного продукта, или получение таких ферментов методами белковой инженерии.

## Заключение

Сконструирован штамм *E. coli*, сверхэкспрессирующий ген *cadA*, выделенный из *E. coli* MC4100. Скорость биоконверсии лизина в кадаверин в условиях сверхэкспрессии была в 6.8 раза выше, чем в базовых условиях. Скорость процесса биоконверсии и конечная концентрация кадаверина были выше при постановке реакции при pH 4.0 по сравнению со средой с нейтральным pH. Дальнейшая работа будет направлена на повышение продуктивности процесса биоконверсии с применением полученного продуцента, что может быть осуществлено за счет подбора оптимальных условий протекания реакции декарбоксилирования, в частности, варьирования состава среды культивирования, начальной плотности культуры продуцента, стабилизации продуцента за счет иммобилизации.

## Список источников

1. Akhova A.V., Tkachenko A.G. Cadaverine biosynthesis in *Escherichia coli* adaptation to hydrogen peroxide // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. Vol. 58, № 5. P. 582–589. DOI: 10.1134/S0003683822050039.
2. Huang Y. et al. Green chemical and biological synthesis of cadaverine: recent development and challenges // RSC Advances. 2021. Vol. 11, № 39. P. 23922–23942. DOI: 10.1039/d1ra02764f.
3. Kanjee U., Houry W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli* // Annual Review of Microbiology. 2013. Vol. 67. P. 65–81. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155708.
4. Kim H.J. et al. Optimization of direct lysine decarboxylase biotransformation for cadaverine production with whole-cell biocatalysts at high lysine concentration // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015. Vol. 25, № 7. P. 1108–1113. DOI: 10.4014/jmb.1412.12052.
5. Kim H.T. et al. High-level conversion of l-lysine into cadaverine by *Escherichia coli* whole cell biocatalyst expressing *Hafnia alvei* l-lysine decarboxylase // Polymers (Basel). 2019. Vol. 11, № 7. P. 1184. DOI: 10.4014/jmb.1602.02030.
6. Kim J.H. et al. Functional study of lysine decarboxylases from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli* and application of whole cell bioconversion for cadaverine production // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016. Vol. 26, № 9. P. 1586–1592. DOI: 10.3390/polym11071184.

7. Kind S. et al. From zero to hero - production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum* // *Metabolic Engineering*. 2014. Vol. 25. P. 113–123. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.05.007.
8. Ma W. et al. Enhanced cadaverine production from L-lysine using recombinant *Escherichia coli* co-overexpressing CadA and CadB // *Biotechnology Letters*. 2015. Vol. 37, № 4. P. 799–806. DOI: 10.1007/s10529-014-1753-5.
9. Ma W. et al. Advances in cadaverine bacterial production and its applications // *Engineering*. 2017. Vol. 3, № 3. P. 308–317. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.012.
10. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.K. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982. 545 p.
11. Meng S.Y., Bennett G.N. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH // *Journal of Bacteriology*. 1992. Vol. 174, № 8. P. 2659–2669. DOI: 10.1128/jb.174.8.2659-2669.1992.
12. Nærdal I. et al. L-lysine production by *Bacillus methanolicus*: genome-based mutational analysis and l-lysine secretion engineering // *Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 244, P. 25–33. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.02.001.
13. Nishi et al., 2006. US7189543B2 patent.
14. Oh Y.H. et al. Development of engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts for high-level conversion of L-lysine into cadaverine // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 42, № 11. P. 1481–1491. DOI: 10.1007/s10295-015-1678-6.
15. Qian Z.G., Xia X.X., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine // *Biotechnology and Bioengineering*. 2011. Vol. 108, № 1. P. 93–103. DOI: 10.1002/bit.22918.
16. Shin J. et al. Characterization of a whole-cell biotransformation using a constitutive lysine decarboxylase from *Escherichia coli* for the high-level production of cadaverine from industrial grade l-lysine // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018. Vol. 185, № 4. P. 909–924. DOI: 10.1007/s12010-018-2696-4.
17. Ting W.W. et al. Whole-cell biocatalyst for cadaverine production using stable, constitutive and high expression of lysine decarboxylase in recombinant *Escherichia coli W3110* // *Enzyme and Microbial Technology*. 2021. Vol. 148. P. 109811. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109811.

## References

1. Akhova A.V., Tkachenko A.G. Cadaverine biosynthesis in *Escherichia coli* adaptation to hydrogen peroxide. *Applied Biochemistry and Microbiology*, V. 58, No. 5 (2022): pp. 582-589. DOI: 10.1134/S0003683822050039.
2. Huang Y., Ji X., Ma Z., Łężyk M., Xue Y., Zhao H. Green chemical and biological synthesis of cadaverine: recent development and challenges. *RSC Advances*. V. 11, No. 39 (2021): pp. 23922-23942. DOI: 10.1039/d1ra02764f.
3. Kanjee U., Houry W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*. V. 67 (2013): pp. 65-81. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155708.
4. Kim H.J., Kim Y.H., Shin J.H., Bhatia S.K., Sathiyarayanan G., Seo H.M., Choi K.Y., Yang Y.H., Park K. Optimization of direct lysine decarboxylase biotransformation for cadaverine production with whole-cell biocatalysts at high lysine concentration. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. V. 25, No. 7 (2015): pp. 1108-1113. DOI: 10.4014/jmb.1412.12052.
5. Kim H.T., Baritugo K.A., Oh Y.H., Kang K.H., Jung Y.J., Jang S., Song B.K., Kim I.K., Lee M.O., Hwang Y.T., Park K., Park S.J., Joo J.C. High-Level Conversion of l-lysine into cadaverine by *Escherichia coli* whole cell biocatalyst expressing *Hafnia alvei* l-lysine decarboxylase. *Polymers (Basel)*. V. 11, No. 7 (2019): p. 1184. DOI: 10.4014/jmb.1602.02030.
6. Kim J.H., Kim H.J., Kim Y.H., Jeon J.M., Song H.S., Kim J., No S.Y., Shin J.H., Choi K.Y., Park K.M., Yang Y.H. Functional study of lysine decarboxylases from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli* and application of whole cell bioconversion for cadaverine production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. V. 26, No. 9 (2016): pp. 1586-1592. DOI: 10.3390/polym11071184.
7. Kind S., Neubauer S., Becker J., Yamamoto M., Völkert M., Abendroth G., Zelder O., Wittmann C. From zero to hero - production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*. V. 25 (2014): pp. 113-123. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.05.007.
8. Ma W., Cao W., Zhang H., Chen K., Li Y., Ouyang P. Enhanced cadaverine production from L-lysine using recombinant *Escherichia coli* co-overexpressing CadA and CadB. *Biotechnology Letters*. V. 37, No. 4 (2015): pp. 799-806. DOI: 10.1007/s10529-014-1753-5.
9. Ma W., Chen K., Li Y., Hao N., Wang X., Ouyang P. Advances in cadaverine bacterial production and its applications. *Engineering*. V. 3, No. 3 (2017): pp. 308-317. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.012.

10. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.K. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982. 545 p.
11. Meng S.Y., Bennett G.N. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *Journal of Bacteriology*. V. 174, No. 8 (1992): pp. 2659-2669. DOI: 10.1128/jb.174.8.2659-2669.1992.
12. Nærdal I., Netzer R., Irla M., Krog A., Heggeset T.M.B., Wendisch V.F., Brautaset T. L-lysine production by *Bacillus methanolicus*: genome-based mutational analysis and l-lysine secretion engineering. *Journal of Biotechnology*. V. 244 (2017): pp. 25-33. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.02.001.
13. Nishi et al., 2006. US7189543B2 patent.
14. Oh Y.H., Kang K.H., Kwon M.J., Choi J.W., Joo J.C., Lee S.H., Yang Y.H., Song B.K., Kim I.K., Yoon K.H., Park K., Park S.J. Development of engineered *Escherichia coli* whole-cell biocatalysts for high-level conversion of L-lysine into cadaverine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. V. 42, No. 11 (2015): pp. 1481-1491. DOI: 10.1007/s10295-015-1678-6.
15. Qian Z.G., Xia X.X., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 108, No.1 (2011): pp. 93-103. DOI: 10.1002/bit.22918.
16. Shin J., Joo J.C., Lee E., Hyun S.M., Kim H.J., Park S.J., Yang Y.H., Park K. Characterization of a whole-cell biotransformation using a constitutive lysine decarboxylase from *Escherichia coli* for the high-level production of cadaverine from industrial grade l-lysine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 185, No. 4 (2018): pp. 909-924. DOI: 10.1007/s12010-018-2696-4.
17. Ting W.W., Huang C.Y., Wu P.Y., Huang S.F., Lin H.Y., Li S.F., Chang J.S., Ng I.S. Whole-cell biocatalyst for cadaverine production using stable, constitutive and high expression of lysine decarboxylase in recombinant *Escherichia coli W3110*. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 148 (2021): p. 109811. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109811.

Статья поступила в редакцию 11.12.2023; одобрена после рецензирования 27.12.2023; принята к публикации 05.03.2024.

The article was submitted 11.12.2023; approved after reviewing 27.12.2023; accepted for publication 05.03.2024.

#### Информация об авторах

А. В. Ахова – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, доцент кафедры Химия и биотехнология;

П. М. Федоненко – студент, кафедра Химия и биотехнология;

М. С. Шумков – канд. биол. наук, старший научный сотрудник Группы редактирования геномов микроорганизмов;

А. Г. Ткаченко – д-р мед. наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов.

#### Information about the authors

A. V. Akhova – Cand. Sci. (Biol), Researcher at the Laboratory of Microbial Adaptation, associate professor of the Department of Chemistry and Biotechnology;

P. M. Fedonenko – student, department of Chemistry and Biotechnology;

M. S. Shumkov – Cand. Sci. (Biol), senior researcher of Group of Microbial Genomes Editing;

A. G. Tkachenko – Doc. Sci. (Med), head of the Laboratory of Microbial Adaptation.

#### Вклад авторов:

Ахова А. В. – концепция и дизайн исследования, анализ результатов, написание текста статьи.

Федоненко П. М. – проведение экспериментов, анализ результатов, подготовка рукописи статьи.

Шумков М. С. – генно-инженерное конструирование, подготовка рукописи статьи.

Ткаченко А. Г. – научное руководство, подготовка рукописи статьи.

#### Contribution of the authors:

Akhova A. V. – research design, methodology development, writing of the manuscript.

Fedonenko P. M. – carrying out the experiments, manuscript editing.

Shumkov M. S. – genetic engineering, manuscript editing.

Tkachenko A. G. – scientific management, manuscript editing.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.