

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ L-МЕТИОНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ НА ОСНОВЕ *Escherichia coli* И *Corynebacterium glutamicum*. ЧАСТЬ 1. ПРИМЕНЕНИЕ, МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТИОНИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО БИОСИНТЕЗА У БАКТЕРИЙ

© 2023 г. В. А. Лившиц¹ *, Д. М. Бубнов¹, Т. Е. Шустикова¹, А. А. Хозов¹,
Т. Е. Леонова¹, Л. Е. Рябченко¹, Т. В. Выборная¹, А. А. Степанова¹, А. С. Яненко¹

¹НИИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: vlivshits40@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 13.10.2023 г.

Принята к публикации 14.10.2023 г.

В представленной первой части обзора рассматривается роль L-метионина в жизнедеятельности разных организмов и применение этой аминокислоты. Кратко представлены основные методы ее получения. Описываются пути биосинтеза L-метионина и его предшественников, а также их регуляция у промышленно-значимых видов бактерий *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. Излагаются современные сведения о поглощении и ассимиляционной редукции сульфата и тиосульфата как важнейших элементов метаболизма, ограничивающих возможность сверхсинтеза L-метионина. Упоминаются некоторые подходы, используемые при создании эффективных штаммов-продуцентов для получения L-метионина с помощью биотехнологических методов.

Ключевые слова: L-метионин, получение, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, путь биосинтеза, L-цистеин, сульфат, тиосульфат, ассимиляционная редукция

DOI: 10.56304/S0234275823040087

1. РОЛЬ L-МЕТИОНИНА В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

1.1. Роль метионина в жизнедеятельности разных организмов

L-метионин (2-амино-4-(метилтио)бутановая кислота, или α-амино-γ-метилтиомасляная кислота, C₅H₁₁NO₂S (далее – L-метионин и метионин) является одной из двух серосодержащих аминокис-

лот, входящих в состав белков всех организмов. Данная аминокислота является незаменимой для человека и сельскохозяйственных животных [1]. Как протеиногенная аминокислота, L-метионин играет важную роль в инициации трансляции мРНК, в сворачивании белка, в обеспечении его стабильности и функционирования [2].

Остатки метионина в белках являются сайтами для посттрансляционной модификации, в частности, путем их окисления. Окисление этой аминокислоты в настоящее время признано новым способом окислительно-восстановительной регуляции функции белка [3]. В частности, у высших животных обратимое окисление метионина в центральном регуляторном белке кальмодулине понижает энергетический метаболизм в ответ на окислительный стресс и тем самым обеспечивает клеточный гомеостаз в этих условиях [4].

В организме человека и животных метионин служит источником серы при биосинтезе цистеина, участвует в метаболизме глутатиона, а также наряду с цистеином и глутатионом является важным антиоксидантом. В нескольких белках метионин играет функциональную роль в качестве окис-

Список сокращений: APS – аденозин-5'-фосфосульфат; ATP – аденозинтрифосфат; CoA – коэнзим А; CH₂-THF – 5,10-метилентетрагидрофолат; FAD – флавинадениндинуклеотид; GSH – глутатион, восстановленная форма; GSSH – окисленная форма глутатиона (дисульфид глутантиона); K_m – константа Михаэлиса; NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид окисленный; NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; NADP⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; OAA – оксалоацетат; OAHs – O-ацетилгомосерин; OSHs – O-сукцинилгомосерин, PEP – фосфоенолпируват; PLP – пиридоксаль-5-фосфат; PPP – пентозофосфатный путь; SAM – S-аденозилметионин; SHMT – серингидроксиметилтрансфераза; TCA – цикл трикарбоновых кислот; THF – тетрагидрофолат; mM – миллимоль.

лительно-восстановительного сенсора [5, 6]. Он необходим для синтеза карнитина и мелатонина, а также обеспечивает биологическую доступность селена и цинка.

Метионин косвенно регулирует различные клеточные процессы как предшественник S-аденозилметионина (SAM), основного биологического донора CH_3 -группы в многочисленных реакциях метилирования. У человека и высших животных SAM участвует в синтезе ряда важных промежуточных продуктов, таких как липоевая кислота и полиамины (например, спермин, спермидин) и др. [7–9].

У растений субстраты SAM-зависимых метилтрансфераз (EC 2.1.1) участвуют как в первичном, так и во вторичном метаболизме. Примерами являются метилирование ДНК, РНК и белков, трансформация липидов, пектина, алкалоидов, фитостеролов, осмопротекторов, а также реакции, необходимые для синтеза хлорофилла, лигнинов и суберинов, в частности, флавоноидов, гидроксикоричных кислот, стильбенов и других ароматических и летучих ароматических соединений [10, 11].

Известно, что во многих растительных продуктах содержание метионина относительно низкое, и в белках основных продовольственных культур он присутствует в меньших количествах, чем в белках животных и человека. Из-за биохимической и питательной важности этой аминокислоты были предприняты значительные усилия для изучения факторов, регулирующих ее метаболизм и уровень в растениях, и определения возможных путей повышения ее содержания в ряде сельхозпродуктов. С этой целью получали трансгенные растения, синтезирующие белки с повышенным содержанием метионина, или накапливающие в клетках больше свободной аминокислоты [11]. Однако использование таких генетически модифицированных организмов (ГМО) для получения на их основе продуктов питания или кормов для животных в большинстве стран ограничено, или даже запрещено. Часто этот запрет научно никак не обосновывается.

У микроорганизмов метионин играет еще одну важную физиологическую роль — он участвует в синтезе сигнальных молекул-аутоиндукторов на основе N-ацетилглюкозамин-6-фосфата, которые действуют как регуляторы экспрессии генов и зависят от плотности клеток — кворума (quorum sensing) [12, 13].

В желудочно-кишечном тракте человека метионин поступающих с пищей белков — основной источник сероводорода (H_2S), который является токсичным и вместе с тем биологически активным газом. В частности, H_2S необходим для нормальной перистальтики кишечника [14]. С другой стороны, было обнаружено, что он может по-разному влиять на здоровье и продолжительность жизни [15].

Исследования последнего десятилетия показывают, что ограничение поступления в организм метионина может увеличить продолжительность жизни ряда млекопитающих (мышей, крыс), насекомых (*Drosophila melanogaster*) и дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). И хотя вопрос о том, можно ли обобщить это наблюдение является спорным, публикуются все новые работы, посвященные изучению этого явления [16].

1.2. Применение DL-метионина и L-метионина.

Метионин существует в форме двух изомеров, L- и D-метионина, из которых в природе преобладает L-форма. У человека и высших животных могут метаболизироваться обе формы, что важно при применении химически синтезируемого рацемата DL-метионина в качестве кормовой добавки в промышленном животноводстве. Основная часть произведенного химическим синтезом DL-метионина (это >1 300 000 тонн; при ежегодном приросте производства ~6%) используется для балансировки кормов в промышленном птицеводстве и свиноводстве, для подкормки дойных коров, а в последнее время и в рыбоводстве.

Содержащийся в рацемате D-метионин в результате двух ферментативных реакций, катализируемых оксидазой аминокислот (EC 1.4.3.3) и трансаминазой (EC 1.4.3.3), превращается в организме животных в L-метионин. Это происходит, в основном, в клетках печени и почек. Однако результаты ряда исследований показывают, что D- и L-формы по-разному метаболизуются *in vivo*, и что они выводятся из организма в разных пропорциях. Существует также разница в способности каждого из них выступать в качестве предшественника для синтеза белка в тканях, отличных от печени [17]. Согласно более поздним исследованиям, добавка L-метионина лучше влияла на окислительно-восстановительный статус и развитие слизистой кишечника цыплят по сравнению с DL-метионином. Цыплята, получавшие рацион с L-метионином, имели лучшие показатели роста, чем получавшие корм с DL-метионином [18]. У индюшат применение L-метионина, как правило, повышало усвоение корма, и более эффективно снижало окислительный стресс и увеличивало уровень глутатиона в печени по сравнению с использованием рацемата [19]. У кур-несушек, в корме которых присутствовал только L-метионин, гематологические показатели были лучше, чем у получавших DL-метионин [20]. Применение L-метионина для кормления цыплят-бройлеров в раннем возрасте является более эффективным, чем использование рацемата [21]. По-видимому, при конверсии D-метионина в L-форму клетки интенсивно растущего животного вынуждены отвлекать некоторые энергетические ресурсы для осуществления этого процесса.

L-метионин используется также в пищевой промышленности, где его применяют как ароматическую добавку и для улучшения качества пищи, а также при приготовлении продуктов детского и спортивного питания. Фармакологический препарат L-метионина оказывает липотропное действие, повышает синтез холина, лецитина и других фосфолипидов, в определенной степени способствует снижению содержания холестерина в крови и улучшению соотношения фосфолипиды/холестерин, уменьшению отложения нейтрального жира в печени и улучшению ее функционирования [22]. В связи с этим препараты, содержащие L-метионин, используются как в терапии заболеваний печени, так и для профилактики нарушений ее функции [23]. Метионин хелатирует тяжелые металлы, такие как свинец и ртуть, способствуя их выведению из организма. Как и целый ряд других L-аминокислот, он является компонентом смесей для парентерального питания, а также применяется для синтеза биологически активных пептидов.

В последние годы в ряде стран при выработке пищевых продуктов все шире применяется органическое (экологическое, биологическое) сельское хозяйство. Это метод осуществления сельскохозяйственного производства, один из провозглашаемых принципов которого — поддержание и улучшение здоровья людей, почвы, растений, животных, окружающей среды и планеты как единого и неделимого целого. В связи с этим происходит сознательная минимизация использования удобрений, пестицидов, регуляторов роста растений и кормовых добавок, полученных химическим синтезом. Следует отметить, что Министерство сельского хозяйства Российской Федерации приняло ряд мер по организации органического сельскохозяйственного производства в нашей стране, которые были в 2018 г. поддержаны соответствующим законом [24]. Можно критически относиться к ряду требований указанного подхода, но их существование привело к проблеме, связанной со снабжением метионином. Он считается первой лимитирующей аминокислотой в кормах для домашней птицы и третьей для поросят. [25]. Однако использование синтетического DL-метионина в органическом животноводстве запрещено. Учитывая все выше изложенное, промышленное получение L-метионина является сегодня актуальной задачей

2. КРАТКИЙ ОБЗОР МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ L-МЕТИОНИНА

2.1. Химический синтез DL-метионина

Химический синтез DL-метионина осуществляется в промышленности уже много десятилетий. С этой целью применяется многостадийный процесс, в котором используют получаемый из про-

пилена ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_3$) акролеин ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$), синильную кислоту (HCN) и метилмеркаптан (метантиол, CH_3SH), который можно производить из метанола (CH_3OH) и сероводорода (H_2S). Все эти соединения — очень токсичные вещества.

На первой стадии реакцией присоединения CH_3SH к акролеину синтезируют 3-метилтиопропионовый альдегид, который далее используется в качестве карбонильного компонента в реакциях Штреккера, предполагающих применение HCN и аммиака (NH_3) с последующим гидролизом образующегося аминонитрила [26]. В настоящее время обычно используют один из вариантов этих реакций — реакции Бюхерера-Бергса (Bucherer–Bergs reaction). При этом метилтиопропионовый альдегид, полученный из акролеина и CH_3SH , взаимодействует с HCN , NH_3 и углекислым газом (CO_2) с образованием 5-(2-метилмеркаптоэтил) гидантоина (метионин гидантоина), который гидролизуетея щелочью с образованием метионата натрия (или калия). Далее, после нейтрализации кислотой высвобождается DL-метионин. Существуют различные варианты синтеза DL-метионина, направленные на уменьшение стоимости производства продукта за счет обеспечения непрерывности процесса, сокращения времени, оптимизации заключительных этапов и облегчения удаления отходов [27–29].

В России единственным производителем синтетического DL-метионина является завод АО “Волжский оргсинтез”, (www.zos-v.ru/en), расположенный в г. Волжский Волгоградской области (мощность — 25 000 т в год). Значительная часть произведенного там продукта ранее экспортировалась. С другой стороны, в 2020 г импорт кормового метионина в Россию составил 37,88 тыс. т. В плане импортозамещения в 2018 г. РНЦ “Прикладная химия” (Санкт-Петербург) по заказу ООО “ОНХ-Холдинг” разработал усовершенствованную схему производства метионина с мощностью достаточной, как утверждается, для импортозамещения продукта на российском рынке [30]. Исходными субстратами по этой схеме являются пропилен — продукт крекинга нефти, метанол, получаемый из природного газа и сероводород. В связи с этим следует упомянуть, что Россия располагает большими запасами не только нефти и газа, но и уникальными месторождениями меркаптансодержащего сырья в Прикаспийском регионе. Основными продуктами переработки сероводорода на газоперерабатывающих заводах сегодня являются газовая сера и серная кислота — недорогие продукты, предложение которых на рынке превышает спрос. Учитывая высокую прибыль от производства метионина, высказывается и обосновывается мнение о необходимости развивать технологии синтеза метионина из доступных серо- и азотсодержащих веществ, а также об организации круп-

ного промышленного производства метионина на юге России [31].

Можно упомянуть, что летом 2022 г. появилось сообщение о том, что научный центр “Ростеха” при финансовой поддержке “Газпрома” построит в Петербурге производственную площадку по выпуску метионина с использованием разработки РНЦ “Прикладная химия” [32]. В случае создания достаточно эффективного биотехнологического метода получения L-метионина, прямого, или двухступенчатого (см. ниже), предполагающих биосинтез на основе сульфгидрирования с использованием метилмеркаптана (MeSH) или диметилдисульфида (ДМДС), на таком производстве можно будет получать и L-метионин.

2.2. Получение L-метионина с помощью энзиматической трансформации химически синтезированного DL-метионин и предшественников

Как было отмечено, для фармацевтических и медицинских применений требуется оптически чистый L-метионин. В связи с этим было разработано несколько методов ферментативного превращения DL-рацемата и D-метионина в чистый изомер L-метионина. Некоторые из этих методов были рассмотрены в обзоре Willke [33].

Наиболее известным и используемым в промышленности процессом является энзиматическое превращение DL-метионина после ацетилирования в N-ацетил-DL-метионин. Только L-изомер в этой смеси затем преобразуется L-аминоацилазой (EC 3.5.1.14) в L-метионин, который отделяется, например, спиртовой экстракцией или кристаллизацией и очищается с помощью ионной хроматографии. Биотрансформация проводится в мембранном реакторе, обеспечивающем сохранение активного фермента в непрерывном ферментативном процессе. Используются также методы иммобилизации целых клеток продуцента фермента (*Pseudomonas* sp., *Aspergillus oryzae*), в частности, в желатиновых шариках, где период его полураспада продлевается до 70 дней [34]. Остаточный нетрансформированным D-N-ацетилметионин подвергается рацемизации уксусным ангидридом и рециркуляции [35]. Это производство, которое осуществляется в основном компанией Rexim® в Нанкине (Китай) и компанией Evonik [33] позволяет получать L-метионин фармацевтического класса в количестве нескольких сотен тонн в год.

Был также предложен процесс, в котором для получения чистой L-формы используются оба стереоизомера [36, 37]. Он включает микробиологическое превращение DL-рацемата рекомбинантным штаммом *Escherichia coli*, который синтезирует два фермента: D-оксидазу аминокислот (D-AAO) и лейциндегидрогеназу (LeuDH, дегидрогеназный

комплекс разветвленных α -кетокислот, субъединица E1 EC 1.2.4.4, субъединица E2 EC 2.3.1.168, субъединица E3 EC 1.8.1.4). Дезаминирование D-метионина приводит к образованию нехиральной кето-группы. Затем аминокетогруппа восстанавливается с помощью LeuDH, что приводит к получению только L-формы. Кроме указанных ферментов необходимо присутствие в реакционной смеси каталазы (EC 1.11.1.6) и фермента, восстанавливающего NAD^+ . Для повышения эффективности процесса гены, кодирующие соответствующие ферменты из разных организмов, амплифицировали на плазмидах. Содержащие эти плазмиды клетки штаммов *E. coli*, после получения их биомассы, обрабатывали, чтобы сделать их проницаемыми для субстратов и продуктов [36].

В другой работе для прямого превращения D-метионина в L-метионин применяли каскадную систему биотрансформации, состоящую из четырех ферментов. Оксидоза D-аминокислот (D-AAO) (EC 1.4.3.3) из *Arthrobacter protophormiae* использовалась для полного превращения D-метионина в 2-оксо-4-метилтиомасляную кислоту. Для предотвращения ее декарбоксилирования добавляли каталазу. На второй стадии с помощью L-фенилаланиндегидрогеназы (L-PheDH) (EC 1.4.1.20) из *Rhodococcus* sp. превращали 2-оксо-4-метилтиомасляную кислоту в L-метионин, а для регенерации NADH добавляли формидегидрогеназу (FDH) (EC 1.2.1.2) из *Candida boidinii* [37].

Еще одним подходом к получению чистого L-метионина является ферментативное превращение его химически синтезированных предшественников. С этой целью используют продуцируемые некоторыми микроорганизмами гидантоиназы (EC 3.5.2.2) [38]. Эти ферменты катализируют обратимое гидролитическое расщепление гидантоина или 5'-монозамещенных гидантоинов [39]. В конце 1990 гг на фирме Degussa (Германия) пытались генетически оптимизировать гидантоиназы путем направленной эволюции для дальнейшего их использования в процессе получения оптически чистого L-метионина из его предшественника D-5-(2-метилтиоэтил) гидантоина [40]. Этот процесс в настоящее время применяется французской дочерней компанией Evonik Degussa, Rexim, на заводе в Вуминге (Китай), где выпускается до 500 т/г L-метионина для пищевой промышленности [33].

Поскольку предшественники метионина синтезируются химическим путем, то у данного метода нет никакого реального преимущества перед процессами, упомянутыми ранее, которые основаны на использовании продуктов, получаемых из нефти, и с использованием агрессивных и токсичных соединений.

2.3. Получение L-метионина путем ферментации штаммов-продуцентов

Получение L-метионина на основе естественно-го процесса его биосинтеза с помощью культивирования (ферментации) соответствующих штаммов-продуцентов на основе *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli*, как это делается для получения лизина, треонина и других аминокислот, могло бы решить многие проблемы. Основным препятствием является очень сложный по сравнению с другими аминокислотами биосинтез метионина в клетках этих бактерий, в котором задействованы многочисленные регуляторные механизмы подавления по типу обратной связи, а также большие затраты метаболической энергии и NADPH [33, 41, 42]. Дополнительные энергозатраты в процессе биосинтеза данной аминокислоты связаны в первую очередь с необходимостью включения в ее молекулу атома серы, поступающей в клетки продуцентов с помощью АТФ (АТР)-зависимого транспорта в виде неорганического сульфата. Сульфат должен быть восстановлен до сульфида, который является донором серы в реакции сульфгидрирования в пути синтеза метионина у многих микроорганизмов, или преобразован в цистеин, который в свою очередь является донором серы в альтернативной реакции транссульфурации в пути синтеза метионина. При этом максимальный теоретический выход метионина из глюкозы существенно меньше, чем многих других аминокислот и составляет 52% для *E. coli* и 49% для *C. glutamicum* [42].

Многие из указанных проблем могут решаться с помощью современных методов системной метаболической инженерии. Для этого получают соответствующие регуляторные мутации, модифицируют процессы транспорта метионина в клетки и из клеток, усиливают синтез всех предшественников и доноров метильной (CH_3 - или C-1-) группы, используют вместо сульфата другие источники серы. В результате были сконструированы штаммы-продуценты, на основе которых разработаны защищенные многочисленными патентами процессы получения L-метионина с помощью ферментации. Заметных успехов достигли исследователи фирмы Metabolic Explorer (METEX, Франция), которая прилагала большие усилия для запуска коммерческой ферментационной установки с целью получения L-метионина на основе штамма-продуцента *E. coli*. Однако некоторые технические вопросы так и не были решены. В декабре 2016 г. было опубликовано сообщение, что технологию производства метионина с помощью продуцента *E. coli* приобрела у METEX компания Evonik (Германия) [43]. Но пока информация о прямом синтезе метионина с помощью ферментации штамма-продуцента так и не появилась.

У многих бактерий существует путь синтеза метионина, предполагающий сульфгидрирование активированного L-гомосерина, т.е. его эфиров O-сукцинилгомосерина (OSHS) и O-ацетилгомосерина (OAHs) в гомоцистеин или даже непосредственно в метионин за счет, соответственно, H_2S , который содержит восстановленную серу, или CH_3SH , в котором одновременно присутствуют и восстановленная сера, и метильная группа. Прямая ферментация продуцента метионина с использованием таких источников серы могла бы оказаться перспективной, поскольку существенно повысила бы выход метионина из глюкозы и снизила энергозатраты клетки. Однако основным препятствием является высокая токсичность H_2S и CH_3SH для бактерий. Чтобы ее обойти, предлагается использовать менее токсичные их производные в сочетании с техническими подходами. В частности, менее токсичный диметдисульфид (DMDS, $\text{CH}_3\text{S-SCH}_3$) (он довольно легко преобразуется в CH_3SH), сначала адсорбируют на носителе, полистироловой смоле Amberlite™ XAD4, из которой он медленно высвобождаются в процессе культивирования продуцентов [44]. Однако нельзя утверждать, что эта проблема уже решена, или ее можно будет просто решить технически, обеспечивая конкурентоспособный процесс. Поэтому сегодня большое внимание сосредоточено на комбинированном методе производства L-метионина из его предшественников OSHS или OAHs, получаемых ферментацией.

2.4. Комбинированный метод получения L-метионина из предшественников

Этот метод предполагает биотехнологическое получение L-метионина в два этапа. Сначала с помощью ферментации эффективных продуцентов на основе *E. coli* или *C. glutamicum* получают естественные предшественники L-метионина — OSHS или OAHs. При конструировании таких продуцентов не нужно обеспечивать поступление и восстановление источников серы, формирование и включение C-1-компонента. Соответственно, на синтез этих предшественников тратится гораздо меньше АТФ и NADPH, а потому выход целевого продукта может быть достаточно высоким.

На втором этапе используют другие штаммы, способные к сверхсинтезу ферментов сульфгидриаз — O-ацетилгомосерин сульфгидриазы (MetY) (EC:2.5.1.49) или O-сукцинилгомосерин сульфгидриазы (MetZ). С помощью этих ферментов проводят трансформацию полученных OAHs или OSHS в метионин с применением восстановленных источников серы, также содержащих метильную группу — CH_3SH или $\text{CH}_3\text{S-SCH}_3$. При этом токсичность этих соединений уже не важна, так как в реакции не участвуют живые бактерии,

а только их клетки, обработанные тем или иным методом, обеспечивающим доступ субстратов к указанному ферменту. Недостатком этого процесса является образование значительного количества побочных продуктов — ацетата или сукцината.

При использовании такого метода теоретический выход ОАHS составляет 80.3%, а его трансформации — 92.5%, т.е. теоретический выход метионина составит — 74.3%. В случае OSHS выход OSHS — 81.2%, трансформации — 68%, а выход метионина — 55.2% [45].

Этот подход активно разрабатывала компания ЧейлДжеданг (CJ, Южная Корея). Были сконструированы штаммы *E. coli*, способные эффективно продуцировать предшественники метионина OSHS и ОАHS, которые под воздействием, соответственно, ферментов О-сукцинилгомосерин сульфгидрилазы и О-ацетилгомосерин сульфгидрилазы, превращались в метионин с сопутствующим образованием сукцината или ацетата [45]. Патент Arkema-CJ от 2013 г защищает ферментативное превращение в метионин его предшественника ОАHS в результате взаимодействия с газообразным CH_3SH [46]. В 2014 г. компании CJ и Arkema построили в Кертехе (Малайзия) завод, который начал производство L-метионина, основанное на описанном в этом патенте процессе. Первоначальная мощность завода 80000 т. чистого L-метионина в год. В 2019 г. проведено дальнейшее расширение производства [47, 48].

3. ПУТИ БИОСИНТЕЗА L-МЕТИОНИНА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

3.1. Биосинтез метионина и его регуляция у *Escherichia coli*

Современные подходы к созданию штаммов-продуцентов аминокислот предполагают использование методов системной и синтетической метаболической инженерии, основанных на данных о путях метаболизма в клетках бактерий и их регуляции, структуре и функции соответствующих ферментов [49]. Основные гены, кодируемые ими ферменты и соответствующие реакции биосинтеза метионина у бактерий, хорошо изучены и описаны как в экспериментальных статьях, так и в обзорах. Тем не менее, целесообразно вкратце здесь их рассмотреть.

Путь биосинтеза метионина, как и других аминокислот, начинается с утилизации источника углерода и энергии, в качестве которого обычно выступает глюкоза. Происходят последовательные реакции, обеспечивающие поступление ее в клетки с помощью фосфотрансферазной системы (PTS) и превращения в процессе гликолиза (пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, ЕМР), в пентозофосфатном пути (PPP) и в цикле трикарбоновых кислот (ТСА) где, в частности, синтезируется щавелевоуксус-

ная кислота (оксалоацетат, ОАА). В результате восстановления аминирования ОАА с использованием глутамата в качестве донора аминогруппы, образуется аспарагиновая кислота (аспартат). Эту реакцию катализирует аспартатаминотрансфераза (ЕС 2.6.1.1), которую у *E. coli* кодирует ген *aspC*. Клетки способны несколькими способами регенерировать глутамат. В условиях избытка аммония эту реакцию выполняет использующая NADPH глутаматдегидрогеназа (Gdh) (ЕС 1.4.1.3), кодируемая геном *gdhA* [50].

ОАА является предшественником для биосинтеза всех аминокислот семейства аспартата, к которому принадлежат треонин, лизин и метионин; некоторые авторы причисляют к этому семейству и изолейцин, предшественником которого является треонин [33, 51]. В связи с этим следует отметить, что модификации, направляющие поток углерода в аспартат, являются общим подходом для повышения продукции этих аминокислот. К ним относятся повышение уровня активности фермента пируваткарбоксилазы (ЕС 1.2.4.1) (ген *pyc*) и фосфоенолпируваткарбоксилазы (ЕС 4.1.1.31) (ген *ppc*), усиливающее превращение пирувата и фосфоенолпирувата в ОАА, а также ослабление пируваткиназы (ЕС 2.7.1.40) (гены *pykA* и *pykF*), снижающее превращение фосфоенолпирувата (PEP) по пути гликолиза и направляющее его в ОАА. При этом может оказаться необходимым дополнительное увеличение активности аспартатаминотрансферазы и глутаматдегидрогеназы.

Путь биосинтеза метионина из аспартата состоит из нескольких этапов. На первом этапе аспартат фосфорилируется с образованием аспартил-4-фосфата. У *E. coli* имеется три изофермента, осуществляющих эту реакцию, АКI, АКII и АКIII, которые кодируются, соответственно, генами *thrA*, *metL* и *lysC*. При этом АКI и АКII являются бифункциональными изоферментами — оба обладают активностью аспартаткиназы (ЕС 2.7.2.4) и гомосериндегидрогеназы (ЕС 1.1.1.3). Далее, аспартил-4-фосфат под воздействием дегидрогеназы аспартатполуальдегида (ЕС 1.2.1.11) (ген *asd*) и гомосериндегидрогеназы (гены *thrA*, *metL*) (ЕС 1.1.1.3) восстанавливается в гомосерин — общий предшественник для треонина, изолейцина и метионина [51].

Первой реакцией биосинтеза непосредственно самого метионина является активация гомосерина. Гомосерин-О-сукцинилтрансфераза (ЕС 2.3.1.46) (ген *metA*) переносит сукцинильную группу от сукцинил-СoА на гомосерин, в результате чего образуется L-О-сукцинил-гомосерин (OSHS). Затем пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимая цистатионин-γ-синтаза MetB (ЕС 2.5.1.48) (ген *metB*) катализирует превращение О-сукцинилгомосерина и цистеина в цистатионин и сукцинат. На следующем этапе, в результате отщепления пиру-

вата от цистатинина синтезируется гомоцистеин; данную реакцию катализирует цистатинин-β-лиаза (ЕС 4.4.1.1) (ген *metC*). Гены *metB* и *metC* являются гомологами. Этот единственный у *E. coli* путь включения атома серы в молекулу метионина с использованием цистеина и есть транссульфурация [51]. Следует отметить, что пути биосинтеза этой аминокислоты у разных бактерий могут различаться [52].

Путь биосинтеза метионина из аспартата и реакции, обеспечивающие образование аспартата в клетках помимо ТСА у *E. coli* и *C. glutamicum* показаны на рис. 1.

Интересно отметить, что у *E. coli* K-12 были получены супрессорные мутации, которые позволяют синтезировать гомоцистеин в отсутствие продукта *metC*. Образование гомоцистеина в мутантных штаммах требовало цистатинин-γ-синтетазы, но, по мнению авторов, обходилось без нормального промежуточного соединения цистатинина. При этом экспрессия гена-супрессора была подержана катаболитной репрессии. Авторы сделали вывод, что цистатинин-γ-синтетаза может катализировать образование гомоцистеина непосредственно из о-сукцинилгомосерина и пока еще не идентифицированного донора серы [53]. Предполагалось, что им является H₂S, который действительно образуется в клетках этих бактерий (см. ниже). Однако существует другое, более обоснованное объяснение этому феномену. Оказалось, что ген *malY*, экспрессия которого приводит к репрессии всех генов мальтозного регулона, способен устранять потребность мутантов *metC* в метионине. Таким образом, расщепление цистатинина до гомоцистеина, аммиака и пирувата, которое обеспечивает MetC, может эффективно катализировать и репрессор MalY, который оказался одновременно и PLP-зависимым ферментом [54]. При этом ген *malY*, очевидно, не реагирует на обычные регуляторы генов биосинтеза метионина.

Последней стадией биосинтеза метионина является перенос метильной группы CH₃- на гомоцистеин. Донорами метильной группы могут выступать 5-метилтетрагидрофолат или 5-метилтетрагидроптероил-три-L-глутамат, а соответствующую реакцию катализирует PLP-зависимая метионинсинтаза (ЕС 2.1.1.13) (ген *metE*) или кобаламин-зависимая метионинсинтаза (ЕС 2.1.1.14) (ген *metH*), соответственно [51, 55]. MetH может функционировать только в присутствии экзогенного кобаламина (витамина B12), а в его отсутствие функционирует метионинсинтаза MetE.

Важно отметить, что активность MetH в 50 раз выше активности MetE, что компенсируется высоким уровнем экспрессии гена *metE* и большим количеством этого фермента в клетках [55]. Синтез MetE является для клеток обременительным и

не целесообразен в продуцентах, которые культивируют в средах с добавлением витамина B12.

Как уже отмечалось, метионин включается в молекулы белка и играет важную роль в инициации трансляции мРНК. Кроме того, эта аминокислота может конвертироваться в SAM в реакции, катализируемой S-аденозилметионинсинтазой (ЕС 2.5.1.6) (ген *metK*) [51]. Данная реакция выводит метионин из клеточного пула и обеспечивает синтез корепрессора (см. ниже). Поэтому у штаммов-продуцентов активность MetK должна быть снижена.

Биосинтез метионина в клетках бактерий регулируется на уровне активности ферментов и транскрипции соответствующих генов [51, 55, 56]. У *E. coli* активность AKI и AKIII ингибируется по типу обратной связи, соответственно, L-треонином и L-лизинном. Активность MetA синергически ингибируется своими конечными продуктами — метионином и S-аденозилметионином; при этом в присутствии 1 мМ метионина или SAM ее активность снижается до 4% или 13%, соответственно [57]. Было обнаружено, что мутации в ферменте MetA *E. coli*, затрагивающие Arg27, Ile296, и Pro298, в значительной степени уменьшают ретроингибирование [58]. В дальнейшем были обнаружены дополнительные аминокислотные остатки в MetA, замены которых также снимают подавление конечными продуктами.

Гены, участвующие в биосинтезе метионина у *E. coli*, разбросаны по всей хромосоме и образуют “*met*-регулон”. Экспрессия генов этого регулона контролируется репрессором MetJ и корепрессором SAM [59, 60]. MetJ совместно с SAM подавляет экспрессию генов *metL*, *metA*, *metB*, *metE*, *metF*, *metH*. Комплекс SAM-MetJ связывается со своими операторными сайтами, которые имеют общую структуру tandemных повторов двух или более MET-боксов с консенсусной последовательностью 5'-AGACGTCT-3'. Совместно с метионином MetJ репрессируют и экспрессию *metC* [51, 55].

Кроме того, экспрессия генов, участвующих в выработке метионина таких, как *metE*, *metH*, *metF* и *glyA*, контролируется регулятором MetR, который является активатором транскрипции этих генов, но подавляет транскрипцию *metA* [61, 62]. При этом гомоцистеин усиливает активирующее действие MetR на экспрессию *metE*. Наконец, известно, что витамин B12 может подавлять экспрессию гена *metE*. Этот эффект опосредован холоферментом MetH, который содержит кобаламидную простетическую группу (51, 55).

3.2. Биосинтез метионина и его регуляция у *Corynebacterium glutamicum*

У *C. glutamicum* реакции, в которых ОАА превращается в гомосерин, являются идентичными с

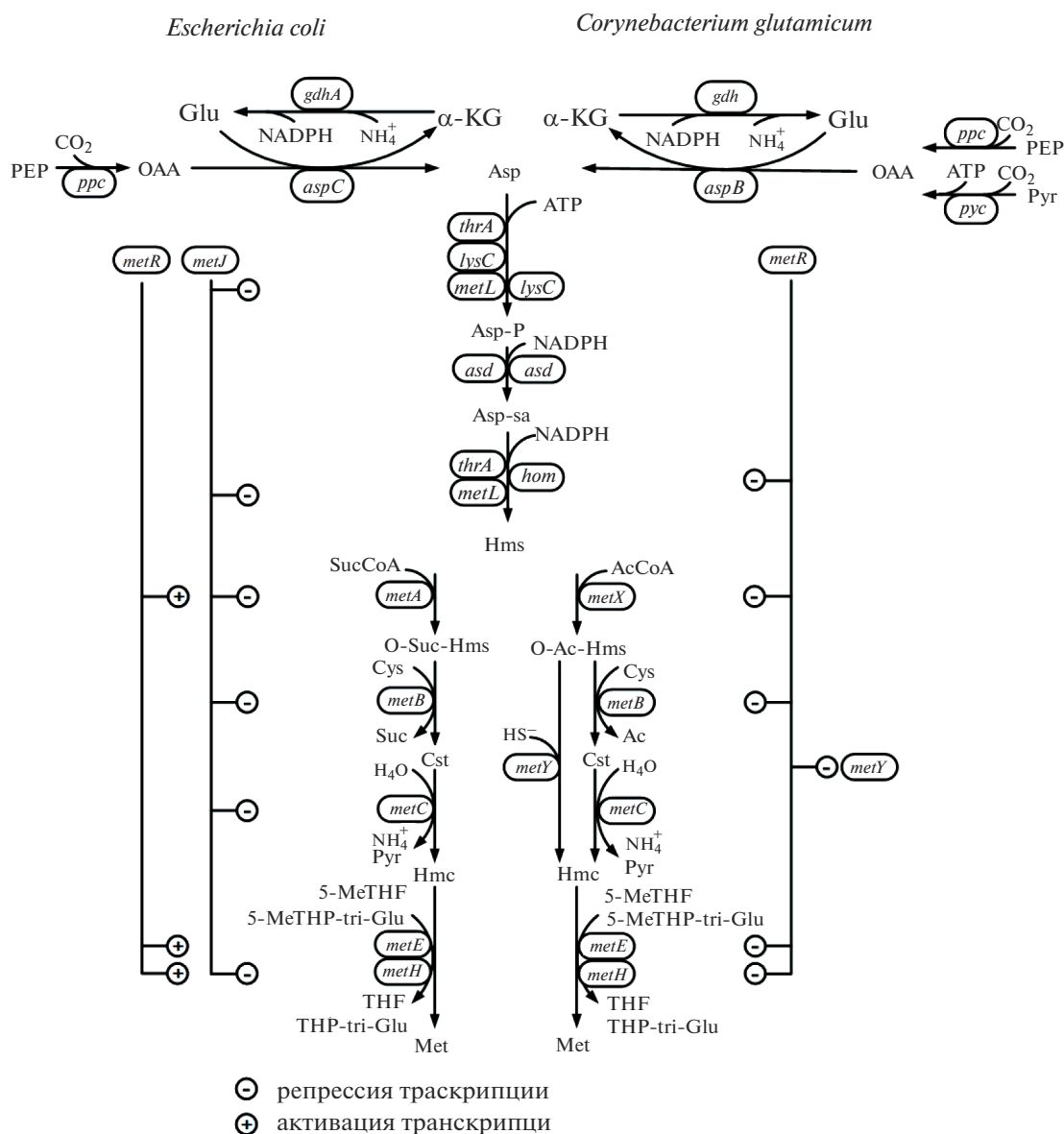


Рис. 1. Схема реакций биосинтеза L-метионина в клетках *E. coli* и *C. glutamicum*. Вместо названий ферментов используются названия соответствующих генов (см. текст). PEP – фосфоенолпируват; OAA – оксалоацетат, Pyr – пируват; Glu – глутамат; α-KG – α-кетоглутарат; 5-MeTHF – 5-метилтетрагидрофолат; THF – тетрагидрофолат; 5-MeTHP-tri-Glu – 5-метилтетрагидроптероилтриглутамат; THP-tri-Glu – тетрагидроптероилтриглутамат; NADPH – никотинамиденидинуклеотидфосфат; ATP – аденозинтрифосфат; AcCoA – ацетилкофермент А; SucCoA – сукцинилкофермент А; Ac – ацетат; Suc – сукцинат; Asp – аспарат; Asp-P – аспартилфосфат; Asp-sa – аспаратполу-альдегид; Hms – гомосерин; Hms-P – гомосеринфосфат; O-Ac-Hms – O-ацетилгомосерин; O-Suc-Hms – O-сукцинилгомосерин; Cst – цистатионин; Hmc – гомоцистеин; Met – метионин.

Fig. 1. Scheme of L-methionine biosynthesis reactions in *E. coli* and *C. glutamicum* cells. Instead of enzyme names, the names of the corresponding genes are used (see the text). PEP – phosphoenolpyruvate; OAA – oxaloacetate, Pyr – pyruvate; Glu – glutamate; α-KG – α-ketoglutarate; 5-MeTHF – 5-methyltetrahydrofolate; THF – tetrahydrofolate; 5-MeTHP-tri-Glu – 5-methyltetrahydropteroyltri-glutamate; THP-tri-Glu – tetrahydropteroyltri-glutamate; NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ATP – adenosine triphosphate; AcCoA – acetyl coenzyme A; SucCoA – succinyl coenzyme A; Ac – acetate; Suc – succinate; Asp – aspartate; Asp-P – aspartyl phosphate; Asp-sa – aspartate semialdehyde; Hms – homoserine; Hms-P – homoserine phosphate; O-Ac-Hms – O-acetylhomoserine; O-Suc-Hms – O-succinylhomoserine; Cst – cystathionine; Hmc – homocysteine; Met – methionine.

E. coli, с тем лишь отличием, что аспаратамино-трансферазу кодирует ген, названный *aspB*, а фосфорилирование аспартата катализирует монофункциональная аспараткиназа LysC (ген *lysC*); другое обозначение — Ask (ген *ask*). На последней общей стадии биосинтеза, восстановление аспарат-полуальдегида до гомосерина катализирует единственная гомосериндегидрогеназа Hom (EC 1.1.1.3), кодируемая геном *hom* [51]. Для активации гомосерина *C. glutamicum* использует ацетил-КоА с участием гомосерин-О-ацетилтрансферазы (EC 2.3.1.31), (ген *metX*), в результате чего образуется ОАHS [63] (рис. 2). Следует отметить, что гомосерин-О-ацетилтрансфераза *C. glutamicum* не гомологична MetA (см. ниже).

В отличие от *E. coli*, *C. glutamicum*, может включать серу как путем транссульфурации, так и путем сульфгидрирования [64–66]. Реакции транссульфурации, как и у *E. coli* катализируют цистатионин γ -синтаза (ген *metB*) и цистатионин- β -лиаза (ген *metC* или *aecD*) [64, 67, 68]. Цистатионин γ -синтаза MetB *C. glutamicum* на 41% идентична своему ортологу из *E. coli* и предпочтительно принимает ацетилированный гомосерин [67]. Перенос метильной группы на образующийся гомоцистеин осуществляется так же, как у *E. coli*, двумя формами метионин-синтазы, кодируемыми генами *metE* и *metH*. На основе метионина синтезируется SAM, и эту реакцию катализирует S-аденозилметионинсинтаза (ген *metK*) [64]. Как уже отмечалось, эта реакция выводит метионин из клеточного пула и у продуцентов должна быть ослаблена.

Прямое сульфгидрирование О-ацетилгомосерина в гомоцистеин осуществляется с использованием неорганического источника серы, H_2S , восстановленного из сульфатов, ассимилированных клеткой. (В действительности в реакции участвует HS^- или S^{2-}). Данную реакцию у *C. glutamicum* катализирует О-ацетил-гомосеринсульфгидрилаза, в настоящее время относящаяся к трансферазам (EC 2.5.1.49), кодируемая геном *metY* [64–66]. Этот фермент функционально гомологичен О-ацетилсерин сульфгидрилазам, обеспечивающим биосинтез цистеина, и требует PLP в качестве кофактора (см. ниже).

Генетические и биохимические данные свидетельствуют о том, что *C. glutamicum* использует как путь транссульфурации, так и путь сульфгидрирования почти с одинаковой эффективностью. Из-за наличия этих параллельных путей биосинтеза метионина, одиночная делеция каждого из генов *metB*, *metC* или *metY* не приводит к ауксотрофности. Однако при одновременном удалении двух генов, *metB* и *metY*, или *metC* (*aecD*) и *metY*, клетки становятся ауксотрофными по метионину [65–68]. Следует указать, что гены, участвующие в биосинтезе метионина у *C. glutamicum*, также разбросаны по ее хромосоме [64].

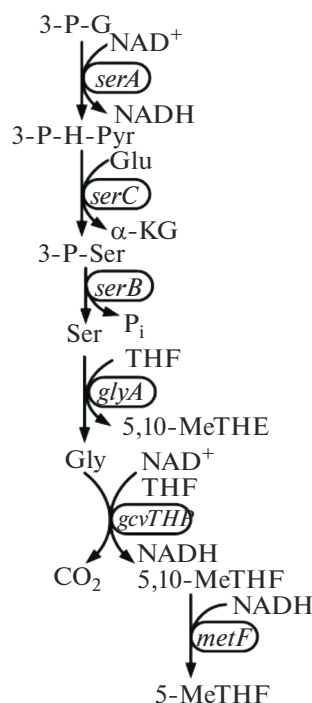


Рис. 2. Схема реакций биосинтеза L-серина, L-глицина и 5-метилтетрагидрофолата в клетках *E. coli*. Вместо названий ферментов используются названия соответствующих генов (см. текст). 3-P-G — 3-фосфоглицерат; 3-P-H-Pyr — 3-фосфогидроксипироват; Glu — глутамат; α -KG — α -кетоглутарат; 3-P-Ser — 3-фосфосерин; Ser — серин; Gly — глицин; NADH — никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; NAD^+ — никотинамидадениндинуклеотид окисленный; P_i — фосфат; 5,10-MeTHF — 5,10-метилентетрагидрофолат; 5-MeTHF — 5-метилтетрагидрофолат; THF — тетрагидрофолат.

Fig. 2. Scheme of biosynthesis reactions of L-serine, L-glycine and 5-methyltetrahydrofolate in *E. coli* cells. Instead of enzyme names, the names of the corresponding genes are used (see the text). 3-P-G — 3-phosphoglycerate; 3-P-H-Pyr — 3-phosphohydroxypyruvate; Glu — glutamate; α -KG — α -ketoglutarate; 3-P-Ser — 3-phosphoserine; Ser — serine; Gly — glycine; NADH — nicotinamide adenine dinucleotide reduced; NAD^+ — nicotinamide adenine dinucleotide oxidized; P_i — phosphate; 5,10-MeTHF — 5,10-methylenetetrahydrofolate; 5-MeTHF — 5-methyltetrahydrofolate; THF — tetrahydrofolate.

Первый фермент общего пути биосинтеза аминокислот семейства аспартата, аспараткиназа (LysC или Ask), согласованно подавляется лизином и треонином [69]. Как отмечено выше, у *C. glutamicum* имеется единственная гомосериндегидрогеназа Hom, активность которой регулируется по механизму обратной связи (ретроингибированием) и подавляется одним из конечных продуктов — треонином, а синтез репрессируется при участии репрессора McbR (см. ниже). Были получены мутации, нарушающие ретроингибирование, одна из которых связана с заменой в ферменте глицина-378 на глутамат (Hom^{G378E}) [70].

Изучение регуляции биосинтеза метионина у *C. glutamicum* на уровне активности катализирующих его ферментов показало, что *in vitro* активность цистатионин γ -синтазы MetB полностью подавлялась только при добавлении 10 mM цистатионина и была не чувствительна к метионину и SAM, тогда как при добавлении 10 mM метионина или цистотионина остаточная активность о-ацетил-гомосеринсульфгидриказы MetY подавлялась на 50% от исходного уровня [71]. Репрессия метионином синтеза ряда ферментов неоднократно наблюдалась разными авторами [76–78]. Так, при добавлении 10 mM метионина в минимальную ростовую среду остаточная активность гомосерин-ацетилтрансферазы MetX составляла 25% от исходной. Синтез цистатионин γ -синтазы и цистатионин β -лиазы также подавлялся, но только до остаточной активности на уровне 50–70%. Очень чувствительной к репрессии оказалась О-ацетилгомосеринсульфгидриказа, демонстрируя в этих условиях 13% остаточной активности. Кроме того, синтез гомосериноацетилтрансферазы MetX подавлялся 10 mM цистеина до 50% от ее первоначальной активности [72].

Роль репрессора в процессе биосинтеза метионина у *C. glutamicum* играет белок McbR, кодируемый геном *mcbR*, продукт которого был первоначально установлен как белок, связывающийся с регуляторной областью *metY* [73]. McbR относится к регуляторам TetR-типа, которые обычно индуцируются низкомолекулярными эффекторами [74]. С помощью двумерного гель-электрофореза протеома с последующей идентификацией разделенных белков было установлено, что образование, по крайней мере, 6 белков, MetY, MetK, Hom, CysK, CysI и SsuD, у штамма дикого типа *C. glutamicum* подавляется, если его выращивать в присутствии метионина, а у делеционного мутанта *mcbR* оно повышено и не зависит от метионина [73].

Последующее сравнительное транскрипционное профилирование мутанта *mcbR* и штамма дикого типа выявило 86 генов, экспрессия которых была у мутанта повышена, и 51 ген со сниженным уровнем экспрессии. Это снижение могло быть вторичным результатом действия McbR как репрессора и замедления скорости роста клеток, хотя нельзя исключать и его роль как активатора экспрессии [75]. Дерепрессированными оказались гены, контролирующие биосинтез серосодержащих аминокислот, транспорт и усвоение различных источников серы, а также гены, кодирующие белки-регуляторы, и гены, связанные с реакцией клеток на окислительный стресс (*sod*, *katA*, *trx*, *trxB*, *trxC*, *sufBCD* и *nifSU*).

Биоинформатический анализ выявил наличие перед 22 генами и оперонами (всего 45 генов) инвертированного повтора 5'-TAGAC-N6-GTCTA-3' как консенсусной последовательности, с которой

связывается репрессор McbR. Таким образом, McbR может подавлять транскрипцию всех генов, обеспечивающих биосинтез метионина (за исключением *aecD* и *metF*), L-цистеина, поглощение и усвоение соединений серы, а также ряда регуляторных генов. Все это свидетельствует о том, что McbR является глобальным клеточным регулятором [75]. Функция указанного мотива как потенциального сайта связывания McbR перед генами *hom*, *cysI*, *cysK*, *metK* и *mcbR* была подтверждена экспериментально [76]. В указанной работе удалось также идентифицировать эффектор McbR. Им оказался S-аденозилгомоцистеин (SAH), основной продукт реакций трансметилирования, осуществляемых при участии SAM. SAH под воздействием SAH-гидролазы AhcY (EC 3.3.1.1) может рециркулироваться в предшественник метионина — гомоцистеин без потери клеткой восстановленной серы. Гомолог гена, кодирующего SAH-гидролазу (NCgl0860), был обнаружен авторами в геноме *C. glutamicum*. Поскольку SAM и SAH физиологически связаны реакциями трансметилирования, клеточный уровень SAH напрямую отражает потребление SAM. Кроме того, было установлено, что не только SAH, но также SAM влияет на связывание McbR. Подтвердилось также репрессирующее влияние метионина на экспрессию генов пути его биосинтеза, зависимое от McbR, хотя механизм репрессии остается не известным. Интересно, что уровни экспрессии генов *metX*, *metB*, *metY*, *metE*, *metH*, and *metK* в условиях недостатка кислорода были значительно выше, чем в аэробных условиях [76].

Делеция регулятора McbR у штамма *C. glutamicum* дикого типа не приводит к сверхсинтезу метионина, но вызывает накопление в клетках гомолантионина и изолейцина. Гомолантионин, очевидно, образуется из о-ацетил-гомосерина и гомоцистеина при помощи цистатионин γ -синтазы, поскольку появление этих соединений блокировалось делецией гена *metB*. Изолейцин же синтезировался по необычному, ранее не известному пути [77]. Более того, при этом значительно замедлялся рост культуры, уменьшалась скорость усвоения глюкозы, выход биомассы и выделение CO₂. В клетках появлялись полифосфатные гранулы, отсутствовавшие у исходного штамма [78]. Авторы рассматривают эти факты как проявление окислительного стресса, на преодоление которого затрачиваются клеточные ресурсы. Действительно, исследование метаболических потоков глюкозы в путях центрального метаболизма выявило у мутанта $\Delta mcbR$ перенаправление потока из пентозо-фосфатного пути в гликолиз и цикл трикарбоновых кислот. Эти изменения нарушили энергетический метаболизм и редокс-статус клеток, соотношения NADH:NAD⁺ и особенно NADPH:NADP⁺ существенно уменьшились. При этом произошла выраженная индукция белков,

связанных с окислительным стрессом. Была затронута также экспрессия ферментов центрального метаболизма, синтеза аминокислот, витаминов и усвоения железа. Все это подтверждает роль McbR как глобального регулятора клеточного метаболизма [78].

Можно отметить, что с фрагментом ДНК регуляторной области гена *metY*, которая использовалась для обнаружения McbR, связывалось еще 3 белка, функции которых не известны. Причем, один из этих белков относится к регуляторным белкам LacI-типа и, возможно, также участвует в регуляции синтеза метионина [73].

С точки зрения перспективности использования делеции McbR для создания продуцента представляется особенно важным обнаруженное ее влияние на ограничение образования NADPH, особенно учитывая высокую потребность биосинтеза метионина в этом кофакторе. Кроме того, не благоприятным для продукции метионина является синтез гомолантионина. И хотя его можно предупредить делецией *MetB*, это не повышает биосинтез и накопление метионина. Другим негативным фактором является нарушение синтеза серина и как следствие — уменьшение доступности метил-тетрагидрофолата [78]. Таким образом, целесообразность использования делеции регулятора McbR при создании штаммов-продуцентов метионина остается под вопросом.

В связи с данными о том, что делеция McbR вызывает окислительный стресс, следует отметить, что *C. glutamicum* обладает относительно высокой устойчивостью к этому стрессу. Недавно описан белок-регулятор, CsrR (ген *csrR*), контролирующей реакцию бактериальных клеток на стрессы. Гены, обеспечивающие окислительно-восстановительный гомеостаз, в штамме с делецией CsrR проявляют повышенные уровни транскрипции, а соотношение NADPH/NADP⁺ было выше, чем у родительского штамма [79]). Возможно, что мутация $\Delta csrR$ будет в той или иной степени супрессировать негативные последствия инактивации McbR и ее можно использовать при конструировании продуцента метионина.

У *C. glutamicum* был обнаружен еще один регуляторный элемент, контролирующий метаболизм серосодержащих аминокислот и усвоение серы. Оказалось, что инсерционная инактивация или делеция гена NCgl2640 с неизвестной функцией вызывает устойчивость к этионину — аналогу метионина — за счет сверхсинтеза и накопления последнего внутри клеток и в среде [80]. При этом уменьшалась метионин-зависимая репрессия о-ацетилгомосерин сульфгидриказы (*MetY*), цистеинсинтазы (EC 2.5.1.47) (*cysK*) и *cys*-оперона. Однако продукт гена NCgl2640 не связывался с промоторной областью *cysK*, *metY* и *cys*-оперона, хотя эти же авторы наблюдали такое связывание

для McbR. Поэтому предполагается его не прямое участие в регуляции биосинтеза метионина, механизм которого остается пока не известным.

Поскольку инактивация NCgl2640 вызывала накопление метионина и не влияла заметным образом на скорость роста мутанта, представляется перспективным использовать такого рода модификацию при создании штаммов-продуцентов метионина и его предшественников.

Рассматривая пути биосинтеза метионина и их регуляцию у *C. glutamicum*, следует оценить значение прямого сульфгидрирования для создания эффективного продуцента этой аминокислоты. Хотя путь транссульфурации может быть благоприятным для биосинтеза метионина, выбор прямого пути сульфгидрирования, который использует сульфид-ион в качестве субстрата, очевидно, связан с доступными источниками серы в среде. На переключение клеток на соответствующий путь может влиять внутриклеточный уровень пула цистеина и H₂S. Прямое попадание сульфида в путь биосинтеза метионина может обеспечить энергетические преимущества для клеток. Следовательно, наличие двух независимых ферментов для путей, транссульфурации и прямого сульфгидрирования, с различными регуляторными механизмами обеспечивает *C. glutamicum* заметную метаболическую гибкость, которую следует использовать в процессе получения продуцентов на основе этой бактерии.

3.3. Биосинтез метионина у других микроорганизмов и растений.

Кратко остановимся на особенностях биосинтеза метионина у других микроорганизмов и у растений. Путь биосинтеза метионина и гены, кодирующие соответствующие ферменты у разных бактерий различается. Реакцию активирования гомосерина могут катализировать ферменты, гомологичные принадлежащим к разным семействам MetA и MetX. При этом первоначально считалось, что все гомологи MetA являются гомосерин-о-сукцинил трансферазами. Однако у ряда бактерий, таких как *Thermotoga maritima* [81], *Bacillus cereus* [82] и *Agrobacterium tumefaciens* [83], было экспериментально показано, что MetA катализирует ацетил-трансферазную реакцию, т.е. является гомосерин-о-ацетилтрансферазой. При исследовании кристаллической структуры фермента из *Bacillus cereus* оказалось, что специфичность определяется аминокислотным остатком глутамата, Glu111, в активном центре фермента. Замена его на глицин изменяла субстратную специфичность MetA с ацетил-CoA на сукцинил-CoA и наоборот [82]. Согласно результатам биоинформатического анализа у большинства бактерий имеется фермент с активностью MetX [52].

Последующий синтез гомоцистеина из активированного гомосерина осуществляется у всех организмов или двухступенчатым путем транссульфурации, и/или одноступенчатым сульфидрированием. Надо отметить, что ферменты, которые катализируют прямой синтез гомоцистеина и способны к замещению ацильного остатка у четвертого атома углерода сульфидом (это так называемое γ -замещение), были давно обнаружены у грибов, дрожжей и бактерий [84]. Эти реакции относятся к PLP-зависимым элиминациям и замещениям [85]. В результате такого рода реакции может, например, осуществляться синтез цистеина, катализируемый триптофансинтазой, непосредственно из серина и сульфида [86].

Было показано, что в экстрактах дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* присутствовала активность, способная к сульфидрированию с помощью H_2S как О-ацетил-L-серина, так и О-ацетил-L-гомосерина. Очищенный в 300 раз фермент реагировал также с О-сукцинилгомосерином и непосредственно с L-гомосерином, обеспечивая прямой синтез гомоцистеина, но не мог использовать вместо H_2S в качестве косубстрата цистеин [87].

Как отмечалось, прямое сульфидрирование на самом деле является преобладающим путем биосинтеза метионина по всему филогенетическому древу. В этом пути большинство бактерий используют О-ацилгомосерин сульфидрилазу (MetY или MetZ) для катализа образования гомоцистеина из О-ацилгомосерина и H_2S . Все ферменты путей транссульфурации и сульфидрирования являются гомологами, и все они используют PLP в качестве кофактора. У *Leptospira meyeri* ген *metY*, кодирующий О-ацетилгомосерин-сульфидролазу, клонировали по комплементации мутации *metB*. При этом, хотя он обладал большой гомологией с аналогичными белками из *Aspergillus nidulans* и *Saccharomyces cerevisiae*, степень подобия с бактериальными цистатионин γ -синтазами была низкой [88].

Фермент MetY у *C. glutamicum* также является бифункциональным и действует довольно эффективно и как цистатионин γ -синтаза (MetB). Оба эти фермента используют ОАHS в качестве субстрата и могут, хотя и плохо, использовать ОSHS. Надо отметить, что у этого организма последовательность MetY на 33% идентична MetB [71]. Основываясь на филогенетическом древе и результатах тестов на комплементации, сделано предположение о способности продукта предкового гена действовать как ОАHS- или ОSHS-сульфидрилаза [89].

При сравнении структуры MetY и MetB из *Thermotoga maritima*, остаток Arg270 был выявлен как критический фактор, определяющий специфичность. Он обеспечивает связывание сульфида (HS^-) в качестве второго субстрата MetY, блокируя более крупный субстрат MetB, цистеин [90].

Мутагенез этого остатка может дать представление о специфичности, а также о предполагаемой эволюции MetB из предкового MetY.

У высших растений имеется как путь транссульфурации, так и путь прямого сульфидрирования [10, 11, 91]. Исходным соединением для обоих путей является предшественник треонина — 4-фосфо-гомосерин. Реакцию активации гомосерина за счет АТР катализирует гомосеринкиназа. Решающую стадию биосинтеза метионина, при которой О-фосфогомосерин направляются в путь синтеза, ведущий к метионину, у высших растений катализирует О-фосфогомосерин-зависимая цистатионин- γ -синтаза. Интересно отметить, что центральное место в фиксации дистального фосфата в структуре этого фермента занимает открытый остаток лизина, который строго консервативен в растительных цистатионин-гамма-синтазах, тогда как у бактериальных ферментов в этом положении остаток глицина. Примечательно также, что этот фермент может обеспечить образование метионина как по пути трассульфурции, так и по пути сульфидрирования. Первый так же как и у микроорганизмов, включает образование цистатионина, который затем превращается цистатионин- β -лиазой в гомоцистеин и далее за счет переноса метильной группы с N5-метилтетрагидрофолата из него образуется метионин. В растениях эту реакцию катализирует кобаламин-независимая метионинсинтаза [92].

4. БИОСИНТЕЗ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ МЕТИОНИНА У БАКТЕРИЙ

В контексте создания технологии получения метионина с помощью метаболической инженерии следует также кратко описать пути синтеза у бактерий серина, цистеина, ассимиляционного восстановления сульфата и тиосульфита до сульфида, а также синтез метил-тетрагидрофолата, необходимых для биосинтеза данной аминокислоты. Синтез общего предшественника аминокислот аспарагинового семейства — аспартата был представлен выше.

4.1. Биосинтез серина и глицина

Серин используется как предшественник для синтеза цистеина, так и в качестве донора метильных групп для образования метил-тетрагидрофолата (метил-ТГФ, CH_3 -ТНФ), который, в свою очередь, является одним из доноров метильной группы на последней стадии биосинтеза метионина.

Биосинтез серина у *E. coli* и *C. glutamicum* осуществляется одинаково из продукта гликолиза — 3-фосфоглицерата (рис. 2). На первой стадии биосинтеза гидроксильная группа 3-фосфоглицерата окисляется фосфоглицератдегидрогеназой SerA (EC 1.1.1.95) (ген *serA*), использующей NAD^+ в качестве кофактора, до кето-группы с образованием

3-фосфогидроксипировата. Далее, с помощью фосфосериламинотрансферазы (ЕС 2.6.1.52) (ген *serC*), требующей пиридоксаль-5'-фосфат в качестве кофактора, происходит перенос аминогруппы с глутамата на 3-фосфогидроксипироват с образованием 3-фосфосерина, который гидролизруется до свободного серина фосфосеринфосфатазой (ЕС 3.1.3.3) (*serB*) [93, 94]. Регуляция этого пути осуществляется за счет ингибирования серином по принципу обратной связи активности фермента SerA [95].

Серин превращается в глицин серингидроксиметилтрансферазой (SHMT) (ЕС 2.1.2.1) (ген *glyA*) в результате переноса гидроксиметильной группы на тетрагидрофолат с одновременным образованием 5,10-метилентетрагидрофолата [94] (рис. 2). Эта реакция у *C. glutamicum* является единственным источником 5,10-метилентетрагидрофолата (см. ниже).

4.2. Биосинтез цистеина

В пути биосинтеза метионина у *E. coli* если не единственным (см. ниже), то основным источником серы в реакции транссульфурации для синтеза цистатионина из OSHS является цистеин. Он же участвует в данной реакции и у *C. glutamicum*, взаимодействуя с OANS.

Следует отметить, что образование цистеина — это важнейший способ включения восстановленной серы в органические структуры. Второй механизм обеспечивается синтезом гомоцистеина в реакции активированного гомосерина с сульфидом, которую катализирует цистатионин-γ-синтаза или сульфгидрилаза (см. выше).

Путь биосинтеза цистеина, по-видимому, идентичен у различных микроорганизмов. Первую стадию его образования катализирует серинацетилтрансфераза (SAT) (ЕС 2.3.1.30) (ген *cysE*), превращающая серин в О-ацетилсерин путем ацетилирования с использованием ацетил-СоА [96]. Цистеин подавляет активность этого фермента и вместе с прекращением экспрессии генов цистеинового регулона предупреждает негативный эффект избытка этой аминокислоты на физиологию и рост клеток. При дефиците серы белок-регулятор CysB совместно с N-ацетилсерином активирует этот регулон [96]. Для обеспечения сверхсинтеза цистеина используют мутанты SAT, не чувствительные к ретроингибированию [97].

Серинацетилтрансфераза *E. coli* находится в многофункциональном комплексе с цистатинсинтазой А, которую также называют О-ацетилсерин-(тиол)-лиазой А или О-ацетилсерин-сульфгидрилайзой А. Это — один из двух ферментов, катализирующих синтез L-цистеина из О-ацетилсерина и сульфида. Цистеинсинтаза А кодируется геном *cysK* [98].

Второй фермент, цистеинсинтаза В (О-ацетилсерин-(тиол)-лиаза В или О-ацетилсерин-сульфгидрилаза В) (ЕС 2.5.1.47), кодируется геном *cysM* и осуществляет PLP-зависимое преобразование О-ацетилсерина и сульфида в цистеин. Кроме того, цистеинсинтаза В может катализировать взаимодействие О-ацетилсерина непосредственно с тиосульфатом, с образованием S-сульфоцистеина, который восстанавливается в цистеин [99].

У *C. glutamicum* L-цистеин синтезируется в основном тем же путем, что и у *E. coli*, и используется для синтеза метионина, хотя, как отмечалось, имеются два пути его биосинтеза — путь транссульфурации и путь прямого сульфгидрирования. Активность SAT чувствительна к ретроингибированию L-цистеином, а синтез SAT подавляется L-метионином. Однако *C. glutamicum*, очевидно, имеет только одну О-ацетилсерин сульфгидрилазу (цистеинсинтазу), кодируемую геном *cysK* [100, 101].

Синтез цистеина тесно связан с поглощением и ассимиляционной редукцией сульфата и тиосульфата.

4.3. Поглощение и ассимиляционная редукция сульфата у *E. coli*

Сульфат и тиосульфат поглощаются из внешней среды с помощью обеспечивающего высокоаффинный транспорт сульфата и тиосульфата ABC-транспортера (АТФ-связывающей кассеты), кодируемого у *E. coli* генами *cysPUWASbp* (рис. 3). При этом гены *cysP* и *sbp* кодируют периплазматические белки, связывающие преимущественно тиосульфат (CysP) или сульфат (Sbp), гены *cysU* и *cysW* кодируют интегральные мембранные белки, образующие транспортный канал, ген *cysA* — АТФ-азу, энергетически обеспечивающую перемещение субстратов через мембрану [96, 102, 103].

При использовании сульфата в качестве источника серы сначала сульфат-аденилилтрансфераза (ЕС 2.7.7.4) (гены *cysD*, *cysN*) катализирует две сопряженные реакции (рис. 3): гидролиз АТФ и активацию поступившего в клетку сульфата с образованием APS и аденозин-дисфосфата (ADP) [104].

На следующем этапе аденилилсульфаткиназа (ЕС 2.7.1.25) (ген *cysC*) осуществляет фосфорилирование APS в результате чего образуется 3-фосфоаденилил-5-фосфосульфат (PAPS) [105]. Затем фосфоаденилсульфатредуктаза (или PAPS фосфоаденилсульфатсульфотрансфераза) (ЕС 1.8.4.8) (ген *cysH*) катализирует восстановление фосфоаденилсульфата до сульфита (SO_3^{2-}) с выделением ADP [106]. Для этой реакции ферменту CysH требуется два электрона, которые передают ему белки тиоредоксин (ген *trxA*) или глуторедоксин (ген *grxA*). Для последующего восстановления этих белков соответствующими редуктазами требуется NADPH [107].

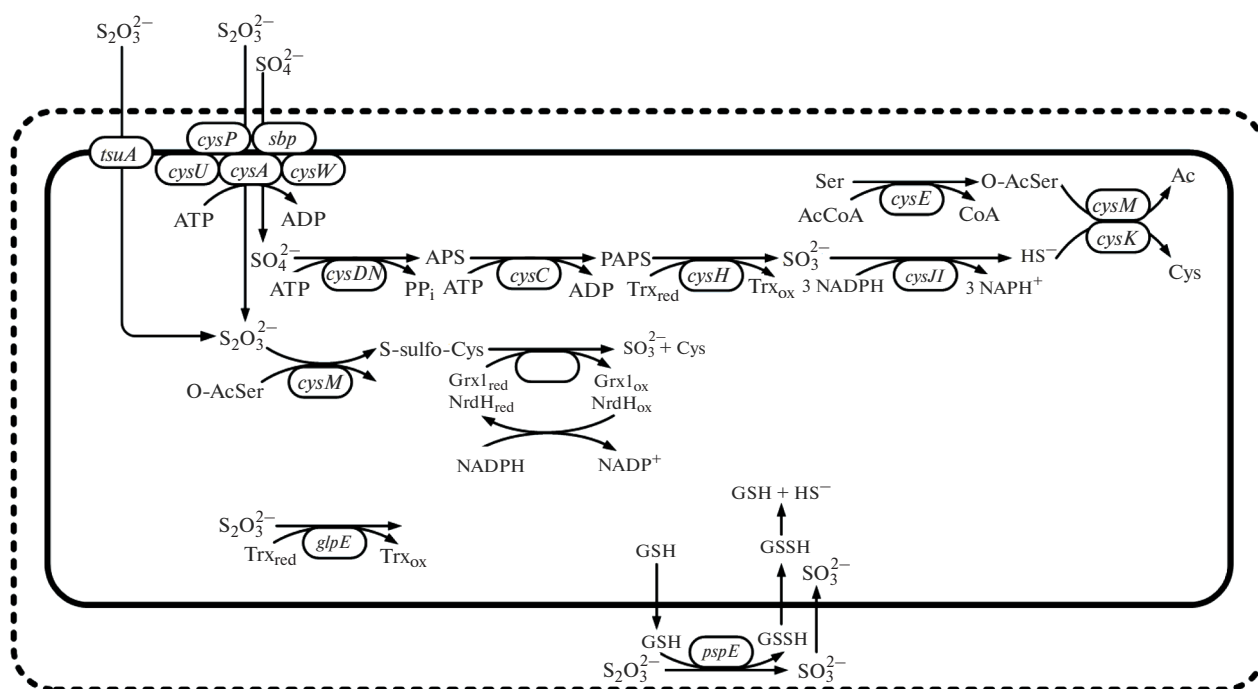


Рис. 3. Схема поглощения и реакций метаболизма сульфата и тиосульфата в клетках *E. coli*. Вместо названий ферментов используются названия соответствующих генов (см. текст) ATP – аденозинтрифосфат; ADP – аденозиндифосфат; PP_i – пиррофосфат; APS – аденозинфосфосульфат; PAPS – фосфоаденозинфосфосульфат; Trx – тиоредаксин; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; $NADP^+$ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный; Cys – цистеин; Ac – ацетат; Ser – серин; AcCoA – ацетилкофермент А; CoA – кофермент А; O-AcSer – O-ацетилсерин; S-sulfo-Cys – S-сульфоцистеин; Grx1 – глутаредоксин 1; NrdH – глутаредоксин-подобный белок; GSH – глутатион восстановленный; GSSH – глутатион окисленный (глутатиондисульфид), red – восстановленная форма; ox – окисленная форма.

Fig. 3. Scheme of uptake and reactions of sulfate and thiosulfate metabolism in *E. coli* cells. Instead of enzyme names, the names of the corresponding genes are used (see text) ATP – adenosine triphosphate; ADP – adenosine diphosphate; PP_i – pyrophosphate; APS – adenosine phosphosulfate; PAPS – phosphoadenosine phosphosulfate; Trx – thioredoxin; NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; $NADP^+$ – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized; Cys – cysteine; Ac – acetate; Ser – serine; AcCoA – acetylcoenzyme A; CoA – coenzyme A; O-AcSer – O-acetylserine; S-sulfo-Cys – S-sulfocysteine; Grx1 – glutaredoxin 1; NrdH – glutaredoxin-like protein; GSH – reduced glutathione; GSSH is oxidized glutathione (glutathione disulfide); red – reduced form; ox – oxidized form.

На последней стадии сульфитредуктаза (EC 1.8.1.2), состоящая из двух субъединиц (гены *cysJI*), катализирует восстановление сульфита до сульфида (S^{2-}) за счет переноса 6 электронов, используя NADPH в качестве донора электронов [108]. В результате, для ассимиляции одного сульфат-иона (SO_4^{2-}) и восстановления его в сульфид-ион (S^{2-}) для синтеза одной молекулы цистеина требуются 4 молекулы NADPH. Простетической группой в субъединице CysI сульфитредуктазы является сирогем, который синтезируется из урпорфириногена-III с помощью сирогемсинтазы (EC 2.1.1.107) (ген *cysG*) [109].

Следует отметить, что экспрессия генов усвоения и редукции сульфата активируется регулятором CysB, который для этого должен связаться с N-ацетилсерин, спонтанно образующимся из O-ацетилсерина. В целом, процессы биосинтеза цистеина и ассимиляции серы жестко регулируются

конечным продуктом, цистеином, и промежуточным – O-ацетилсерин [110, 111].

4.4. Поглощение и ассимиляционная редукция тиосульфата у *E. coli*

Вторым важным источником серы для синтеза серосодержащих аминокислот в бактериальных клетках является тиосульфат. Тиосульфат используется бактериями для синтеза цистеина в качестве источника неорганической серы в ее глобальном биологическом круговороте. Он представляет собой молекулу неорганической серы, относящуюся к сульфановым соединениям, в которых атомы серы связаны с другими атомами серы ($S=SO_3^{2-}$). Благодаря сульфановому атому тиосульфат суммарно имеет более восстановленное состояние серы, чем сульфат (+2). Из-за меньшего числа необходимых стадий восстановления серы в цитоплазме бактерий энергетическая эффек-

тивность биосинтеза серосодержащих аминокислот из тиосульфата выше, чем из сульфата. Интересно отметить, что тиосульфат подавляет утилизацию сульфатов, в частности, резко снижая экспрессию комплексов-переносчиков сульфата/тиосульфата и других генов, регулируемых *CysB* [112].

Как было отмечено, тиосульфат может поглощаться клетками *E. coli* с помощью ABC-транспортера, кодируемого генами *cysPUWASbp*, связываясь в периплазме преимущественно с *CysP*. После поступления в клетки, он с помощью цистеинсинтазы В реагирует с О-ацетилсеринном с образованием S-сульфоцистеина, который затем превращается в цистеин [111]. Это происходит в результате реакций редуционного расщепления дисульфидной связи ($R-S-SO_3^-$) дисульфидредуктазами — глутаредоксиноподобным белком *NrdH* или глутаредоксином *Grx1*. Для непрерывности этих восстановительных реакций сам *NrdH* должен быть затем восстановлен тиоредоксинредуктазой (EC 1.8.1.9), использующей NADPH, и аналогично *Grx1* (EC 1.8.1.8) (ген *grxA*) — редуцированной формой глутатиона (GSH), которая каждый раз восстанавливается глутатионредуктазой (EC 1.8.1.7), использующей NADPH [113]. В целом, тиосульфатный путь требует только одну молекулу NADPH в качестве расхода клеточной энергии для биосинтеза одной молекулы цистеина, а одновременно высвобождаемый сульфит (SO_3^{2-}) также ассимилируется в другую молекулу цистеина через сульфатный путь, которому требуется только три молекулы NADPH. Таким образом, при усвоении тиосульфата 4 молекулы NADPH расходуются на синтез 2 молекул цистеина (рис. 3).

Второй путь восстановления тиосульфата, поступившего в клетки обычным путем, катализирует цитоплазматическая тиосульфат сульфотрансфераза *GlpE* (EC 2.8.1.1) (ген *glpE*), имеющая одиночный роданез-подобный домен [114]. Роданезы — ферменты, множество генов которых имеется в геномах почти всех организмов. Эти ферменты катализируют перенос сульфановой серы тиосульфата на цианид (тиосульфат-цианид сульфотрансферазы) с образованием тиоцианата (нем. “rhodanid”) и сульфита. В отсутствие цианида перенос осуществляется на другие акцепторы, в частности, на тиоредоксин [115, 116]. Таким образом, после взаимодействия тиосульфата с тиоредоксином с участием тиоредоксинредуктазы и NADPH образуется H_2S и сульфит [116]. H_2S используется для синтеза цистеина и, возможно, в каких-то условиях также для синтеза метионина, минуя цистатинин. Сульфит же восстанавливается далее до сульфида по ранее описанному механизму (рис. 3). По этой причине штамм, мутантный по цистеинсинтазе В (*cysK*) оказался способным к росту на среде с тиосульфатом, а сверхэкспрессия *glpE* по-

высила продукцию цистеина при культивировании штамма-продуцента в этих условиях [117].

Кроме *GlpE* у *E. coli* еще имеется намного более активная и специфичная к тиосульфату сульфотрансфераза, *PspE*, которая локализуется в периплазме и катализирует взаимодействие с тиосульфатом транспортируемого сюда GSH [118]. Ее можно рассматривать как тиосульфат-глутатион сульфотрансферазу. При этом образуется сульфит и дисульфид глутатиона (GSSH), которые транспортируются из периплазмы в цитоплазму клетки (рис. 3). GSSH может служить источником сульфановой серы и H_2S [119]. В связи с этим интересно отметить, что недавно описанная способность *E. coli* генерировать из тиосульфата H_2S зависит от белка-регулятора CRP, контролирующего множество генов, участвующих в гликолизе, и вместе с циклическим AMP обеспечивающего кatabолитную репрессию [120]. Весьма вероятно, что соответствующая активность связана с тиосульфат-сульфотрансферазами *GlpE* и *PspE*, о которых известно, что их синтез подвержен такой репрессии [114, 119].

Недавно был описан дополнительный специфический мембранный импортер тиосульфата, *YeeE*, кодируемый геном *yeeE*, который имеет необычную структуру и принадлежит к семейству *YeeE/YedE* [121]. У мутантов *cysPcysAShp*, у которых нарушен транспорт сульфата и тиосульфата, этот транспортер обеспечивает поглощение тиосульфата, необходимое для синтеза цистеина (рис. 3). При этом наблюдается медленный, но уверенный рост культуры, который можно ускорить за счет сверхэкспрессии гена *yeeE*. Еще одним фактором, необходимым для усвоения тиосульфата в этих условиях является продукт гена *yeeD*, цитоплазматический белок, предположительно кодирующий сульфотрансферазу. В связи с тем, что гены *yeeE* и *yeeD* необходимы для поглощения тиосульфата (*thio-sulfate uptake*), предложено называть их, соответственно, *tsuA* и *tsuB* [112]. Усиление экспрессии этих генов, в том числе, за счет повышения стабильности соответствующих мРНК (путем инактивации РНК-пирофосфогидролазы, удаляющей пирофосфат с 5'-конца мРНК и инициирующей распад мРНК), вдвое повышало продукцию цистеина ([112, 117, 122]).

4.5. Поглощение и ассимиляционная редукция сульфата и тиосульфата у *C. glutamicum*

У *C. glutamicum* существует иной чем у *E. coli* механизм поглощения и восстановления неорганических соединений серы. С помощью геномного и последующего генетического анализа у этого организма был идентифицирован кластер из восьми генов, *fpr2 cysIXHDNYZ*, которые кодируют транспортер и ферменты, ответственные за поступление в клетки и восстановление сульфата [123]. При

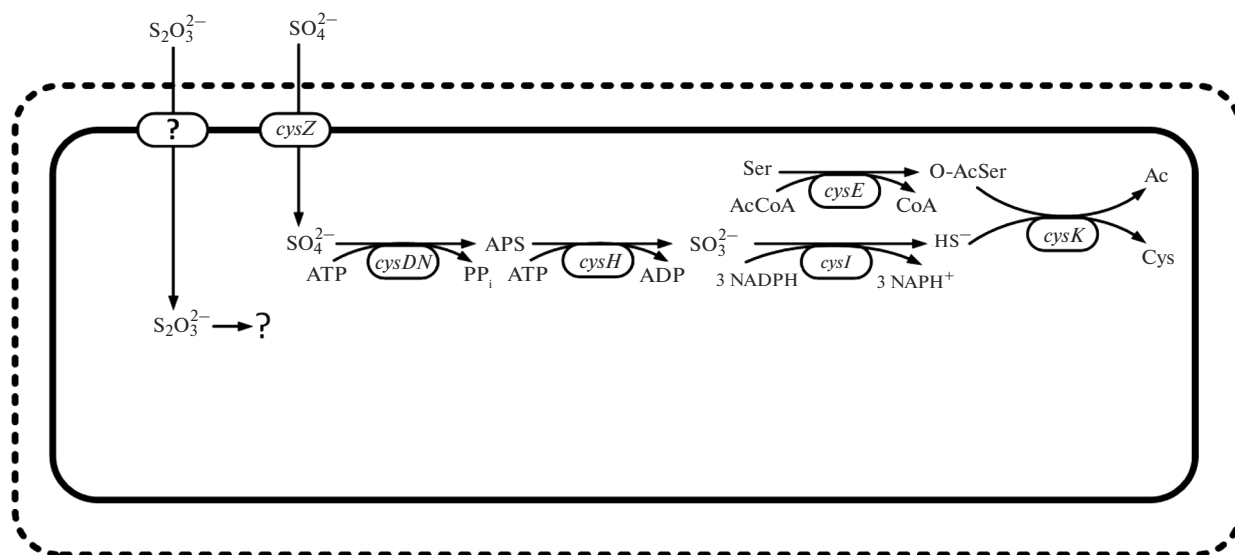


Рис. 4. Схема поглощения и реакций метаболизма сульфата в клетках *C. glutamicum*. Вместо названий ферментов используются названия соответствующих генов (см. текст). ATP — аденозинтрифосфат; ADP — аденозиндифосфат; PP_i — пирогосфат; APS — аденозинфосфосульфат; NADPH — никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; NADP⁺ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный; Cys — цистеин; Ac — ацетат; Ser — серин; AcCoA — ацетилкофермент А; CoA — кофермент А; O-AcSer — O-ацетилсерин.

Fig. 4. Scheme of absorption and reactions of sulfate metabolism in *C. glutamicum* cells. Instead of enzyme names, the names of the corresponding genes are used (see the text). ATP — adenosine triphosphate; ADP — adenosine diphosphate; PPI — pyrophosphate; APS — adenosine phosphosulfate; NADPH — nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; NADP⁺ — nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized; Cys — cysteine; Ac — acetate; Ser — serine; AcCoA — acetylcoenzyme A; CoA — coenzyme A; O-AcSer — O-acetylserine.

этом только четыре гена кластера кодируют белки, которые можно отнести к ортологам соответствующих генов *E. coli*.

Это *cysI*, *cysH*, *cysD* и *cysN* (рис. 4), которые, однако, только частично или совсем не комплементируют соответствующие мутации у *E. coli*. Функция остальных генов была предсказана на основании гомологии кодируемых ими белков с белками других бактерий, в большинстве своем — представителей порядка *Actinomycetales*. Относящийся к мембранным белкам CysZ, очевидно, является сульфатпермеазой. Это — высокоафинный транспортер, переносящий через мембрану сульфат и сульфит. Кроме него *C. glutamicum* имеет дополнительный низкоафинный транспортер сульфата, способный функционировать только при концентрации субстрата, превышающей 5 mM [123].

Поступивший в клетки сульфат аденилируется CysDN, и образующийся APS затем сразу восстанавливается CysH до сульфита. Таким образом, CysH является здесь APS редуктазой (EC 1.8.99.2). Сульфит редуцируется до сульфида с помощью редуктазы CysI, сирогемный кофактор для которой синтезирует CysY, а электроны предоставляет ферредоксин CysX и NADPH-ферредоксинредуктазы Fpr2 и Fpr1 (EC 1.18.1.2), которые используют NADPH для его последующего восстановления. Ген *fpr1* не сцеплен с упомянутым кластером и ло-

кализуется отдельно. Интересно, что он не может быть удален, что указывает и на другую важную функцию этого гена [123].

Гены *cysIXHDNYZ* образуют оперон, который, видимо, транскрибируется с единственного промотора, а ген *fpr2* — с другого промотора и в противоположном направлении. Оба промотора перекрывают сайты связывания транскрипционного репрессора McbR, который подавляет их экспрессию, как и предполагалось ранее [82]. Кластер генов *fpr2*—*cysIXHDNYZ*, обеспечивающий поглощение и восстановление сульфата, находится также под контролем другого регулятора транскрипции CysR [124], который принадлежит к регулону McbR и является необходимым активатором их экспрессии. Делеционный мутант гена *cysR* теряет способность утилизировать сульфат в качестве источника серы. Выравнивание промоторных областей генов, активированных CysR, выявило мотив связывания регулятора, состоящий из двух последовательностей по 10 п.н., образующих инвертированный повтор с переменным спейсером в 6–8 п.н. ДНК-связывающая активность CysR требует наличия O-ацетил-L-серина или O-ацетил-L-гомосерина, каждый из которых является акцептором H₂S для синтеза цистеина или метионина соответственно. Таким образом, CysR является функциональным аналогом CysB *E. coli* и контролиру-

ет экспрессию генов, ответственных за поглощение и редукцию серы, в ответ на доступность сульфидных акцепторов, что позволяет избежать накопления токсичного сульфида в клетках. Следует также отметить, что избыток в среде сульфата и сульфита, а также цистеина, подавляет экспрессию генов усвоения серы.

Недавно у *C. glutamicum* был обнаружен новый глобальный регулятор OsnR, функционирующий как репрессор транскрипции генов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях на стресс [125]. Среди контролируемых им генов оказался ген, обозначенный как *cysS*. Белок, кодируемый этим геном, в свою очередь, регулирует экспрессию регулятора CysR и играет положительную роль в ассимиляции источников серы. Одновременно CysS подавляет экспрессию гена NCgl2463, который кодирует импортер цистеина/цистина [126]. Таким образом, у *C. glutamicum* метаболизм серы связан с глобальной реакцией клетки на стресс. Интересно, что CysR подавляет экспрессию некоторых генов, функция которых пока не известна. Поскольку эти гены регулируются совместно McbR, кодируемые ими белки, вероятно, также вовлечены в путь метаболизма серы и как-то влияют на синтез метионина.

Бактерии *C. glutamicum* способны также усваивать в качестве единственного источника серы тиосульфат, хотя растут на нем в 1.5 раза медленнее, чем на сульфате. При этом делеция транспортера CysZ не влияет на скорость роста, хотя по сравнению со штаммом дикого типа увеличивается длительность лаг-фазы. В любом случае это указывает на отдельный путь поглощения тиосульфата у *C. glutamicum* (рис. 4), причем, соответствующие гены, очевидно, локализируются на другом участке хромосомы. В отличие от того, что наблюдается у *E. coli* (см. выше), тиосульфат практически не оказывает никакого влияния на экспрессию генов усвоения сульфата [124].

Следует отметить, что транспорт и метаболизм тиосульфата у *C. glutamicum* мало изучены. Вероятно, что образование сульфида и сульфита из тиосульфата происходит при участии сульфотрансфераз и системы тиоредоксина и глутаредоксина [127], в частности, каких-то продуктов гомологов гена *glpE*, обнаруженных у этого организма [128]. Кроме того, эти процессы могут осуществляться также импортерами и сульфотрансферазами, родственными YeeE и YeeD, функционирование которых существенно снижает потребность в АТФ и NADPH для редукции серы при использовании тиосульфата. В свою очередь, модификации этих генов могут значительно увеличить выход метионина. Наконец, можно использовать соответствующие гены из *E. coli*, обеспечивая их оптимальную экспрессию в условиях, когда весь

образующийся в клетках сульфид расходуется для синтеза метионина.

Применение тиосульфата вместо сульфата обеспечивало повышенную продукцию серосодержащих аминокислот соответствующими штаммами-продуцентами *C. glutamicum* [128, 129].

4.6. Биосинтез метил-тетрагидрофолата

Метионин отличается от всех других аминокислот, входящих в белки, тем, что содержит метильную группу CH_3 -, называемую также C-1, которую должен получать в свою молекулу в процессе биосинтеза. Как уже отмечалось, донорами метильной группы могут выступать 5-метилтетрагидрофолат или 5-метилтетрагидроптероил-три-L-глутамат, а соответствующую реакцию катализирует PLP-зависимая метионинсинтаза (ген *metE*) или кобаламин-зависимая метионинсинтаза (ген *metH*), соответственно.

При превращении катализируемого SHMT серина в глицин происходит перенос гидроксиметильной группы на тетрагидрофолат с образованием 5,10-метилентетрагидрофолата (CH_2 -THF) [94, 130], который восстанавливается продуктом гена *metF* 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазой до 5-метилтетрагидрофолата (CH_3 -THF) (рис. 2). MetF состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых содержит молекулу не ковалентно связанного FAD. В ходе реакции в качестве восстановителя используется NADH, с которого электроны при посредстве FAD переносятся на CH_2 -THF [131]. Освобождающийся в результате реакций, катализируемых метионинсинтазами, THF вновь используется в процессе превращения серина в глицин, формируя вместе с ними так называемый одноуглеродный цикл, (One Carbon Cycle) [55].

Известно, что SHMT является PLP-зависимым ферментом. Таким образом, для синтеза глицина и C-1 в клетках также должно поддерживаться достаточное количество этого кофермента, впрочем, как и для ряда других реакций, обеспечивающих синтез метионина.

У *E. coli* 5,10-метилентетрагидрофолат синтезируется также при расщеплении глицина системой GcvTHP (glycine cleavage system) (рис. 2), кодируемой опероном *gcvTHP* [132]. Были охарактеризованы системы Gcv нескольких микробных, растительных и животных систем и установлено, что они представляют собой мультиферментные комплексы, состоящие из четырех белковых компонентов: P-белка, H-белка, T-белка и L-белка. P-белок катализирует PLP-зависимое высвобождение CO_2 из глицина, оставляя метиламиновую часть. Фрагмент метиламина переносится в группу липоевой кислоты H-белка, которая связывается с P-белком перед декарбоксилированием глицина. T-белок катализирует высвобождение NH_3 из

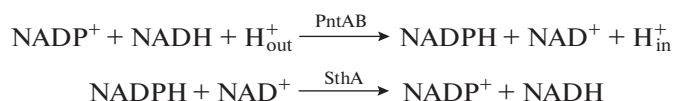


Рис. 5. Схема реакций взаимопревращения восстановительных эквивалентов в клетках *E. coli*. H_{out}^+ — ион водорода, расположенный в периплазматическом пространстве; H_{in}^+ — ион водорода, расположенный в цитоплазме.

Fig. 5. Scheme of reactions of mutual conversion of reducing equivalents in *E. coli* cells. H_{out}^+ is a hydrogen ion located in the periplasmic space; H_{in}^+ is a hydrogen ion located in the cytoplasm.

метиламиновой группы и переносит оставшуюся единицу C-1 в THF, образуя 5,10- CH_2 -THF. Затем L-белок окисляет липоевую кислоту, входящую в состав H-белка, и переносит электроны на NAD^+ , образуя NADH (94). У *E. coli* L-белок отсутствует, и его роль выполняет многофункциональный белок, кодируемый геном *lpdA* [133].

Было установлено, что уровень образования C-1 групп в клетках может быть узким местом для биосинтеза метионина, ограничивающим его продукцию. В то же время, усиление активности Gcv системы повысило накопление целевой аминокислоты [134, 135].

У *C. glutamicum* реакция синтеза глицина, которую катализирует SHMT, кодируемая геном *glyA*, является единственным способом получения 5,10- CH_2 -THF [136]. Однако сверхэкспрессия *glyA* не благоприятна для роста этих бактерий. Поэтому для обеспечения C-1 группами сверхсинтеза метионина, а также для перепрограммирования метаболизма у продуцентов серина на основе *C. glutamicum*, вводили оперон *gcvTHP* из *E. coli* [137].

5. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА МЕТИОНИНА

Как известно, пары окислительно-восстановительных кофакторов, NADH/NAD^+ и $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, необходимы для всех живых организмов. Они являются донорами и/или акцепторами восстановительных эквивалентов во многих окислительно-восстановительных реакциях, опосредованных каталитическим действием специфических оксидоредуктаз. В частности, они участвуют примерно в 2000 из почти 8000 реакций, описанных в базе данных ECMDV 2.0 метаболома *E. coli* [138]. Несмотря на химическое сходство, кофакторы NADH и NADPH выполняют разные биохимические функции. Катаболические реакции обычно связаны с NAD^+/NADH , а анаболические реакции — с $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ [139]. Таким образом, вместе эти нуклеотиды оказывают прямое воздействие на все окислительно-восстановительные метаболические пути в клетках.

Молекула L-метионина содержит атом серы и, как уже отмечалось, неорганический источник

серы — обычно это сульфат или тиосульфат, — необходимо восстановить, прежде чем его можно будет использовать для синтеза серосодержащих аминокислот, что требует большой восстановительной мощности. При этом +6-валентный сульфат должен быть восстановлен до –2-валентного сульфида. Основным восстановитель в клетке — это NADPH. И если для биосинтеза 1 моля лизина требуется 3 моля NADPH, для биосинтеза 1 моля глутамата — 4 моля NADPH, то для биосинтеза 1 моля метионина необходимы 8 (8.5) молей NADPH [140, 141].

Бактерии могут генерировать NADPH в процессе ряда реакций, катализируемых дегидрогеназами. Это соответствующие реакции в PPP и изоцитратдегидрогеназная реакция в TCA [142]. *E. coli* получает NADPH также с помощью трансгидрогеназной реакции [143]. Трансгидрогеназные реакции (рис. 5) могут катализироваться либо связанным с мембраной и зависимым от протондвижущей силы ферментом PntAB, либо растворимой, энергонезависимой изоформой фермента — SthA.

Трансгидрогеназа PntAB состоит из двух субъединиц альфа и бета, кодируемых генами *pntA* и *pntB*. Вторая трансгидрогеназа SthA кодируется геном *sthA* (также называемым *udhA*). PntAB катализирует восстановление NADP^+ в NADPH за счет окисления NADH в NAD^+ . SthA катализирует обратную реакцию (рис. 5). Таким образом, физиологическая функция трансгидрогеназ PntAB и SthA в микроорганизмах — это генерация и повторное окисление NADPH. Повышая активность PntAB, усиливают выработку доступного NADPH в клетке. Одновременно с этим SthA (UdhA) обычно удаляют [143].

Генерация NADPH у *C. glutamicum* в основном происходит в PPP [144]. NADPH образуется здесь за счет активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (EC 1.1.1.49) (ген *zwf*) и фосфоглюконатдегидрогеназы (EC 1.1.1.44) (ген *gnd*). При этом неизбежна потеря CO_2 , что и приводит к снижению теоретического выхода метионина из глюкозы у *C. glutamicum* по сравнению с *E. coli*. Этот негативный эффект, вызванный различием в основном способе генерации NADPH у двух бактерий, может быть преодолен путем введения трансгидрогеназы PntAB из *E. coli* в клетки *C. glutamicum*, и

это не является проблемой при создании штаммов-продуцентов [138, 139].

Для повышения уровня генерации NADPH в конструируемых штаммах можно использовать и иные реакций [142], в том числе катализируемые дегидрогеназами из других организмов [142, 145].

6. ТРАНСПОРТ МЕТИОНИНА И ЕГО ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ У БАКТЕРИЙ

6.1. Транспорт метионина и его предшественников в клетки и из клеток у *E. coli*

Ауксотрофные по метионину штаммы *E. coli* способны использовать как L-метионин, так и D-метионин, который, очевидно, превращается в клетках в L-изомер, а также другие производные метионина [146]. Транспорт обоих изомеров метионина в клетки зависит от локуса *metD*, кодирующего ABC-переносчик, в котором идентифицированы три гена, образующие *metNIQ* оперон. Эти гены кодируют компоненты импортеров ABC-семейства: субстрат-связывающий белок MetQ, АТФ-азу MetN и расположенную в мембране пермеазу MetI [147, 148], имеющую 5 трансмембранных сегментов. ABC-переносчик MetNIQ был выделен в новое ABC-семейство импортеров метионина ("methionine uptake transporters", MUT) [149]. В этом семействе, исходя из филогенетического анализа, потенциально существуют еще несколько транспортных систем, которые могут участвовать в поглощении метионина, например, ABC-переносчик *Salmonella enterica* Sfb [154]. Все эти транспортеры используют энергию гидролиза АТФ для перемещения метионина через цитоплазматическую мембрану.

Транспорт метионина в клетки регулируется и подавляется при его высокой внутриклеточной концентрации. Это подавление зависит от репрессора MetJ. В промоторной области оперона *metNIQ* обнаружена последовательность для связывания MetJ [153, 154].

По данным более ранних исследований [150] у *E. coli* кроме высокоафинного переносчика MetD (MetNIQ) существует и низкоафинный переносчик метионина MetP. Однако, ген(ы), кодирующие соответствующий транспортер, не идентифицирован(ы).

Для более надежного предотвращения обратного транспорта метионина в клетки при создании продуцента, оперон *metNIQ* целесообразно инактивировать, например, полностью его делетировать [151].

Усиление активного транспорта метионина из клетки (экспорта) является одним из ключевых этапов при конструировании штаммов-продуцентов. Отток этой аминокислоты позволяет снизить токсический эффект, вызванный ее накоплением в цитоплазме, предотвратить деграда-

цию продукта и ослабить ретроингибирование. У *E. coli*, по крайней мере, два гена кодируют экспортеры метионина: *yjeH* и *leuE* (*yeaS*), применение которых может оказать положительный эффект на его продукцию у *E. coli*.

Ген *yjeH* впервые был связан с экспортом метионина в патентной заявке, поданной в России в 2004 г., на которую в 2006 г. был выдан патент [152]. В 2015 г. экспериментально было установлено, что YjeH является экспортером метионина, лейцина, изолейцина, валина и зависит от градиента протонов. Механизм регуляции экспрессии YjeH в настоящее время плохо изучен. Увеличение внутриклеточных концентраций метионина, изолейцина или лейцина сильно индуцировало его экспрессию, но репрессор или индуктор пока остаются неизвестными. При сверхэкспрессии *yjeH* выход метионина увеличивался на 70% [153]. Использование этого гена описано в ряде патентов, посвященных созданию продуцентов метионина. Показано также, что повышение уровня экспрессии YjeH увеличивает и выход предшественника метионина — О-ацетилгомосерина [154].

Экспортер LeuE принадлежит к семейству транспортеров RhtB надсемейства LysE и также зависит от протондвижущей силы. Он эффективно выводит из клеток лейцин, метионин и гистидин. Экспрессия *leuE* активируется глобальным регулятором Lrp [155].

Кроме того, в экспорте метионина у *E. coli* может участвовать транспортер аминокислот с разветвленной цепью YgaZH [156, 151].

На биосинтез метионина также влияет транспорт его предшественников — цистеина и цистатионина. В одном из последних исследований было показано, что у *E. coli* усиление экспрессии потенциального импортера цистатионина, кодируемого генами *yecSC*, увеличивает продукцию метионина на 15%. Одновременно с этим инактивация предполагаемого импортера цистеина, кодируемого геном *yeaN*, также благоприятно влияет на продукцию метионина, вероятно, из-за увеличения синтеза цистеина на 50% [157].

6.2. Транспорт метионина и его предшественников в клетки и из клеток у *C. glutamicum*

Предварительный анализ выявил у *C. glutamicum* две системы поглощения метионина. Одна из них представлена кластером генов, в котором находился оперон *metQNI* (обозначен в соответствии с порядком расположения гомологичных генов в локусе *metD*). Было показано, что делеция *ΔmetNI* нарушает высокоафинный транспорт метионина в клетки, но при этом сохраняется низкоафинный транспорт. Обнаружено также, что высокоафинный транспорт контролируется глобальным регулятором McbR [158].

Исследование природы низкоафинного транспорта выявило, что он зависит от ионов натрия (Na^+), а не от АТФ. Эти результаты указывают на то, что соответствующая система поглощения метионина, обозначенная MetP, функционирует как система вторичного транспорта, связанная с Na^+ . Кроме метионина MetP обеспечивает и поглощение аланина. Установлено, что система MetP кодируется двумя сцепленными генами, *metP* (NCgl1030) и *metS* (NCgl1029) и, соответственно, двумя белковыми субъединицами, состоящими из 579 и 60 аминокислотных остатков. Большая субъединица содержит 12, а малая 1 трансмембранный сегмент. Было показано, что оперон *metPS* не регулируется McbR [158]. Ослабление или удаление генов высокоафинной системы поглощения метионина положительно влияло на его продукцию [158].

Транспорт метионина из клеток *C. glutamicum* осуществляет двухкомпонентный комплекс BrnFE, кодируемый генами *brnF* и *brnE* [159]. Кроме L-метионина этот транспортер, зависящий от протондвижущей силы, участвует в экспорте L-лейцина, L-изолейцина и L-валина. [160]. Однако индукция *brnFE* была более эффективной в ответ на повышенный уровень метионина по сравнению с изолейцином, хотя именно он и является предпочтительным субстратом для экспорта. У данного транспортера *Km* для метионина составляет около 10 мМ, и кроме него в клетках имеется, по крайней мере, еще одна низкоафинная система экспорта метионина (*Km* ~ 50 мМ), которая экспрессируется конститутивно. Однако возможно, что при значительном повышении внутриклеточной концентрации метионина, его экспорт осуществляется всего лишь за счет побочной активности какого-то транспортера других аминокислот [160]. Экспрессия BrnFE стимулируется регулятором Lgr и усиление его синтеза может положительно влиять на продукцию соответствующих аминокислот штаммами-продуцентами [161].

В заключение следует еще раз отметить важную роль L-метионина в жизнедеятельности различных организмов, его ценность как фармакологического препарата и расширяющееся применение в сельском хозяйстве. В связи с этим задача создания эффективных биотехнологических методов получения этой аминокислоты приобретает все большую актуальность. Сегодня к биотехнологическим процессам получения L-метионина относится как прямой микробиологический синтез, так и двухэтапный способ его получения, предполагающий использование предшественников и их трансформацию в химически чистый L-метионин с помощью ферментов. При этом оба этапа обеспечиваются специально сконструированными штаммами бактерий. Создание эффективных штаммов для этих процессов должно опираться на глубокое знание путей метаболизма этой аминокислоты и всех ее предшественников, их регуляции и взаимосвязи со всем метаболизмом клетки.

кислоты и всех ее предшественников, их регуляции и взаимосвязи со всем метаболизмом клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elango R. Methionine nutrition and metabolism: insights from animal studies to inform human nutrition. *J. Nutr.*, 2020, 150, 2518–2523. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa155>
2. Valley C.C., Cembran A., Perlmutter J.D., Lewis A.K., Labello N.P., Gao J., Sachs J.N. The methionine-aromatic motif plays a unique role in stabilizing protein structure. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(42), 34979–34991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374504>
3. Aledo J.C. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, 2019, 28(10), 1785–1796. <https://doi.org/10.1002/pro.3698>
4. Bigelow D.J., Squier T.C. Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1703(2), 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.012>
5. Brosnan J.T., Brosnan M.E. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J. Nutr.*, 2006, 136(6), 1636–1640. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1636S>
6. Rosenfeld M.A., Yurina L.V., Vasilyeva A.D. Antioxidant role of methionine-containing intra- and extracellular proteins. *Biophys. Rev.*, 2023, 15: 367–383. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01056-7>
7. Lu S.C. S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000, 32(4), 391–395. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00139-9](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00139-9)
8. Fontecave M., Atta M., Mulliez E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, 29(5), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.03.007>
9. Brosnan J.T., Brosnan M.E., Bertolo R.F.P., Brunton J.A. Methionine: A metabolically unique amino acid. *Livest. Sci.*, 2007, 112(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.07.005>
10. Watanabe M., Chiba Y., Hirai M.Y. Metabolism and regulatory functions of o-acetylserine, s-adenosylmethionine, homocysteine, and serine in plant development and environmental responses. *Front. Plant Sci.*, 2021, 12, 643403. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643403>
11. Amir R., Hacham Y. Methionine Metabolism in Plants. In: Agronomy Monographs [Ed. J. Jez], Series Online ISSN: 2156-3276, 2008, chapter 16. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr50.c16>
12. Hanzelka B.L., Greenberg E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.*, 1996, 178(17), 5291–5294. <https://doi.org/10.1128/jb.178.17.5291-5294.1996>
13. Val D.L., Cronan J.E. In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer

- synthases. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(10), 2644–2651. <https://doi.org/10.1128/JB.180.10.2644-2651.1998>
14. *Gadalla M.M., Snyder S.H.* Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.*, 2010, 113(1), 14–26. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x>
 15. *Sokolov A.S., Nekrasov P.V., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A.* Hydrogen sulfide in longevity and pathologies: Inconsistency is malodorous. *Ageing Res. Rev.*, 2021, 67, 101262. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101262>
 16. *Lee B.C., Kaya A., Gladyshev V.N.* Methionine restriction and life-span control. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2016, 1363, 116–124. <https://doi.org/10.1111/nyas.12973>
 17. *Saunderson C.L.* Comparative metabolism of L-methionine, DL-methionine and DL-2-hydroxy 4-methylthiobutanoic acid by broiler chicks. *Br. J. Nutr.*, 1985, 54(3), 621–633. <https://doi.org/10.1079/bjn19850149>
 18. *Shen Y.B., Ferket P., Park I., Malheiros R.D., Kim S.W.* Effects of feed grade L-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional DL-methionine. *J. Anim. Sci.*, 2015, 93(6), 2977–2986. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8898>
 19. *Park I., Pasquetti T., Malheiros R.D., Ferket P.R., Kim S.W.* Effects of supplemental L-methionine on growth performance and redox status of turkey poults compared with the use of DL-methionine. *Poult. Sci.*, 2018, 97(1), 102–109. <https://doi.org/10.3382/ps/pex259>
 20. *Kachungwa Lugata J., Oláh J., Ozsváth X.E., Knop R., Angyal E., Szabó C.* Effects of DL and L-methionine on growth rate, feather growth, and hematological parameters of tetra-sl layers from 1–28 days of age. *Animals (Basel)*, 2022, 12(15), 1928. <https://doi.org/10.3390/ani12151928>
 21. *Wang W., Wang J., Wu S., Wang W., Wang J., Wu S., Dong X., Guo C., Zhang H., Qi G.* Bioavailability of L-methionine relative to DL-methionine in Broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2019, 18(1), 1231–1238. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1641433>
 22. Энциклопедия лекарственных препаратов РЛС <https://www.rlsnet.ru>
 23. *Li Z., Wang F., Liang B., Li Z., Wang F., Liang B., Su Y., Sun S., Xia S., Shao J., Zhang Z., Min Hong, Zhang F., Zheng S.* Methionine metabolism in chronic liver diseases: an update on molecular mechanism and therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther.*, 2020, 5(1), 280. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00349-7>
 24. Официальный интернет-портал правовой информации, Федеральный закон от 03.08.2018 № 280-ФЗ <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201808030066>.
 25. Агро-Матик — белковый концентрат и протеин для животных, птицы, рыбы <https://agro-matik.ru/>.
 26. Кнунянц И.Л., Зефиоров Н.С., Кулов Н.Н., Химическая энциклопедия, том 5, Москва, Россия: Издательство “Советская энциклопедия”, 1998, 783.
 27. *Mannsfeld S.V., Pfeiffer A., Tanner H., Wagner H. Liebetanz E.* Continuous process for the manufacture of methionine. Patent US4069251, C07C 149/247, publ. 1976.
 28. *Shiozaki T., Inoue G.* Process for producing methionine. Patent Application US20070055078 A1, C07C 323/25, publ. 2007.
 29. *Yamashiro N., Nishida J., Koizumi Y.* Method of producing methionine. Patent Application US20140155652 A1, C07C 319/12, publ. 2014.
 30. *Бабынин А.А., Кузнецов В.Б., Трофимова Л.А., Ахметов Ф.К., Зубрицкая Н.Г., Ласкин Б.М.* Разработка российской технологии получения метионина, *Мясные технологии*, 2019, 11, 52–61. <https://doi.org/10.33465/2308-2941-2019-11-52-53>
 31. *Карнов А.Б., Кондратенко А.Д., Козлов А.М., Кошелева Ю.Г.* Производство метионина как эффективный способ переработки сероводорода. *Neftgaz.RU*, 2019, 4, 60–62.
 32. “Ростех” наладит в Петербурге производство метионина <https://sfera.fm/news/korma/rostekh-naladit-v-peterburge-proizvodstvo-metionina>
 33. *Willke T.* Methionine production — a critical review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(24), 9893–9914. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6156-y>
 34. *Yuan Y.J., Wang S.H., Song Z.X., Gao R.C.* Production of L-methionine by immobilized pellets of *Aspergillus oryzae* in a packed bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2002, 77(5) 602–606. <https://doi.org/10.1002/jctb.615>
 35. *Woltinger J., Karau A., Leuchtenberger W., Drauz K.* Membrane reactors at Degussa. In: Kragl, U. (eds) Technology Transfer in Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering 2005, 92, 289–316 Springer, Berlin, Heidelberg <https://doi.org/10.1007/b9890936>
 36. *Hummel W., Geueke B., Osswald S., Weckbecker C., Huthmacher K.* Method for the preparation of L-amino acids from D-amino acids. Patent US7217544, C12P 13/04, publ. 2007.
 37. *Findrik Z., Vasić-Racki D.* Biotransformation of D-methionine into L-methionine in the cascade of four enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, 98(5), 956–967. <https://doi.org/10.1002/bit.21501>
 38. *Wagner T., Hantke B., Wagner F.* Production of L-methionine from d,l-5-(2-methylthioethyl) hydantoin by resting cells of a new mutant strain of *Arthrobacter species* DSM 7330. *J. Biotechnol.*, 1996 46(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00193-X](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00193-X)
 39. *Syldatk C., May O., Altenbuchner J., Mattes R., Siemann M.* Microbial hydantoins—industrial enzymes from the origin of life? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51(3), 293–309. <https://doi.org/10.1007/s002530051395>
 40. *May O., Nguyen P.T., Arnold F.H.* Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18(3), 317–320. <https://doi.org/10.1038/73773>
 41. *Kumar D., Gomes J.* Methionine production by fermentation. *Biotechnol. Adv.*, 2005, 23(1), 41–61. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.08.005>
 42. *Krömer J.O., Wittmann C., Schröder H., Heinzle E.* Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, 2006, 8(4), 353–369. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.02.001>
 43. Metabolic Explorer has sold its technology for the fermentative production of methionine to Evonik. <https://www.lincolnternational.com/transactions/metabolic-explorer-sold-its-technology-for-the-fermentative-production-of-methionine-to-evonik/>.

44. Zelder O., Haefner S., Herold A., Klopprogge C., Schroder H., Yocum R.R., Williams M.K. Use of dimethyl disulfide for methionine production in microorganisms. Patent US8399214 B2, C12P 1/00, publ. 2013.
45. Kim S., Cho K., Shin Y., Um H., Choi K., Chang J., Cho Y., Park Y. Microorganism producing L-methionine precursor and method of producing L-methionine and organic acid from the L-methionine precursor. Patent Application WO2008013432 A1, C12P 13/12, publ. 2008.
46. Fremy G., Barre P., Kim S.Y., Son S.K., Lee S.M. Preparation Process of L-Methionine. Patent Application WO2013029690 A1, C12P13/12, publ. 2013.
47. CJ Cheil Jedang Starts Full-Fledged Operation of L-methionine. <https://www.businesskorea.co.kr/news/articleView.html?idxno=10923>.
48. Methionine: A key to improve use of agricultural resources. <https://www.arkema.com/global/en/resources/post/methionine-a-key-to-improve-use-of-agricultural-resources/>.
49. Becker J., Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production – the heartbeat of industrial strain development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23(5), 718–726. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.025>
50. Reitzer L. Biosynthesis of glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. *EcoSal Plus.*, 2004, 1(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.3>
51. Figge R.M. Methionine biosynthesis in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. In: Amino acid biosynthesis ~ pathways, Regulation and Metabolic Engineering [Ed. V.F. Wendisch]. Berlin: Springer, 2006, 5, 163–93.
52. Ferla M.P., Patrick W.M. Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiol. Read Engl.*, 2014, 160(8), 1571–1584. <https://doi.org/10.1099/mic.0.077826-0>
53. Simon M., Hong J.S. Direct homocysteine biosynthesis from O-succinylhomoserine in *Escherichia coli*: an alternate pathway that bypasses cystathionine. *J. Bacteriol.*, 1983, 153(1), 558–561. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.558-561.1983>
54. Zdych E., Peist R., Reidl J., Boos W. MalY of *Escherichia coli* is an enzyme with the activity of a beta C-S lyase (cystathionase). *J. Bacteriol.*, 177(17), 5035–5039. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5035-5039.1995>
55. Hondorp E.R., Matthews R.G. Methionine. *EcoSal Plus.*, 2006, 2(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.7>
56. Weissbach H., Brot N. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 1991, 5(7), 1593–1597. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01905.x>
57. Li H., Wang B.S., Li Y.R., Zhang L., Ding Z.Y., Gu Z.H., Shi G.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 44(1), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1870-3>
58. Usuda Y., Kurahashi O. Effects of deregulation of methionine biosynthesis on methionine excretion in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(6), 3228–3234. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3228-3234.2005>
59. He Y.Y., Garvie C.W., Elworthy S., Manfield I.W., McNally T., Lawrenson I.D., Phillips S.E.V., Stockley P.G. Structural and functional studies of an intermediate on the pathway to operator binding by *Escherichia coli* MetJ. *J. Mol. Biol.*, 2002, 320(1), 39–53. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00423-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00423-0)
60. Augustus A.M., Reardon P.N., Heller W.T., Spicer L.D. Structural basis for the differential regulation of DNA by the methionine repressor MetJ. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(45), 34269–34276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605763200>
61. Urbanowski M.L., Stauffer L.T., Plamann L.S., Stauffer G.V. A new methionine locus, *metR*, that encodes a trans-acting protein required for activation of *metE* and *metH* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1987, 169, 1391–1397. <https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1391-1397.1987>
62. Maxon M.E., Wigboldus J., Brot N., Weissbach H. Structure-function studies on *Escherichia coli* MetR protein, a putative prokaryotic leucine zipper protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, 87(18), 7076–7079. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7076>
63. Park S.D., Lee J.Y., Kim Y., Kim J.H., Lee H.S. Isolation and analysis of *metA*, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Cells.*, 1998, 8(3), 286–294.
64. Rückert C., Pühler A., Kalinowski J. Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *J. Biotechnol.*, 2003, 104(1–3), 213–228. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00158-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00158-5)
65. Hwang B.J., Yeom H.J., Kim Y., Lee H.S. *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulphydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 2002, 184(5), 1277–1286. <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1277-1286.2002>
66. Lee H.S., Hwang B.J. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulphydrylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 62(5–6), 459–467. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1306-7>
67. Hwang B.J., Kim Y., Kim H.B., Hwang H.J., Kim J.H., Lee H.S. Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of *metB* encoding cystathionine gamma-synthase. *Mol. Cells.*, 1999, 9(3), 300–308.
68. Kim J.W., Kim H.J., Kim Y., Lee M.S., Lee H.S. Properties of the *Corynebacterium glutamicum metC* gene encoding cystathionine beta-lyase. *Mol. Cells.*, 2001, 11(2), 220–225.
69. Park S.D., Lee J.Y., Sim S.Y., Kim Y., Lee H.S. Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Metab. Eng.*, 2007, 9(4), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.05.001>
70. Reinscheid D.J., Eikmanns B.J., Sahm H. Analysis of a *Corynebacterium glutamicum hom* gene coding for a feedback-resistant homoserine dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(10), 3228–3230. <https://doi.org/10.1128/jb.173.10.3228-3230.1991>
71. Hwang B.J., Park S.D., Kim Y., Kim P., Lee H.S. Biochemical analysis on the parallel pathways of methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 17(6), 1010–1017.
72. Hwang B.J., Lee M.S., Kim Y., Lee H.S. Regulation of Enzymes Involved in Methionine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 14(2), 373–378.

73. Rey D.A., Pühler A., Kalinowski J. The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, 2003, 103(1), 51–65.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00073-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00073-7)
74. Cuthbertson L., Nodwell J.R. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2013, 77(3), 440–475.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00018-13>
75. Rey D.A., Nentwich S.S., Koch D.J., Rückert C., Pühler A., Tauch A., Kalinowski J. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol. Microbiol.*, 2005, 56(4), 871–887.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04586.x>
76. Suda M., Teramoto H., Imamiya T., Inui M., Yukawa H. Transcriptional regulation of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthesis genes in response to methionine supplementation under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 81(3), 505–513.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1694-9>
77. Krömer J.O., Heinzle E., Schröder H., Wittmann C. Accumulation of Homolanthionine and Activation of a Novel Pathway for Isoleucine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR Deletion Strains. *J. Bacteriol.*, 2006, 188(2), 609–618.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.2.609-618.2006>
78. Krömer J.O., Bolten C.J., Heinzle E., Schröder H., Wittmann C. Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiol. Read. Engl.*, 2008, 154(12), 3917–3930.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/021204-0>
79. Liu Y., Yang W., Su T., Che C., Li G., Chen C., Si M. The *cssR* gene of *Corynebacterium glutamicum* plays a negative regulatory role in stress responses. *Microb. Cell. Factories*, 2021, 20(1), 110.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01600-8>
80. Mampel J., Schröder H., Haefner S., Sauer U. Single-gene knockout of a novel regulatory element confers methionine resistance and elevates methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 68(2), 228–236.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-1893-6>
81. Goudarzi M., Born T.L. Purification and characterization of *Thermotoga maritima* homoserine transsuccinylase indicates it is a transacetylase. *Extremophiles*, 2006, 10, 469–478.
<https://doi.org/10.1007/s00792-006-0522-3>
82. Zubieta C., Arkus K.A.J., Cahoon R.E., Jez J.M. A Single Amino Acid Change Is Responsible for Evolution of Acyltransferase Specificity in Bacterial Methionine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283(12), 7561–7567.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M709283200>
83. Rotem O., Biran D., Ron E.Z. Methionine biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens*: study of the first enzyme. *Res. Microbiol.*, 2013, 164(1), 12–16.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.005>
84. Yamagata S. Roles of O-acetyl-L-homoserine sulphydrylases in microorganisms. *Biochimie*, 1989, 71(11), 1125–1143.
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(89\)90016-3](https://doi.org/10.1016/0300-9084(89)90016-3)
85. Davis L., Metzler D. 2 Pyridoxal-Linked Elimination and Replacement Reactions. *The Enzymes*, 1972, 7, 33–74.
[https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60446-1](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60446-1)
86. Ishiwata K., Nakamura T., Shimada M., Makiguchi N. Enzymatic production of L-cysteine with tryptophan synthase of *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.*, 1989, 67(3), 169–172.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(89)90116-5)
87. Yamagata S. O-Acetylhomoserine sulphydrylase of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: partial purification, characterization, and its probable role in homocysteine biosynthesis. *J. Biochem*, 1984, 96(5), 1511–1523.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134980>
88. Belfaiza J., Martel A., Margarita D., Saint Girons I. Direct sulphydrylation for methionine biosynthesis in *Leptospira meyeri*. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(2), 250–255.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.2.250-255.1998>
89. Hacham Y., Gophna U., Amir R. In vivo analysis of various substrates utilized by cystathionine gamma-synthase and O-acetylhomoserine sulphydrylase in methionine biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.*, 2003, 20(9), 1513–1520.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msg169>
90. Brewster J.L., Pachl P., McKellar J.L.O., Selmer M., Squire C.J., Patrick W.M. Structures and kinetics of *Thermotoga maritima* MetY reveal new insights into the predominant sulphydrylation enzyme of bacterial methionine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 2021, 296, 100797.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100797>
91. Thompson G.A., Datko A.H., Mudd S.H., Giovanelli J. Methionine Biosynthesis in Lemna: studies on the regulation of cystathionine gamma-synthase, o-phosphohomoserine sulphydrylase, and o-acetylserine sulphydrylase. *Plant. Physiol.*, 1982, 69(5), 1077–1083.
<https://doi.org/10.1104/pp.69.5.1077>
92. Ravanel S., Gakière B., Job D., Douce R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1998, 95(13), 7805–7812.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7805>
93. Umbarger H.E., Umbarger M.A., Siu P.M. Biosynthesis of serine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1963, 85(6), 1431–1439.
<https://doi.org/10.1128/jb.85.6.1431-1439.1963>
94. Stauffer G.V. Regulation of serine, glycine, and one-carbon biosynthesis. *EcoSal Plus*, 2013, 1(3).
<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.2>
95. Grant G.A., Xu X.L., Hu Z. The relationship between effector binding and inhibition of activity in D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, 1999, 8(11), 2501–2505.
<https://doi.org/10.1110/ps.8.11.2501>
96. Kredich N.M. Biosynthesis of cysteine. *EcoSal Plus.*, 2008, 3(1).
<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.11>
97. Nakamori S., Kobayashi S.I., Kobayashi C., Takagi H. Overproduction of L-cysteine and L-cystine by *Escherichia coli* strains with a genetically altered serine acetyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(5), 1607–1611.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1607-1611.1998>
98. Fimmel A.L., Loughlin R.E. Isolation and characterization of *cysK* mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Gen.*

- Microbiol.*, 1977, 103(1), 37–43.
https://doi.org/10.1099/00221287-103-1-37
99. Nakamura T., Iwahashi H., Eguchi Y. Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1984, 158(3), 1122–1127.
https://doi.org/10.1128/jb.158.3.1122-1127.1984
 100. Wada M., Takagi H. Metabolic pathways and biotechnological production of L-cysteine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 73(1), 48–54.
https://doi.org/10.1007/s00253-006-0587-z
 101. Joo Y.C., Hyeon J.E., Han S.O. Metabolic design of *Corynebacterium glutamicum* for production of L-cysteine with consideration of sulfur-supplemented Animal Feed. *J. Agric. Food Chem.*, 2017, 65(23), 4698–4707.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01061
 102. Hryniewicz M., Sirko A., Pałucha A., Böck A., Hulanicka D. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.*, 1990, 172(6), 3358–3366.
https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3358-3366.1990
 103. Sirko A., Zatyka M., Sadowy E., Hulanicka D. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thio-sulfate-binding proteins. *J. Bacteriol.*, 1995, 177(14), 4134–4136.
https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4134-4136.1995
 104. Leyh T.S., Taylor J.C., Markham G.D. The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterization. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263(5), 2409–2416.
 105. Satishchandran C., Markham G.D. Mechanistic studies of *Escherichia coli* adenosine-5'-phosphosulfate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 378(2), 210–215.
https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1841
 106. Krone F.A., Westphal G., Schwenn J.D. Characterisation of the gene *cysH* and of its product phospho-adenylylsulphate reductase from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet. MGG.*, 1991, 225(2), 314–319.
https://doi.org/10.1007/BF00269864
 107. Berendt U., Haverkamp T., Prior A., Schwenn J.D. Reaction mechanism of thioredoxin: 3'-phospho-adenylylsulfate reductase investigated by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 233(1), 347–356.
https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.347_1.x
 108. Siegel L.M., Davis P.S. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of enterobacteria. IV. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: subunit structure and dissociation into hemoprotein and flavoprotein components. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249(5), 1587–1598.
 109. Wu J.Y., Siegel L.M., Kredich N.M. High-level expression of *Escherichia coli* NADPH-sulfite reductase: requirement for a cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(1), 325–333.
https://doi.org/10.1128/jb.173.1.325-333.1991
 110. Sekowska A., Kung H.F., Danchin A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 2(2), 145–177.
 111. Guédon E., Martin-Verstraete I. Cysteine metabolism and its regulation in bacteria. In: Amino acid biosynthesis ~ pathways, Regulation and Metabolic Engineering [Ed. V.F. Wendisch]. Berlin: Springer, 2006, 5, 195–218.
 112. Morigasaki S., Umeyama A., Kawano Y., Aizawa Y., Ohtsu I. Defect of RNA pyrophosphohydrolase RppH enhances fermentative production of L-cysteine in *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2021, 66(6), 307–314.
https://doi.org/10.2323/jgam.2019.12.004
 113. Nakatani T., Ohtsu I., Nonaka G., Wiriyanawudhiwong N., Morigasaki S., Takagi H. Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories.*, 2012, 11:62.
https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-62
 114. Ray W.K., Zeng G., Potters M.B., Mansuri A.M., Larson T.J. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpe* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.*, 2000, 182(8), 2277–2284.
https://doi.org/10.1128/jb.182.8.2277-2284.2000
 115. Westley J. Rhodanese. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1973, 39, 327–368.
https://doi.org/10.1002/9780470122846.ch5
 116. Nandi D.L., Westley J. Reduced thioredoxin as a sulfur-acceptor substrate for rhodanese. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1998, 30(9), 973–977.
https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00050-8
 117. Kawano Y., Onishi F., Shiroyama M., Miura M., Tanaka N., Oshiro S., Nonaka G., Nakanishi T., Ohtsu I. Improved fermentative L-cysteine overproduction by enhancing a newly identified thiosulfate assimilation pathway in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101(18), 6879–6889.
https://doi.org/10.1007/s00253-017-8420-4
 118. Cheng H., Donahue J.L., Battle S.E., Ray W.K., Larson T.J. Biochemical and genetic characterization of PspE and GlpE, two single-domain sulfurtransferases of *Escherichia coli*. *Open Microbiol. J.*, 2008, 2, 18–28.
https://doi.org/10.2174/1874285800802010018
 119. Yu Q., Ran M., Xin Y., Liu H., Liu H., Xia Y., Xun L. The rhodanese PspE converts thiosulfate to cellular sulfane sulfur in *Escherichia coli*. *Antioxid Basel Switz.*, 2023, 12(5), 1127.
https://doi.org/10.3390/antiox12051127
 120. Tanaka N., Hatano T., Saito S., Wakabayashi Y., Abe T., Kawano Y., Ohtsu I. Generation of hydrogen sulfide from sulfur assimilation in *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2019, 65(5), 234–239.
https://doi.org/10.2323/jgam.2018.11.001
 121. Tanaka Y., Yoshikae K., Takeuchi A., Ichikawa M., Mori T., Uchino S., Sugano Y., Hakoshima T., Takagi H., Nonaka G., Tsukazaki T. Crystal structure of a YeeE/YedE family protein engaged in thiosulfate uptake. *Sci. Adv.*, 2020, 6(35), 7637.
https://doi.org/10.1126/sciadv.aba7637
 122. Kawano Y., Suzuki K., Ohtsu I. Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize L-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(19), 8203–8211.
https://doi.org/10.1007/s00253-018-9246-4
 123. Rückert C., Koch D.J., Rey D.A., Albersmeier A., Mormann S., Pühler A., Kalinowski J. Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *fpr2-cysIXHDNYZ* gene cluster involved in assimila-

- tory sulphate reduction. *BMC Genomics.*, 2005, 6, 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-121>
124. Rückert C., Milse J., Albersmeier A., Koch D.J., Pühler A., Kalinowski J. The dual transcriptional regulator CysR in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 controls a subset of genes of the McbR regulon in response to the availability of sulphide acceptor molecules. *BMC Genomics.*, 2008, 9, 483. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-483>
125. Jeong H., Kim Y., Lee H.S. OsnR is an autoregulatory negative transcription factor controlling redox-dependent stress responses in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Factories.*, 2021, 20(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01693-1>
126. Yang H.D., Jeong H., Kim Y., Lee H.S. The *cysS* gene (NCgl0127) of *Corynebacterium glutamicum* is required for sulfur assimilation and affects oxidative stress-responsive cysteine import. *Res. Microbiol.*, 2022, 173(8), 103983. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103983>
127. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(24), 13963–13966.
128. Schneider F., Molck S., Bathe B. Process for the fermentative preparation of sulphur-containing amino acids. Patent US9562245 B2, C12P 13/12, publ. 2017.
129. Wei L., Wang H., Xu N., Zhou W., Ju J., Liu J., Ma Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-cysteine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103(3), 1325–1338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9547-7>
130. Schirch V., Szebenyi D.M. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Curr. Opin Chem. Biol.*, 2005, 9(5), 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.08.017>
131. Katzen H.M., Buchanan J.M. Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine. 8. Repression-derepression, purification, and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 825–835.
132. Stauffer L.T., Fogarty S.J., Stauffer G.V. Characterization of the *Escherichia coli* *gcv* operon. *Gene.*, 1994, 142(1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90349-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90349-2)
133. Steiert P.S., Stauffer L.T., Stauffer G.V. The *lpd* gene product functions as the L-protein in the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J. Bacteriol.*, 1990, 172(10), 6142–6144. <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.6142-6144.1990>
134. Tang X.L., Du X.Y., Chen L.J., Liu Z.Q., Zheng Y.G. Enhanced production of L-methionine in engineered *Escherichia coli* with efficient supply of one carbon unit. *Biotechnol. Lett.*, 2020, 42(3), 429–436. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02786-z>
135. Shen Z.Y., Wang Y.F., Wang L.J., Wang Y., Liu Z.Q., Zheng Y.G. Thorough research and modification of one-carbon units cycle for improving L-methionine production in *Escherichia coli*. *3 Biotech.*, 2023, 13(6), 203. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03625-9>
136. Schweitzer J.E., Stolz M., Dieseld R., Etterich H., Eggeling L. The serine hydroxymethyltransferase gene *glyA* in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by GlyR. *J. Biotechnol.*, 2009, 139(3), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.12.008>
137. Zhang Y., Shang X., Lai S., Zhang Y., Hu Q., Chai X., Wang B., Liu S., Wen T. Reprogramming one-carbon metabolic pathways to decouple L-serine catabolism from cell growth in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth. Biol.*, 2018, 7(2), 635–646. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00373>
138. Sajed T., Marcu A., Ramirez M., Pon A., Guo A.C., Knox C., Wilson M., Grant J.R., Djoumbou Y., Wishart D.S. EC-MDB 2.0: A richer resource for understanding the biochemistry of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(1), 495–501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1060>
139. Agledal L., Niere M., Ziegler M. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox. Rep. Commun. Free Radic. Res.*, 2010, 15(1), 2–10. <https://doi.org/10.1179/174329210X12650506623122>
140. Li Y., Cong H., Liu B., Song J., Sun X., Zhang J., Yang Q. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 2016, 109(9), 1185–1197. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0719-0>
141. Liu B., Sun X., Liu Y., Yang M., Wang L., Li Y., Wang J. Increased NADPH supply enhances glycolysis metabolic flux and L-methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Foods.*, 2022, 11(7), 1031. <https://doi.org/10.3390/foods11071031>
142. Spaans S.K., Weusthuis R.A., van der Oost J., Kennen S.W.M. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front. Microbiol.*, 2015, 6, 742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00742>
143. Sauer U., Canonaco F., Heri S., Perrenoud A., Fischer E. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(8), 6613–6619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311657200>
144. Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol. Chem.*, 2000, 381(9–10), 899–910. <https://doi.org/10.1515/BC.2000.111>
145. Martínez I., Zhu J., Lin H., Bennett G.N., San K.Y. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metab. Eng.*, 2008, 10(6), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.09.001>
146. Cooper S. Utilization of D-methionine by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1966, 92(2), 328–332. <https://doi.org/10.1128/jb.92.2.328-332.1966>
147. Gál J., Szvetnik A., Schnell R., Kálmán M. The *metD* D-methionine transporter locus of *Escherichia coli* is an ABC transporter gene cluster. *J. Bacteriol.*, 2002, 184(17), 4930–4932. <https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4930-4932.2002>
148. Merlin C., Gardiner G., Durand S., Masters M. The *Escherichia coli* *metD* locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ). *J. Bacteriol.*, 2002, 184(19), 5513–5517. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5513-5517.2002>
149. Zhang Z., Feige J.N., Chang A.B., Anderson I.J., Brodianski V.M., Vitreschak A.G., Gelfand M.S., Saier M.H. A transporter of *Escherichia coli* specific for L- and D-methionine is the prototype for a new family within the ABC superfamily. *Arch. Microbiol.*, 2003, 180(2), 88–100. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0561-4>
150. Kadner R.J., Watson W.J. Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two

- uptake systems. *J. Bacteriol.*, 1974, 119(2), 401–409. <https://doi.org/10.1128/jb.119.2.401-409.1974>
151. Figge R., Dumon-Seignovet L. A microorganism for methionine production with enhanced methionine efflux. Patent Application WO2015028675 A1, C12N 1/00, publ. 2015.
 152. Майер Т., Винтерхальтер К., Пфайффер К. Клетка микроорганизма, плазмидный вектор, способ создания клетки микроорганизма и способ получения L-метионина. Патент RU2280687 C2, C12N 1/21, опубл. 2006.
 153. Liu Q., Liang Y., Zhang Y., Shang X., Liu S., Wen J., Wen T. YjeH is a novel exporter of L-methionine and branched-chain amino acids in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 81(22), 7753–7766. <https://doi.org/10.1128/AEM.02242-15>
 154. Бэ Д.Ё., Ким Х.А., Син Ё.У., Ким С.Ё., Ким С.К., На К.Х., Со Д.Х., Сон С.К., Ю Х.Р., Чой Д.Г. Микроорганизм для продуцирования О-ацетилгомосерина и способ получения О-ацетилгомосерина с использованием этого микроорганизма. Патент RU2710323 C2, C12N 1/20, опубл. 2019
 155. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Ziyatdinov M.H., Tokmakova I.L., Zakataeva N.P. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett.*, 2005, 579(21), 4629–4634. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.031>
 156. Таболина Е.А., Рыбак К.В., Хургес Е.М. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* – продуцент L-аминокислоты (варианты). Патент RU2215782 C2, C12N 1/21, опубл. 2003
 157. Yamazaki S., Ziyatdinov M.K., Nonaka G. Fermentative production of sulfur-containing amino acid with engineering putative L-cystathionine and L-cysteine uptake systems in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2020, 130(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.007>
 158. Trötschel C., Follmann M., Nettekoven J.A., Mohrbach T., Forrest L.R., Burkovski A., Marin K., Krämer R. Methionine uptake in *Corynebacterium glutamicum* by MetQNI and by MetPS, a novel methionine and alanine importer of the NSS neurotransmitter transporter family. *Biochemistry.*, 2008, 47(48), 12698–12709. <https://doi.org/10.1021/bi801206t>
 159. Trötschel C., Deutenberg D., Bathe B., Burkovski A., Krämer R. Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2005, 187(11), 3786–3794. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3786-3794.2005>
 160. Kennerknecht N., Sahm H., Yen M.R., Pátek M., Saier Jr M.H., Eggeling L. Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J. Bacteriol.*, 2002, 184(14), 3947–3956. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3947-3956.2002>
 161. Lange C., Mustafi N., Frunzke J., Kennerknecht N., Wessel M., Bott M., Wendisch V.F. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the *brnFE* operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids. *J. Biotechnol.*, 2012, 158(4), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.003>

Prospects for Obtaining L-Methionine Using Biotechnological Methods Based on *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. Part 1. Application, Methods of L-Methionine Production and Regulation of its Biosynthesis in Bacteria

V. A. Livshits^{a, #}, D. M. Bubnov^a, T. E. Shustikova^a, A. A. Khozov^a, T. E. Leonova^a, L. E. Ryabchenko^a,
T. V. Vybornaya^a, A. A. Stepanova^a, and A. S. Yanenko^a

^aNRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182, Russia

[#]e-mail: vlivshits40@yandex.ru

Abstract—In the first part of the review presented, the role of L-methionine in the vital activity of various organisms and its application are considered. The main methods of obtaining it are briefly presented. The pathways of biosynthesis of L-methionine and its precursors, as well as their regulation in industrially significant bacterial species *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* are described. The current information on the uptake and assimilation reduction of sulfate and thiosulfate in these bacteria as the most important elements of metabolism limiting the possibility of oversynthesis of L-methionine is presented. At the same time, some approaches used in the creation of effective producer strains for the production of L-methionine using biotechnological methods are mentioned.

Keywords: L-methionine, production, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, biosynthesis pathways, L-cysteine, sulfate, thiosulfate, reduction assimilation