

УДК 579.66

СИСТЕМНАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ *Corynebacterium glutamicum* ДЛЯ ПРОДУКЦИИ L-ВАЛИНА

© 2024 г. М. Е. Шереметьева¹, Т. М. Хлебодарова^{2, 3}, Д. Д. Дербиков¹,
В. В. Розанцева¹, Н. А. Колчанов^{2, 3}, А. С. Яненко¹

¹НИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, Москва, 123098 Россия

²ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

³Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: marshe@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.02.2023 г.

После доработки 06.05.2024 г.

Принята к публикации 10.06.2024 г.

Обзор посвящен основным подходам системной метаболической инженерии, применяемым при создании на основе *Corynebacterium glutamicum* продуцентов L-валина – незаменимой протеиногенной аминокислоты, которая широко используется в качестве кормовой добавки. Данное направление инженерии базируется на представлениях системной биологии, рассматривающих живой организм как целостную систему с комплексным взаимодействием между элементами. В обзоре рассмотрены: лабораторная эволюция как способ получения новых мутаций, повышающих продукцию L-валина; использование биосенсоров для отбора клонов с такими мутациями; “омические” данные, полученные для штаммов *C. glutamicum*, способных продуцировать L-валин и родственные аминокислоты; модификация генов, кодирующих глобальные регуляторные факторы; моделирование метаболических путей, имеющих отношение к продукции аминокислот у *C. glutamicum*, с использованием полногеномных данных. Каждому из подходов дана оценка с точки зрения эффективности его использования для повышения продуктивности штаммов и улучшения их технологических характеристик. Кроме того, представлена информация о современных методах редактирования генома *C. glutamicum*, без которых невозможно осуществление большого числа направленных модификаций, необходимых для реализации подходов системной метаболической инженерии.

Ключевые слова: *Corynebacterium glutamicum*, L-валин, метаболическая инженерия, редактирование генома, штамм-продуцент

DOI: 10.56304/S0234275824030025

Биотехнологические способы производства в последние десятилетия все шире используются в мировом хозяйстве для получения различных ценных соединений. Ключевой элемент промышленной биотехнологии – штаммы-продуценты, представляющие собой микроорганизмы, метаболизм которых изменен и перенаправлен, в первую очередь, на синтез целевого вещества. Один из наи-

более популярных базовых микроорганизмов для создания штаммов-продуцентов – неприхотливая бактерия *Corynebacterium glutamicum*, обладающая гибким хорошо изученным метаболизмом, стрессоустойчивостью и генетической стабильностью [1]. Неспособность к образованию спор и эндотоксинов [2] и отсутствие патогенности позволили отнести *C. glutamicum* к организмам со статусом GRAS (англ. Generally Recognized as Safe) [3], то есть данный микроорганизм был признан безопасным для человека и животных и разрешен для использования при получении веществ пищевого, кормового и медицинского назначения. Все это позволяет рассматривать *C. glutamicum* как идеальную “фабрику” для микробиологического синтеза.

С помощью *C. glutamicum* производят широкий спектр различных веществ, среди которых органические кислоты [4], полиамины и диами-

Список сокращений: АНАИР – ацетолактатредуктоизомераза; АНАС – ацетолактатсинтаза; ВСАА – аминокислоты с разветвленной боковой цепью; ВСАТ – трансаминаза ВСАА; DHAD – дегидратаза дигидроксикислот; PTS-система – фосфотрансферазная система транспорта глюкозы; МИ – метаболическая инженерия; НАДФ⁺/НАДФН – никотинамиддинуклеотидфосфат окисленный/восстановленный; ПФП – пентозофосфатный восстановительный путь; ТФ – транскрипционный фактор; ФЕП – фосфоенолпируват; Ф-, Ф – фосфат; ЦТК – цикл трикарбонных кислот; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат.

ны [5, 6], спирты [1], полифенолы [7], каротиноиды [8] и рекомбинантные белки [9]. Список соединений, продукцию которых могут осуществлять коринебактерии, увеличивается с каждым годом. Однако основной сферой применения *C. glutamicum*, начиная с открытия вида в 1956 году [10] и до сих пор, остается производство аминокислот и их производных [11].

Как и в случае других базовых микроорганизмов, первые штаммы *C. glutamicum*, способные продуцировать целевое вещество, были получены при помощи ненаправленного мутагенеза, с последующим фенотипическим отбором мутантов с нужными свойствами. Создание и совершенствование продуцентов ускорилось с появлением генно-инженерного инструментария для *C. glutamicum*, а также с расшифровкой полных последовательностей геномов штаммов этого микроорганизма и с утверждением в исследовательской практике методов рациональной метаболической инженерии (МИ) [12]. Рациональная МИ предполагает, что модификации подвергаются гены с хорошо известными метаболическими функциями, что ведет к направленному изменению реакций, происходящих в клетках, а именно, к усилению образования целевого продукта и минимизации образования продуктов побочных.

В целом, этот подход себя оправдал, однако в последние годы, видимо, достиг пределов применимости. Недостаток фундаментальных знаний о внутриклеточных процессах, особенно об их регуляции, привел к вырождению рациональной МИ в “метод проб и ошибок”, когда ожидаемый результат генетических модификаций зачастую не совпадает с реальным и/или не воспроизводится в других экспериментах и на других штаммах. Надежду на преодоление кризиса дает все более широкое внедрение в практику системной МИ, то есть МИ, основанной на использовании методов системной и синтетической биологии, а также эволюционно-инженерных подходов [13]. Системная биология рассматривает организм как единое целое, а не набор отдельных элементов, соединяя биологические методы исследования с теорией систем. В свою очередь, синтетическая биология сосредоточена на создании новых систем с заданными свойствами. Предполагается, что такой междисциплинарный подход позволит повысить вероятность получения запланированных результатов и их воспроизводимость [14, 15].

Данный обзор представляет собой продолжение опубликованного нами ранее обзора “Рациональная метаболическая инженерия *C. glutamicum* для продукции L-валина” [16].

Как известно, к группе аминокислот с разветвленной боковой цепью (ВСАА, англ. branched-

chain amino acid) относятся валин, а также L-лейцин и L-изолейцин (далее – лейцин, изолейцин).

Биосинтез валина у *C. glutamicum* состоит из 4 последовательных реакций (рис. 1):

1) конденсация двух молекул пирувата, катализируемая ацетоллактатсинтазой АНАS (продукт генов *ilvBN*), с образованием 2-ацетоллактата;

2) НАДФН-зависимое превращение 2-ацетоллактата в 2,3-диоксиизовалерат, катализируемое ацетоллактатредуктоизомеразой АНАIR (продукт гена *ilvC*);

3) превращение 2,3-диоксиизовалерата в 2-оксоизовалерат, катализируемое дегидратазой дигидроксикислот ДНАD (продукт гена *ilvD*);

4) образование валина из 2-оксоизовалерата в реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой ВСАТ (продукт гена *ilvE*); при этом используется аминокетильная группа, отщепленная от глутамата, который, в свою очередь, получает ее в НАДФН-зависимой реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой (продукт гена *gdh*).

Таким образом, для синтеза 1 моля валина необходимо 2 моля пирувата и 2 моля НАДФН. Пируват образуется из фосфоенолпирувата (ФЕП) в гликолизе. Основным источником НАДФН у *C. glutamicum* – пентозофосфатный восстановительный путь (ПФП). Необходимо отметить, что те же самые ферменты, предшественник и кофактор участвуют в биосинтезе двух других ВСАА и D-пантотената.

Выброс валина из клеток осуществляется при помощи транспортера BrnFE, который также осуществляет транспорт других ВСАА и L-метионина. Гены *brnFE*, кодирующие транспортер, объединены в один оперон. Он регулируется транскрипционным фактором Lgr по принципу позитивной обратной связи: белок Lgr активируется при связывании с ВСАА, присутствующими в клетках, и, в свою очередь, активирует транскрипцию *brnFE*.

В предыдущем обзоре [16] нами были рассмотрены стратегии повышения продукции валина у *C. glutamicum* за счет модификации генов биосинтеза и транспорта валина, а также генов, ответственных за образование пирувата, НАДФН и побочных продуктов.

В настоящем обзоре речь пойдет о новых подходах к совершенствованию валин-продуцирующих штаммов *C. glutamicum* с использованием системной МИ, среди которых:

1) лабораторная эволюция, приводящая к отбору новых мутаций, повышающих продукцию целевого вещества;

2) применение биосенсоров для отбора мутаций, повышающих продукцию целевого вещества;

3) анализ “омических” данных, полученных для продуцентов целевого вещества и родственных соединений;

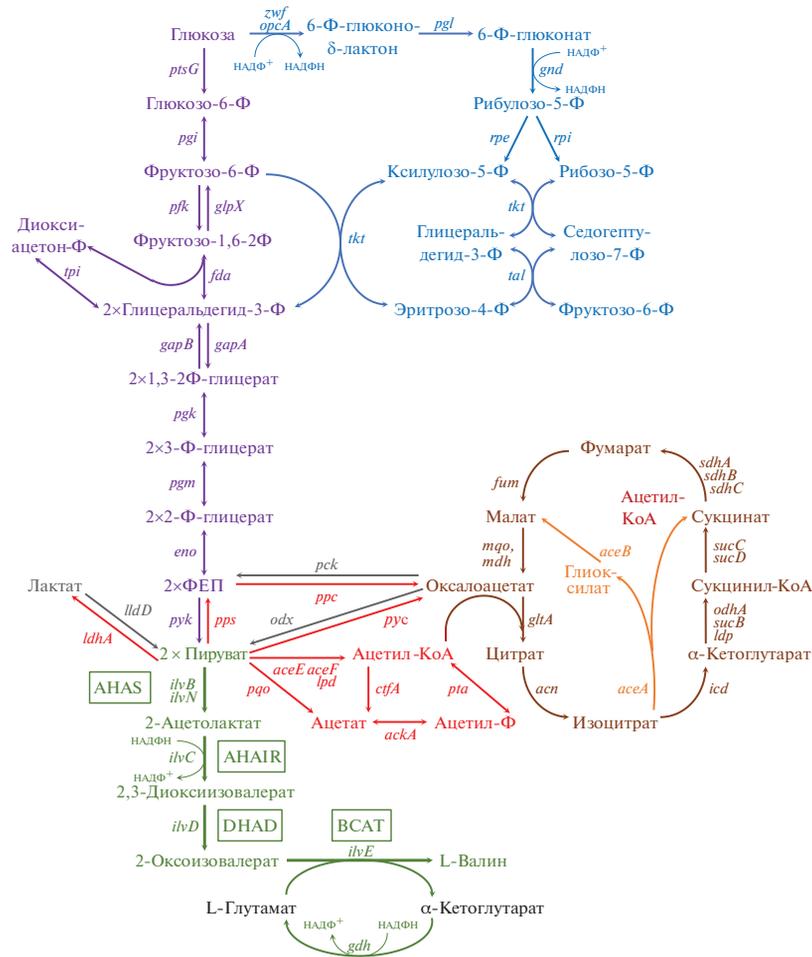


Рис. 1. Биосинтез валина у *C. glutamicum* и место данного процесса в метаболизме клеток. Зеленым цветом указан путь биосинтеза валина, фиолетовым – гликолиз (источник пирувата), голубым – ПФП (источник НАДФН), коричневым – ЦТК, оранжевым – глиоксилатный шунт, красным – реакции “нецелевого” расходования пирувата. Вместо ферментов указаны кодирующие их гены: *aceA* – изоцитратлиаза; *aceB* – малатсинтаза; *aceE, aceF, lpd* – субъединицы пируватдегидрогеназного комплекса; *ackA* – ацетаткиназа; *acn* – аконитаза; *ctfA* – бутират-ацетоацетат-КоА-трансфераза; *eno* – енoлаза; *fda* – фруктозо-бисфосфатальдoлаза; *fum* – фумараза; *gapA, gapB* – формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; *gdh* – глутаматдегидрогеназа; *icd* – изоцитратдегидрогеназа; *ilvB, ilvN* – субъединицы АНАС; *ilvC* – АНАИР; *ilvD* – DHAD; *ilvE* – BCAT; *ldhA, lldD* – формы лактатдегидрогеназы; *mdh* – малатдегидрогеназа; *mgo* – малат:хиноноксидоредуктаза; *odhA, sucB, lpd* – субъединицы α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса; *odx* – оксалоацетатдекарбоксилаза; *pck* – ФЕП-карбоксиказа; *pfk* – фосфофруктокиназа; *pgi* – глюкозо-6-фосфатизомераза; *pgk* – фосфоглицераткиназа; *pgl* – 6-фосфоглюконолактоназа; *pgm* – фосфоглицератмутаз; *ppc* – ФЕП-карбоксиказа; *pps* – ФЕП-синтаза; *pqo* – пируват:хиноноксидоредуктаза; *pta* – фосфотрансацетилаза; *ptsG* – глюкозоспецифическая мембранная пермеаза; *puc* – пируват-карбоксиказа; *rpe* – рибулозо-5-фосфатэпимераза; *rpi* – рибулозо-5-фосфатизомераза; *sdhA, sdhB, sdhC* – субъединицы сукцинатдегидрогеназы; *sucC, sucD* – субъединицы сукцинил-КоА-синтетазы; *tal* – трансальдолаза; *tkt* – транскетолаза; *tpi* – триозофосфатизомераза; *zwf, opcA* – субъединицы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Fig. 1. Valine biosynthesis in *C. glutamicum* and the place of this process in cell metabolism. Green color indicates the pathway of valine biosynthesis, purple – glycolysis (source of pyruvate), blue – PPP (source of NADPH), brown – TCA cycle, orange – glyoxylate shunt, red – reactions of “off-target” consumption of pyruvate. The genes encoding them are indicated instead of the enzymes: *aceA* – isocitrate lyase; *aceB* – malate synthase; *aceE, aceF, lpd* – subunits of the pyruvate dehydrogenase complex; *ackA* – acetate kinase; *acn* – aconitase; *ctfA* – butyrate acetoacetate CoA-transferase; *eno* – enolase; *fda* – fructose biphosphate aldolase; *fum* – fumarase; *gapA, gapB* – forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *gdh* – glutamate dehydrogenase; *icd* – isocitrate dehydrogenase; *ilvB, ilvN* – ANAS subunits; *ilvC* – ANAIR; *ilvD* – DHAD; *ilvE* – BCAT; *ldhA, lldD* – forms of lactate dehydrogenase; *mdh* – malate dehydrogenase; *mgo* – malate:quinone oxidoreductase; *odhA, sucB, lpd* – subunits of α -ketoglutarate dehydrogenase complex; *odx* – oxaloacetate decarboxylase; *pck* – PEP carboxylase; *pfk* – phosphofruktokinase; *pgi* – glucose-6-phosphatase; *pgk* – phosphoglycerate kinase; *pgl* – 6-phosphogluconolactonase; *pgm* – phosphoglycerate mutase; *ppc* – PEP carboxylase; *pps* – PEP synthase; *pqo* – pyruvate:quinone oxidoreductase; *pta* – phosphotransacetylase; *ptsG* – glucose-specific membrane permease; *puc* – pyruvate carboxylase; *rpe* – ribulose-5-phosphate epimerase; *rpi* – ribose-5-phosphatase; *sdhA, sdhB, sdhC* – subunits of succinate dehydrogenase; *sucC, sucD* – succinyl-CoA synthetase subunits; *tal* – transaldolase; *tkt* – transketolase; *tpi* – triosephosphate isomerase; *zwf, opcA* – glucose-6-phosphate dehydrogenase subunits.

4) модификация генов, кодирующих глобальные регуляторные факторы;

5) моделирование метаболических путей с целью выявления новых мишеней для направленной модификации.

Кроме того, будут подробно описаны современные методы редактирования генома *C. glutamicum*, высокая эффективность которых — обязательное условие для реализации подходов системной МИ, требующих быстрой модификации большого числа генов.

C. glutamicum как платформа для создания штаммов-продуцентов

C. glutamicum — это хорошо изученные неподвижные палочковидные грамположительные бактерии. Характерная особенность морфологии всех представителей *Corynebacterineae* — многослойная и многофункциональная клеточная стенка (рис. 2). Она включает: 1) цитоплазматическую мембрану (диффузный барьер клетки); 2) оболочку из трех ковалентно связанных слоев — пептидогликанового, арабиногалактанового и внутреннего слоя миколатной мембраны (“экзоскелет”, поддерживающий форму клетки и обеспечивающий постоянство осмотического давления); 3) внешний слой миколатной мембраны (вместе с внутренним слоем образующий еще один диффузный барьер); 4) защитный наружный слой, состоящий из глюкана — полисахарида на основе мономеров глюкозы [17, 18].

По типу получения энергии бактерии *C. glutamicum* относятся к факультативным анаэробам: при недостатке кислорода клетки переключаются с дыхания на брожение. В таких условиях рост культур замедляется или останавливается, однако автолиза не происходит, а продукция целевых веществ продолжается [19].

Бактерии *C. glutamicum* способны к быстрому росту до высокой плотности [20] и не слишком требовательны к составу сред и другим условиям культивирования [21]. Среди природных источников углерода, которые может утилизировать этот микроорганизм — органические кислоты, в том числе ароматические, сахара и спирты [22, 23]. Генетическая модификация, включая введение гетерологичных генов, позволила создать штаммы, способные расти на крахмале, целлюлозе, ксилане, хитозане и других субстратах [24]. Важное свойство *C. glutamicum*, повышающее эффективность выращивания штаммов на сложных средах — отсутствие катаболитной репрессии, т.е. способность к одновременной утилизации различных веществ, например, глицерина или арабинозы вместе с глюкозой [25].

C. glutamicum обладает устойчивостью к высоким концентрациям в среде источников углерода, продуктов биосинтеза, например, органических

кислот [26] и аминокислот [27], и ингибиторов ферментов (фуранов и фенолов) [28].

Геном *C. glutamicum* представлен одной кольцевой хромосомой размером около 3 млн. пар нуклеотидов, с умеренно высоким GC-составом. Полногеномное секвенирование впервые было осуществлено для штамма ATCC 13032 [29, 30]. В настоящее время в базе данных NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>] представлены полные проаннотированные нуклеотидные последовательности геномов 29 штаммов этой бактерии. Ее геном более стабилен, чем у ряда других биотехнологически значимых микроорганизмов. По-видимому, это объясняется отсутствием у *C. glutamicum* системы, подобной системе рекомбинации *recBC*, отвечающей за геномные перестройки, например, у *E. coli* [31].

Безопасность *C. glutamicum* в сочетании с генетической стабильностью, пластичным метаболизмом и устойчивостью к высоким концентрациям потенциально токсичных веществ делают этот микроорганизм идеальной платформой для разработки на его основе штаммов-продуцентов [32]. Однако получение современных высокопродуктивных штаммов невозможно без комплексной направленной модификации генома родительских штаммов. При решении данной задачи достоинства *C. glutamicum* превращаются в недостатки: плотная стенка затрудняет проникновение в клетки чужеродного генетического материала, необходимого для внесения изменений в материале собственном, а низкая частота гомологичной рекомбинации затрудняет встраивание этого материала в геном [33]. Тем не менее в последние годы в деле создания эффективных методов модификации (редактирования) генома *C. glutamicum* достигнут значительный прогресс.

Методы редактирования генома *C. glutamicum*

Традиционные методы получения штаммов-продуцентов *C. glutamicum* предполагают неспецифичный мутагенез с последующей селекцией интересующих мутантов. Для неспецифического мутагенеза обычно используют обработку N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином или гидроксиламином, ультрафиолетовое излучение [34]. Недавно было обнаружено, что холодная плазма является эффективным генератором случайных мутаций в геноме *C. glutamicum* [35].

Подходы рациональной МИ предполагают направленное введение нужных модификаций. Обычно используется метод обмена локусами с участием интегративного плазмидного вектора. Его отличительная особенность — отсутствие репликона, обеспечивающего автономное существование вектора в клетках *C. glutamicum* [36, 37]. Наблюдение такого вектора у *C. glutamicum* наблю-

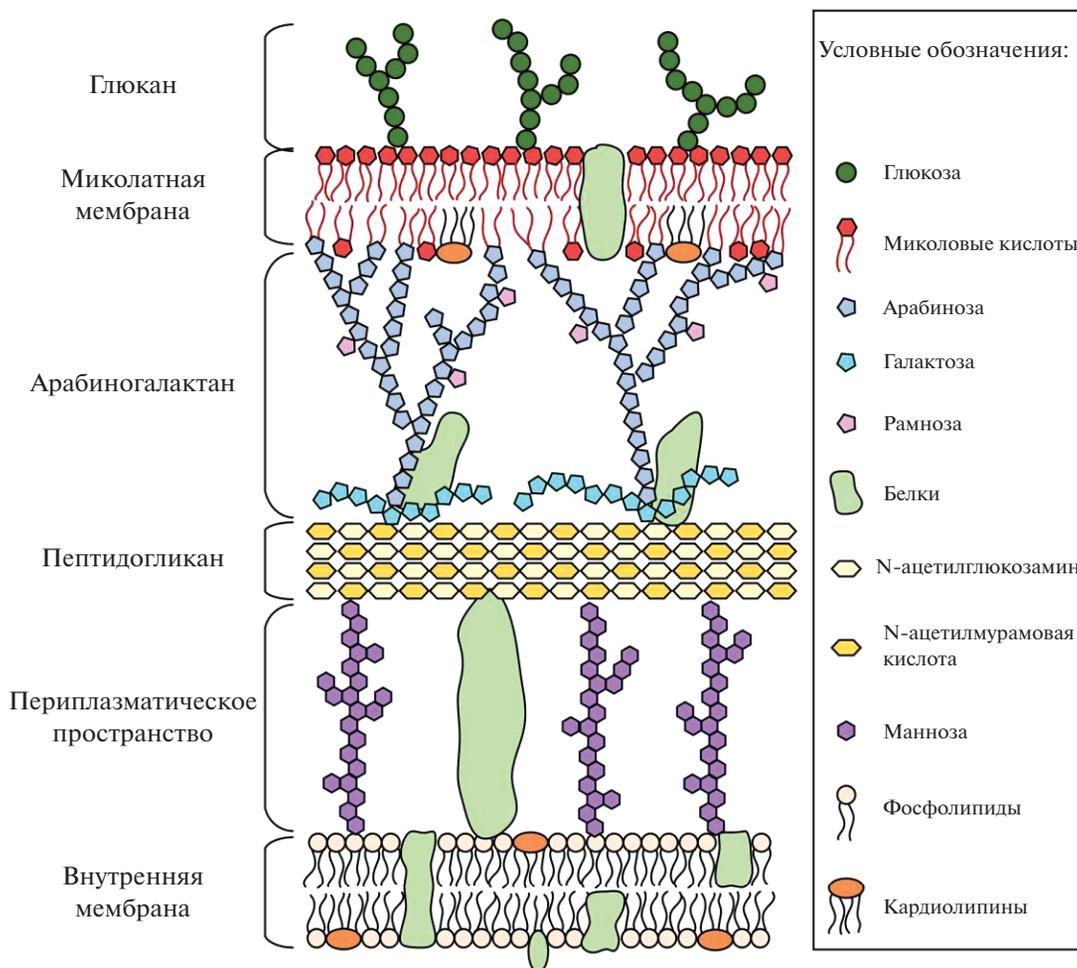


Рис. 2. Строение клеточной стенки *C. glutamicum*. Клеточная стенка состоит из нескольких слоев: внутренней мембраны (фосфолипиды, кардиолипиды и белки), слоя пептидогликана (N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота), сшитого со слоем арабиногалактана (арабиноза, галактоза, рамноза), миколатной мембраны (миколовые кислоты) и внешнего глюканового слоя.

Fig. 2. Structure of the cell wall of *C. glutamicum*. The cell wall consists of several layers: the inner membrane (phospholipids, cardiolipins and proteins), a peptidoglycan layer (N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid) cross-linked with a layer of arabinogalactan (arabinose, galactose, rhamnose), a mycolate membrane (mycolic acids) and the outer glucan layer.

дается только в случае его интеграции в хромосому хозяина благодаря рекомбинации между участком ДНК (“плечом рекомбинации”), клонированным на векторе, и гомологичным участком геномной ДНК (рис. 3).

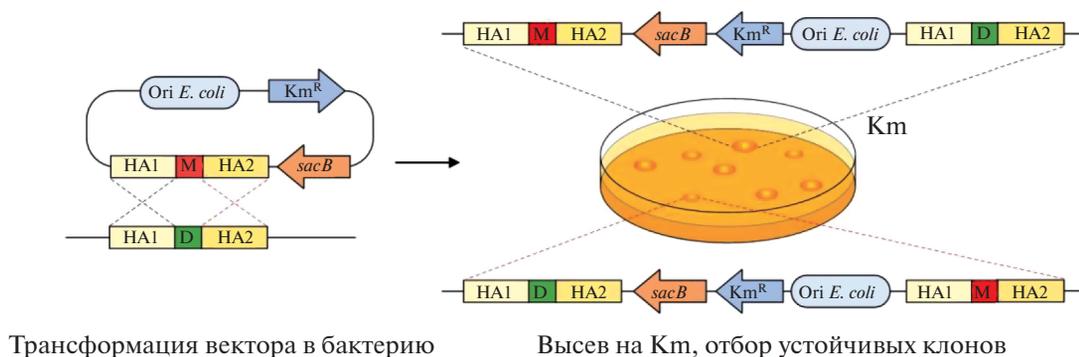
По маркерам прямого отбора, обычно по устойчивости к антибиотику, проводят селекцию клонов, несущих интегрированный вектор, в который должен входить и маркер обратного отбора. Маркер обратного отбора позволяет отследить удаление плазмидной части вектора из хромосомы и замену гена дикого типа на мутантный аллель [38].

Эффективность рекомбинации в коринебактериях невелика и может быть повышена за счет введения фаговых систем сайт-специфической рекомбинации, таких как *recET* [39–41], *Cre/lox* [42, 43] и *Int/Xis* [44]. Подобные методы получили

название “рекомбиниринг” и потенциально могут быть использованы для масштабных реорганизаций генома коринебактерий. ДНК для рекомбинации может поступать в клетки в виде одно- или двуцепочечных линейных молекул или в составе интегративных плазмид. Функция фаговых систем рекомбинации состоит в увеличении частоты рекомбинации между гомологичными участками, расположенными на поступающей извне ДНК и на хромосоме бактерии.

В последние годы для *C. glutamicum* активно применяют новую, революционную технологию редактирования генома, основанную на системе CRISPR/Cas (англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Proteins). CRISPR/Cas-систему впервые открыли у прокариот [45]. Было показано, что она

1 этап рекомбинации:



2 этап рекомбинации:

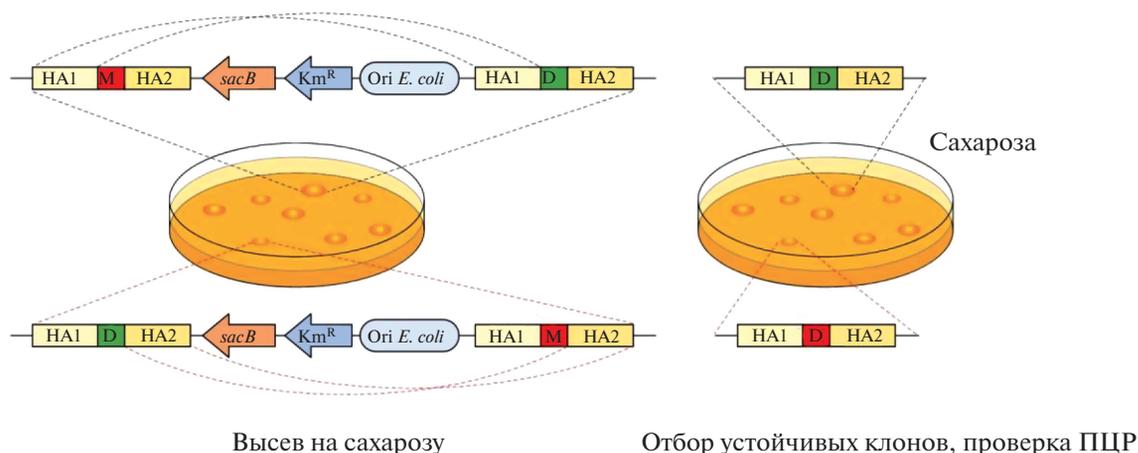


Рис. 3. Редактирование генома *C. glutamicum* с помощью интегративных суицидных векторов. На 1-м этапе в результате рекомбинации плазмидный вектор встраивается в хромосому клетки. На 2-м этапе плазмидный вектор выщепляется из хромосомы. Обозначения: Ori *E. coli* – точка начала репликации в *E. coli*; Km^R – ген устойчивости к канамицину; HA1, HA2 – области ДНК, по которым идет рекомбинация; D – изменяемая область ДНК дикого типа; M – изменяемая область ДНК мутантного типа; *sacB* – ген левансахаразы, приводящий к неспособности *C. glutamicum* расти в присутствии сахарозы.

Fig. 3. Genome editing of *C. glutamicum* using integrative suicide vectors. In step 1, the plasmid vector is inserted into the cell chromosome as a result of recombination. In the 2nd step, the plasmid vector is cleaved from the chromosome. Notations: Ori *E. coli* – replication origin in *E. coli*; Km^R – a kanamycin resistance gene; HA1, HA2 – recombination sites; D – a wild-type DNA variable region; M – a mutant DNA variable region; *sacB* – a levansaccharase gene resulting in the inability of *C. glutamicum* to grow in the presence of sucrose.

выполняет функцию адаптивного иммунитета, защищая клетки от бактериофагов, ранее заражавших предшественник соответствующего штамма [46]. В общем виде методика редактирования генома *C. glutamicum* состоит в трансформации клеток плазмидным вектором, несущим компоненты системы CRISPR/Cas, а также участок ДНК с желаемой мутацией и областью гомологии с изменяемым локусом (рис. 4). Гид-РНК связывается с белком Cas и направляет его к редактируемому локусу. При редактировании генома коринебактерий системы CRISPR/Cas в первую очередь, выполня-

ют роль контрселективного агента, снижая число колоний, в которых рекомбинация не произошла.

Описано большое число различных систем CRISPR/Cas, применяемых для редактирования генома различных организмов. В случае *C. glutamicum* используют системы CRISPR/Cas9 [47] и CRISPR/Cas12a [48].

Система CRISPR/Cas9 основана на белке Cas9, выделенном из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). Особенностью этого фермента является узнава-

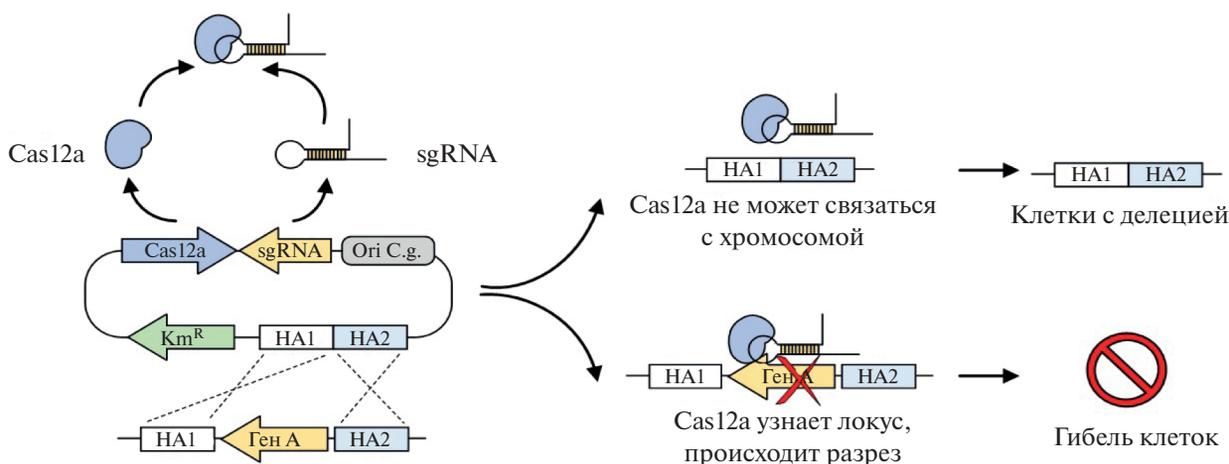


Рис. 4. Редактирование генома бактерий с помощью системы CRISPR/Cas на примере введения делеции с помощью Cas12a. Обозначения: Ori C.g. — точка начала репликации в *C. glutamicum*; Km^R — ген устойчивости к канамицину; HA1, HA2 — области ДНК, по которым идет рекомбинация; Cas12a — ген белка Cas12a; sgRNA — гид-РНК; ген А — ген, который необходимо удалить из хромосомы. Плазмидный вектор несет ген Cas12a и гид-РНК, а также участки ДНК, по которым пройдет рекомбинация. В результате рекомбинации появляются клетки, утратившие часть ДНК. Комплекс Cas12a и гид-РНК находит клетки с неотредактированной ДНК и вносит в нее разрез, приводящий к гибели клеток. Отредактированные ДНК не разрезаются, поскольку в них нет области узнавания для гид-РНК, и клетки не погибают.

Fig. 4. Bacterial genome editing by CRISPR/Cas system using Cas12a as an example of deletion introduction. Notations: Ori C.g. — replication origin in *C. glutamicum*; Km^R — a kanamycin resistance gene; HA1, HA2 — recombination sites; Cas12a — the Cas12a protein gene; sgRNA — guide-RNA; gene A — the gene to be deleted from the chromosome. The plasmid vector carries the Cas12a gene and guide-RNA, as well as the DNA regions over which recombination will take place. The recombination results in cells that have lost some of their DNA. The Cas12a and guide-RNA complex finds cells with unedited DNA and makes the cut, leading to cell death. The edited DNA is not cut because there is no recognition region for hyd-RNA in it, and the cells do not die.

ние PAM-сайта (англ. Protospacer Adjacent Motif) 5'-NGG-3' и создание двуцепочечных разрезов с тупыми концами [49]. Первые попытки редактирования с помощью этого белка не были успешными [50]. Исследователи отмечали его токсичность в клетках коринебактерий даже в отсутствие направляющей гид-РНК. Однако в дальнейшем другой группе удалось применить систему CRISPR/Cas9 для редактирования генома *C. glutamicum* с помощью оптимизированного Cas9 [47]. Снизить токсичность Cas9 помогло и использование индуцибельного промотора [51].

Другая широко используемая в коринебактериях система, CRISPR/Cas12a (иначе называемая CRISPR/Cpf1), основана на управляемой экзонуклеазе, выделенной из *Francisella novicida* (Fn-Cas12a) [51]. В отличие от SpCas9, FnCas12a делает двуцепочечный разрез по сайту PAM 5'-TTTV-3' с образованием выступающих концов. Редактирование данной системой было представлено в работе [48], где с помощью добавления белка геСТ удалось показать возможность внесения делеций, инсерций и точечных замен в хромосому *C. glutamicum*. Работы по улучшению подобных систем продолжаются.

Отдельное направление развития технологии CRISPR/Cas — CRISPR-интерференция (англ. CRISPR interference, CRISPRi) как способ управления экспрессией генов-мишеней. Метод осно-

ван на использовании dCas (deadCas), в который внесены мутации, приводящие к выключению нуклеазной активности. В то же время способность направляться к определенному месту в геноме *C. glutamicum* этот фермент сохраняет. При нацеливании на промоторную область или начало гена за счет стерического связывания с ДНК белок Cas получает возможность ингибировать транскрипцию исследуемых генов. Так можно изучать регуляцию тех генов, которые не могут быть инактивированы другими методами. Для Cas9 обычно применяются мутации D10A и H840A, для Cas12a — D917A и E1006 [52]. Эти мутации затрагивают нуклеазный домен белка Cas, поэтому при их внесении в соответствующий ген исчезает способность белка делать разрез ДНК.

Первоначально CRISPRi применяли для подавления отдельных генов. Так, в работе [53] с помощью методики CRISPRi удалось снизить уровень транскрипции генов *pgi* и *ppc* на 98 и 97% соответственно, в свою очередь, повысило выход лизина и глутамата. Позднее была продемонстрирована одновременная репрессия нескольких генов в сочетании с другими описанными методами. Например, в работе [54] одни гены делетировали с помощью интегративных векторов, другие — активировали путем экспрессии их на плаزمиде, третьи — репрессировали посредством CRISPRi.

Благодаря этому удалось повысить продукцию цистеина в 3.7 раз, а продукцию серина в 2.5 раза.

“Валиновые” биосенсоры и лабораторная эволюция

Один из подходов системной МИ, интерес к которому растет в последние годы – лабораторная эволюция [55]. Этот подход заключается в отборе из растущих микробиологических культур клонов с нужным фенотипом, что позволяет улучшать функции как отдельных ферментов [56], так и целых метаболических путей [57, 58]. Лабораторная эволюция позволяет тонко настраивать метаболическую сеть микроорганизмов на производство необходимых веществ, однако при осуществлении данного подхода возникает проблема выявления интересующих мутантов. Необходимыми характеристиками обладает лишь малое число клонов, и нужно каким-то образом найти их в популяции микроорганизмов и выделить оттуда. В этом могут помочь биосенсоры и методы высокопроизводительного скрининга.

Биосенсоры – это биоселективные датчики для сбора информации о биологическом образце. Они представляют собой прекрасный инструмент для изучения влияния различных мутаций на биосинтез целевых продуктов и могут использоваться при высокоразрешающем скрининге мутантов с повышенным уровнем синтеза различных соединений [59] или для лабораторной эволюции будущего штамма-производителя той или иной аминокислоты [60].

Перспективный способ отбора новых мутаций, повышающих выход валина в клетках *C. glutamicum* – использование биосенсора, реагирующего на повышенные внутриклеточные концентрации ВСАА и метионина [61]. Такой биосенсор основан на транскрипционном регуляторе Lgr, активирующем экспрессию оперона *brnFE*. Как было сказано выше, в бактериях *C. glutamicum* оперон *brnFE* кодирует систему экспорта ВСАА и метионина. При накоплении ВСАА и метионина регулятор Lgr активируется, “включая” промотор оперона *brnFE*, и экспорт этих аминокислот усиливается.

Сенсор состоит из транскрипционного регулятора *lrg*, а также промотора оперона *brnFE*, под контролем которого клонирован ген желтого флуоресцентного белка *eyfp* (рис. 5). В отсутствие валина внутри клетки транскрипционный регулятор Lgr не активирует промотор P_{brnFE} и флуоресценции не наблюдается. При накоплении валина Lgr получает возможность активировать промотор P_{brnFE} , при этом флуоресценция тем выше, чем больше концентрация валина в клетке [61].

С помощью такого биосенсора отслеживали в режиме реального времени, как варьируют по продукции валина штаммы *C. glutamicum* с делецией гена *aceE*, кодирующего пируватдегидрогеназу [61].

Другим применением сенсора стал высокопроизводительный скрининг валин-продуцирующих мутантов после ненаправленного мутагенеза метилнитронитрозогуанидином. Удалось получить мутанты, способные синтезировать до 8 мМ валина, 2 мМ лейцина и 1 мМ изолейцина.

В другой статье [62] тот же сенсор использовали для наблюдения за продукцией аминокислот в отдельных клетках *C. glutamicum* с помощью микрофлюидных чипов. Оказалось, что во внешне однородной популяции продуктивность может значительно варьировать от клетки к клетке. Рост на сложных и богатых средах приводит к существенному изменению клеток, возникает фенотипическое расщепление популяции, результатом которого становится расщепление клеток по продуктивности даже в хорошо контролируемых условиях культивирования. Это исследование показывает, что “валиновый” биосенсор хорошо подходит для анализа продуктивности *C. glutamicum* по валину.

Существуют примеры применения биосенсора для отбора клонов, в которых повышенный уровень продукции сочетается с улучшенными ростовыми характеристиками [63, 64]. Используя последовательные сортировки клеток на клеточном сортере, авторы исследования [63] сумели в течение пяти шагов повысить продуктивность штамма по валину с 4 до 16 мМ, снизив при этом содержание побочного аланина в 3–4 раза и повысив скорость роста. В исследовании [64] лабораторную эволюцию комбинировали с рациональной МИ. Для *C. glutamicum*, несущего *Δppc* и *Δrus*, были найдены мутанты, способные к быстрому росту на глюкозе. Оказалось, что все они содержат мутации в гене *icd*, кодирующем изоцитратдегидрогеназу. Штамм с инактивированными генами *ppc* и *rus*, усиленной экспрессией генов биосинтеза валина и мутацией ICD^{G407S} оказался способен продуцировать до 8.9 г/л валина.

Следующий этап в разработке методов лабораторной эволюции – использование микрофлюидных технологий. Совсем недавно была создана система автоматизированного высокопроизводительного анализа одиночных клеток [65]. Ее применили для поиска мутантов *C. glutamicum*, продуцирующих глутамат. Клетки обрабатывали холодной плазмой, затем помещали в капли и культивировали в них. В общей сложности было отобрано 11 мутантов, увеличение продуктивности у которых составило от 8 до 25%.

Методы лабораторной эволюции позволяют решать многие проблемы метаболической инженерии более эффективно, чем традиционный направленный мутагенез. С развитием техники применимость этих методов будет только возрастать.

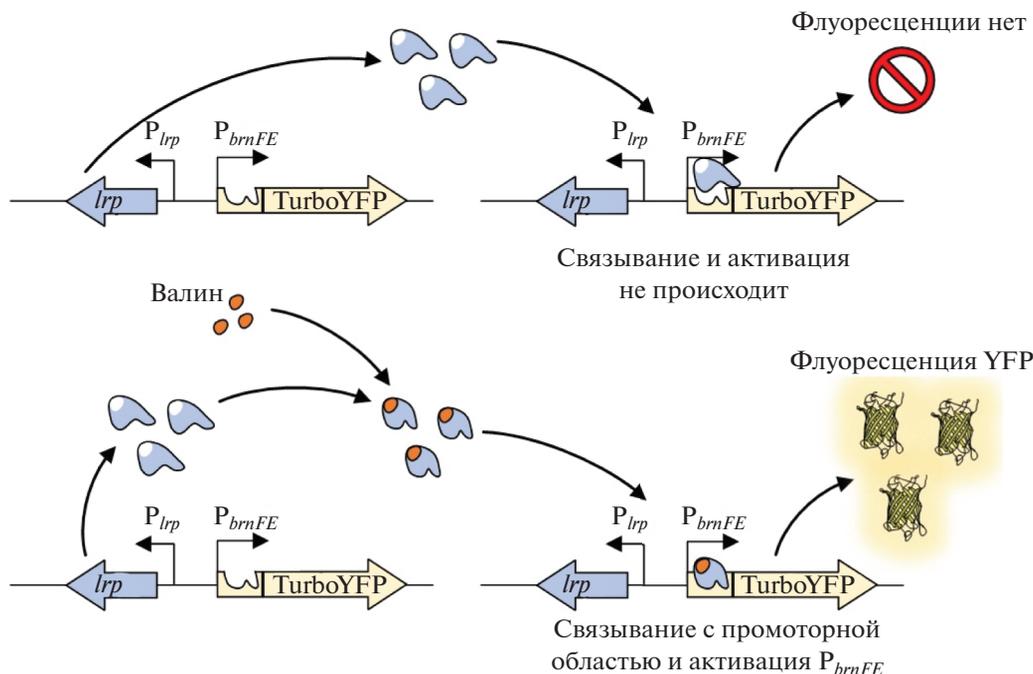


Рис. 5. Принцип работы “валинового” биосенсора на основе Lrp. TurboYFP – ген желтого флуоресцентного белка YFP; Lrp – ген транскрипционного регулятора Lrp; P_{brnFE}; P_{lrp} – промоторы генов brnFE и lrp.
Fig. 5. The principle of operation of the Lrp-based “valine” biosensor. TurboYFP – the gene of yellow fluorescent protein YFP; Lrp – the gene of transcriptional regulator Lrp; P_{brnFE}; P_{lrp} – promoters of the brnFE and lrp genes.

*Анализ “омических” данных
 для повышения продукции валина*

Один из основных инструментов в арсенале системной метаболической инженерии – использование результатов анализа массивов данных, полученных в “омических” исследованиях, то есть в исследованиях геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики и флюксомики базовых микроорганизмов и штаммов-продуцентов. Цель такого анализа – выявить взаимосвязь между генотипом и фенотипом посредством сравнения штаммов с различными свойствами. Это позволяет найти новые стратегии модификации генома, направленные на оптимизацию метаболических путей для повышения выхода целевого продукта и улучшения культивационных характеристик штаммов-продуцентов.

К настоящему времени опубликовано не так много работ по анализу генома, транскриптома и протеома линий *C. glutamicum*, полученных случайным мутагенезом с последующим отбором на продукцию валина и других ВСАА [66–68]. Однако эти работы представляют особый интерес с точки зрения изучения процесса формирования нового генотипа, обеспечивающего продукцию целевой аминокислоты, в данном случае – валина.

Одна из таких линий – валин-продуцирующий штамм VWB-1, полученный из *C. glutamicum* ATCC 13869. Согласно анализу транскриптома и

протеома, высокая продукция валина в этой линии в первую очередь обеспечивается мутациями, которые существенно увеличили экспрессию генов, кодирующих ферменты синтеза валина. Особенно это коснулось экспрессии гена *ilvN*, кодирующего регуляторную субъединицу фермента АНАС – экспрессия увеличилась более чем в 100 раз по сравнению со штаммом дикого типа [68]. Похожие результаты дал анализ генома другого валин-продуцирующего штамма, также полученного из *C. glutamicum* ATCC 13869: в регуляторной области оперона *ilvBN* была выявлена точечная мутация, перенос которой в другие штаммы привел к многократному увеличению экспрессии данных генов, активности АНАС и продукции валина [69].

Более высокое содержание НАДФН в клетках линии VWB-1, важное для реализации второго и последнего этапов биосинтеза валина, обусловлено активацией ПФП и связано с более высокой экспрессией генов *zwf*, *devB* и *gnd*. Перенаправлению потока углерода из гликолиза в ПФП также способствует сниженная примерно в 4 раза экспрессия гена *pgi* глюкозо-6-фосфатизмеразы. В то же время в линии VWB-1 снижена экспрессия генов *ldh* и *pqo*, кодирующих ферменты лактатдегидрогеназу и пируват:хиноноксидоредуктазу, которые используют пируват в качестве субстрата, и повышена экспрессия генов экспортера ВСАА *brnEF*, что способствует “сбережению” пирувата для синтеза

валина и увеличению экспорта валина, соответственно [68].

Следует отметить, что у линии VWB-1 повышена экспрессия глобального регулятора метаболизма сахаров SugR (также примерно в 4 раза), негативно влияющего на экспрессию генов фосфотрансферазной системы (PTS-системы), которая обеспечивает утилизацию глюкозы [70]. Возможно, в связи с этим клетки VWB-1 отставали от родительского штамма в росте. С другой стороны, негативное действие SugR на гены гликолиза способствует активации ПФП и увеличению доступности НАДФН для синтеза валина [71].

В целом, изменения в экспрессии генов, выявленные в штамме VWB-1 в сравнении с исходным, соответствуют модификациям, используемым для конструирования продуцентов валина на основе *C. glutamicum* [16] и затрагивают практически все регуляторные системы, важные для перенаправления углеродного потока на синтез НАДФН и самого валина, увеличения секреции валина из клетки, а также снижения синтеза из пирувата побочных продуктов (ацетата, лактата).

Сравнительный геномный анализ штаммов *C. glutamicum*, продуцирующих валин и лейцин и полученных из одного и того же родительского штамма (*C. glutamicum* ATCC 13032), показал, что в этих случаях также произошли изменения в структуре генома, которые способствовали продукции упомянутых аминокислот [66]. Были обнаружены мутации в генах ключевых ферментов синтеза валина и лейцина, *ilvBN* и *leuA*, приведшие к повышению активности соответствующих ферментов. В геноме штамма, продуцирующего лейцин, были обнаружены дополнительные копии генов *leuA*, *lrp* и *brnFE*, что должно способствовать повышению активности ключевого фермента синтеза лейцина и секреции лейцина из клетки. В геноме валин-продуцирующего штамма была выявлена вставка, которая сдвинула рамку считывания в гене *kgd* α -кетоглутаратдегидрогеназы, инактивировала фермент и блокировала активность цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Обе линии имеют мутации в генах *pgi* и *pfkA* ферментов гликолиза и мутации в генах ферментов, участвующих в синтезе органических кислот из пирувата (*ldh*, *Cgl0901*, *Cgl2752*, *aceE* и *aceF*). Эти мутации способствуют перераспределению потоков углерода из гликолиза в ПФП, увеличению доступности НАДФН и «сбережению» пирувата для синтеза ВСАА [66].

Анализ метаболома тех же самых штаммов также свидетельствует в пользу того, что эволюция линий *C. glutamicum* в направлении увеличения продуктивности шла по пути увеличения активности ключевых ферментов синтеза валина, доступности НАДФН и «сбережения» пирувата, а не увеличения синтеза последнего [67].

Таким образом, анализ «омик» позволяет определить геномный статус исследуемых штаммов и выявить их потенциал как по увеличению выхода целевого продукта, так и по способности к усвоению тех или иных субстратов. Этот подход, называемый «геномной селекцией», открывает дополнительные возможности для оптимизации метаболических путей продукции валина и других аминокислот в штаммах *C. glutamicum* дикого типа, не отягощенных сторонними мутациями с неизвестным эффектом, которые неизбежно отбираются при скрининге мутантов, полученных случайным мутагенезом.

Кроме того, анализ «омик» помогает обнаруживать новые гены, изменение экспрессии которых может благоприятно сказаться на свойствах штаммов-продуцентов. Таким способом, например, выявлен ген *Cgl2680* транскрипционного фактора AgaC-типа, играющего ключевую роль в регуляции доступности НАДФН для синтеза лейцина и лизина [72], и ген *Cgl2844* трансаминазы C, повышенная экспрессия которой способствовала продукции валина, а также снижению внутриклеточного уровня аланина и глутамата [73].

Управление регуляторными механизмами для повышения продукции валина

Выше упоминалось влияние факторов регуляции транскрипции (транскрипционных факторов, ТФ), в частности, SugR и Lrp, на продукцию валина, и их возможное участие в процессе создания продуцентов валина. У *C. glutamicum* ТФ Lrp является активатором и участвует в регуляции только оперона *brnFE*, кодирующего систему, ответственную за вывод ВСАА и метионина из клетки, и собственного гена *lrp* [74]. Учитывая это, при создании продуцентов валина наиболее рациональным подходом представляется обеспечение условий сверхэкспрессии гена *lrp*, влияние которой на выход валина рассмотрено в обзоре [16]. Здесь отметим только, что использование этого метода, действительно, способствовало созданию штаммов-продуцентов валина и изолейцина [75–77].

Данные, представленные в базе CoryneRegNet [78, 79], свидетельствуют о том, что напрямую в регуляции транскрипции генов ферментов биосинтеза валина участвуют ТФ GlxR, GntR и RamA. ТФ GlxR и GntR ингибируют экспрессию оперона *ilvBNC* и гена *gdh*, кодирующих ферменты, которые обеспечивают первый (*ilvBN*), второй (*ilvC*) и последний (*gdh*) этапы образования валина из пирувата. RamA активирует экспрессию гена последнего этапа *gdh* (рис. 6). Промотор оперона *ilvBNC* подвержен также негативной регуляции со стороны ВСАА через механизм аттенуации транскрипции, поэтому при создании большинства штаммов-продуцентов валина применяют сверх-

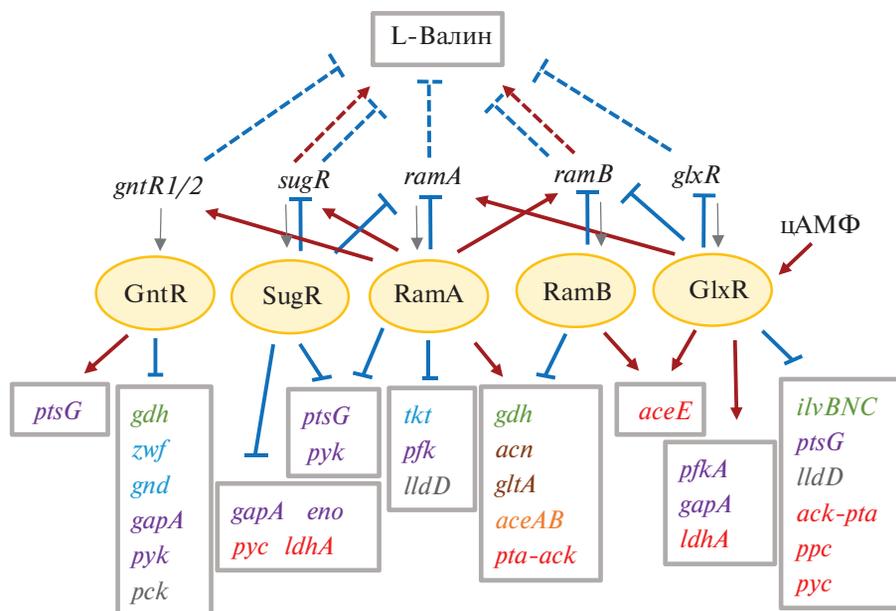


Рис. 6. ТФ GntR1/2, GlxR, SugR, RamA и RamB в регуляции транскрипции генов ферментов, связанных с продукцией валина. Обозначения: цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; прямое воздействие показано сплошными стрелками, непрямое – прерывистыми; красные сплошные стрелки – активация экспрессии гена, синие тупые – блокирование; цвета генов ферментов отображают участие генов в процессах в соответствии с цветами на рис. 2.

Fig. 6. TFs GntR1/2, GlxR, SugR, RamA and RamB participating in the regulation of transcription of genes of the enzymes related to valine production. Notations: cAMP – cyclic adenosine monophosphate; direct effect is shown by solid arrows, indirect – by dashed arrows; red solid arrows – activation of gene expression, blue blunt arrows – blocking; colors of enzyme genes represent the participation of genes in the processes according to the colors in Fig. 2.

экспрессию генов *ilvBNC* с использованием сильного конститутивного промотора [16], чем нивелируется негативное действие ТФ GlxR.

Другие эффекты, описанные для различных ТФ и имеющие отношение к продукции валина, касаются влияния ТФ на экспрессию генов, необходимых для поглощения глюкозы, роста клеток, увеличения доступности пирувата и НАДФН для биосинтеза валина (рис. 6).

GntR. В геноме *C. glutamicum* присутствуют гены *gntR1* (*cg2783*) и *gntR2* (*cg1935*), которые кодируют функционально взаимозаменяемые формы ТФ – GntR1 и GntR2, негативно влияющие на экспрессию генов ПФП *zwf*, *gnd* и *tkt* [80–82] и таким образом снижающие доступность НАДФН для синтеза валина. Аналогичное действие этот ТФ оказывает и на доступность пирувата, блокируя экспрессию генов ферментов гликолиза *gapA* и *pyk* и активируя экспрессию генов ферментов глюконеогенеза и ЦТК – *pckA*, *maeB*, *gapB* и *icd* [82, 83]. Однако инактивация обоих *gntR*-генов, хотя и увеличивала экспрессию генов ферментов ПФП, но существенно снижала скорость поглощения глюкозы и скорость роста культуры (на 60%), что связано с позитивным влиянием GntR1/2 на экспрессию генов PST-системы [80].

Предполагается, что одним из способов устранения этого противоречия может быть частичное

снижение эффективности связывания GntR1/2 с промоторами генов-мишеней, возможное в присутствии глюконата [80]. Для *C. glutamicum* это вполне реализуемо благодаря способности расти на глюкозе с добавлением глюконата в качестве второго источника углерода [84]. Именно такой подход был использован при создании синтетического промотора с низкой фоновой экспрессией на основе промотора гена *gntK* (ген фермента глюконаткиназы), содержащего сайты связывания ТФ GntR. Этот промотор, работающий как генетический тумблер, применили для контроля активности гена *aceE* пируватдегидрогеназы. Добавление глюконата в ростовую среду вело к динамическому переключению потока углерода с ЦТК на продукцию валина [85].

SugR. ТФ SugR – глобальный репрессор транскрипции у *C. glutamicum*, неоднозначно влияющий на доступность пирувата для синтеза валина. С одной стороны, SugR ингибирует экспрессию генов PTS-системы *ptsGHI*, *ptsF* и *ptsS* и генов гликолиза *pfkA*, *fba*, *gapA*, *eno* и *pyk*, снижая синтез пирувата. С другой – блокирует активность генов *pyc*, *ldhA* и *alr* [70, 71, 86, 87], что ведет к подавлению синтеза оксалоацетата, лактата и аланина из пирувата, благодаря чему последний “сберегается” для синтеза валина. Что касается доступности

НАДФН, то ее SugR снижает, блокируя экспрессию *tkt*-оперона, кодирующего ферменты ПФП.

GlxR. В отличие от SugR, ТФ GlxR не влияет на доступность НАДФН, но его действие на доступность пирувата также неоднозначно. С одной стороны, GlxR ингибирует экспрессию генов синтеза оксалоацетата из пирувата и ФЕП (*pps*, *pyc*) и генов синтеза ацетил-КоА из ацетата (*ack*, *pta*), а также активирует экспрессию генов гликолиза (*pfkA*, *gapA*) [78, 88, 89] — это ведет к повышению доступности пирувата для синтеза валина. С другой стороны, GlxR активирует экспрессию генов ферментов, использующих пируват в качестве субстрата (*ldhA*, *aceE*) [90] и блокирует экспрессию генов PTS-системы (*ptsGI*) и гена хинон-зависимой лактатдегидрогеназы, синтезирующей пируват из лактата (*lldD*) — при этом обеспеченность пируватом, наоборот, снижается.

На активность GlxR влияет цАМФ, концентрация которого в клетках при выращивании *C. glutamicum* на глюкозе выше, чем на ацетате [89, 91], и зависит от соотношения активностей аденилатциклазы СуаВ, синтезирующей цАМФ из АТФ [92], и цАМФ-фосфодиэстеразы СрдА, катализирующей превращение цАМФ в АМФ [93]. Ген цАМФ-фосфодиэстеразы позитивно контролируется ТФ GlxR, что создает негативную петлю в регуляции внутриклеточной концентрации цАМФ [93, 94] и свидетельствует о наличии у системы метаболизма цАМФ в клетках *C. glutamicum* потенциала к формированию сложной осциллирующей динамики [95, 96].

Несмотря на то, что GlxR контролирует доступность пирувата и ключевые ферменты биосинтеза валина и других ВСАА, прямых данных об использовании его модификаций при создании продуцентов ВСАА нет. Любые мутанты GlxR имели серьезные дефекты роста [91, 97, 98]. Однако в ходе адаптивной эволюции $\Delta aceE$ -штамма *C. glutamicum*, направленной на увеличение продукции валина, было обнаружено закрепление мутации *glxR*^{T93S}, которое сопровождалось снижением продукции аланина [60]. Поскольку аланинаминотрансферазы AlaT и AvtA не входят в регулон GlxR [78], предполагается, что этот эффект связан с глобальной реорганизацией регуляторных и метаболических сетей.

RamA и RamB. RamA функционирует как репрессор генов *ptsGH* PTS-системы, *tkt*-оперона ПФП, генов *pfk*, *pyk*, *lldD* ферментов синтеза пирувата [99] и как активатор экспрессии генов метаболизма ацетата (*pta-ack*) [100] и ЦТК (*aceA*, *aceB*, *gltA*, *acn*, *sucCD*, *sdhCAB*, *mgo* и *fumA*) [CoGu-netRegNet 6.0]. То есть, RamA негативно влияет на доступность НАДФН и пирувата для синтеза валина. В противоположность RamA, ТФ RamB действует как репрессор транскрипции генов *pta-ack*, *aceA-aceB*, *acn* и *gltA* [99, 101, 102]. Однако при

росте на средах, содержащих глюкозу, RamB активирует экспрессию гена *aceE* пируватдегидрогеназы [103], фермента синтеза ацетил-КоА из пирувата, что ведет к уменьшению количества последнего.

Прямых данных об использовании модификаций ТФ RamA и RamB при создании продуцентов ВСАА также не найдено. Однако делеции гена *ramA* использовали при разработке штаммов-продуцентов пирувата. Такие делеции снижали активность ЦТК, но увеличивали уровень лактата и ацетата. Штамм, содержащий дополнительно делеции генов ферментов синтеза лактата и метаболизма ацетата ($\Delta ldhA \Delta pgo \Delta cat \Delta pta-ackA$), продуцировал вдвое больше пирувата, чем родительский штамм [104], что предполагает возможность увеличения продукции ВСАА из пирувата за счет снижения экспрессии *ramA*.

В ходе адаптивной эволюции дикого штамма *C. glutamicum*, направленной на увеличение скорости роста, произошла потеря гена *gntR2* и закрепление мутации *gntR1*^{E70K} в ТФ GntR1 и *ramA*^{A52V} в RamA [105]. Эти мутации привели к активации гликолиза и ПФП и увеличению на 40% скорости роста клеток на глюкозе. Введение этих мутаций в лизин-продуцирующий штамм привело к увеличению титра лизина на 30% [105]. Нельзя исключить возможность позитивного эффекта этих мутаций и на продукцию других аминокислот.

В условиях, когда источником углерода служит глюкоза, гены *glxR*, *sugR*, *ramA* и *ramB* у *C. glutamicum* подвержены негативной регуляции со стороны собственных ТФ, а также сложной перекрестной регуляции [71, 99, 106–108]. Так, ТФ RamA активирует экспрессию гена *gntR1* и *ramB*, GlxR активирует *ramA* и ингибирует *ramB*, SugR ингибирует *ramA* [81, 100, 109, 110].

Информация о взаимной регуляции ТФ GntR, GlxR, SugR, RamA и RamB и их действии на гены ферментов, обеспечивающих доступность пирувата и НАДФН для биосинтеза валина и участвующих в самом биосинтезе, суммирована на рис. 6. Характерная черта взаимодействия между ТФ GlxR, SugR, RamA и RamB у *C. glutamicum* — сочетание позитивно-негативных связей. В молекулярно-генетических и метаболических системах, подверженных контролю по механизму обратной связи, часто проявляются сложные динамические режимы [95]. Так, если клеточные процессы зависят от негативной обратной связи, создаются условия для формирования периодической динамики [111–113]. Сочетание позитивно-негативных и двойных негативных связей способствует реализации сложных хаотических режимов [96, 114].

Система регуляции транскрипции генов с участием перечисленных ТФ, несомненно, имеет важное значение для контроля динамики метаболических процессов, направленных на продук-

цию аминокислот, включая валин, а модификации активности ТФ могут быть одним из путей дальнейшего совершенствования штаммов-производителей. Однако сложность этой системы, в сочетании с контролем экспрессии генов по механизму обратной связи, ведет к тому, что влияние отдельных модификаций ТФ на всю систему не всегда предсказуемо. Одна из возможностей повысить предсказуемость заключается в создании полногеномных моделей, позволяющих более точно оценить влияние изменений генома на динамику системы и выход конечного продукта. Подобные модели для *C. glutamicum* уже созданы [115–119]. Обогащение инструментария системной метаболической инженерии имитационным компьютерным моделированием может повысить эффективность разработки штаммов-производителей.

Моделирование метаболических путей C. glutamicum с использованием полногеномных данных

Развитие “омических” подходов привело к накоплению большого массива разноуровневых гетерогенных данных, анализ которых невозможен без разработки компьютерных платформ. Одна из возможностей использования таких данных для решения проблем биотехнологии заключается в реализации в рамках компьютерных платформ методов потокового математического моделирования молекулярно-генетических и метаболических систем [120, 121]. Подход, включающий интеграцию “омических” данных и построение соответствующей математической модели, позволяет *in silico* предсказывать генетические модификации, необходимые для увеличения скорости роста культуры, выхода целевого продукта при росте культуры в оптимальных условиях и в зависимости от различных субстратов [122, 123].

К настоящему времени создано и опубликовано более 1000 математических моделей метаболизма (см. обзор: [124]), которые реконструированы на основе полногеномных данных, в том числе для таких микроорганизмов как *E. coli* [125], *Clostridium acetobutylicum* [126] и *C. tyrobutyricum* [127], *Anaerotignum neopropionicum* [128], *Bacillus subtilis* [129], *Saccharomyces cerevisiae* [130] и *Chlamydomonas reinhardtii* [131]. Существуют разработки и для *C. glutamicum* [115–119], они успешно верифицированы на экспериментальных данных и использованы для анализа продукции глутамата [116, 118], изолейцина [116] и лизина [115, 117, 119].

С помощью полногеномной модели iCW773, разработанной для *C. glutamicum* ATCC 13032 [117], удалось выявить гены-мишени, модификации которых привели к созданию *de novo* продуцента L-пролина, который в периодической культуре на минимальной среде с подпиткой продуцировал 66.43 г/л целевого вещества за 60 ч (выход 0.26 г пролина на 1 г глюкозы), что превысило по-

казатели для известных ранее продуцентов этой аминокислоты. Данная модель, содержащая 773 гена, 950 метаболитов и 1207 реакций, обладает высокой предсказательной способностью и была успешно использована также для создания продуцентов гиалуроновой кислоты [132] и транс-4-гидрокси-L-пролина (компонент коллагена) [133], который применяется для синтеза противовоспалительных препаратов в фармацевтической промышленности.

Дальнейшее развитие полногеномного моделирования для *C. glutamicum* ATCC 13032 привело к созданию модели iCGB21FR [118], содержащей 805 генов, 1042 метаболита и 1539 реакций. Ее прогнозы о продукции всех биотехнологически значимых аминокислот, включая валин, в аэробных и анаэробных условиях выращивания культур согласуются с экспериментальными данными. Модель находится в свободном доступе в базе данных BioModels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/MODEL2102050001>) и может найти применение для создания контекст-специфических полногеномных моделей *C. glutamicum*. В таких случаях используются транскриптомные и протеомные данные, что ведет к более высокой предсказательной способности по сравнению с более простыми потоковыми моделями. Возможность исследования потенциала *C. glutamicum* для продукции валина с помощью контекст-специфических полногеномных моделей пока не реализована.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из наиболее популярных базовых микроорганизмов для создания на его основе продуцентов аминокислот является *C. glutamicum*. Ранее [16] нами были рассмотрены разные стратегии рациональной МИ для создания продуцентов валина на основе *C. glutamicum*, в том числе, за счет модификации генов биосинтеза и транспорта валина, а также генов, контролирующих синтез предшественника (пирувата), НАДФН и побочных продуктов. Методы рациональной МИ обеспечили быстрое создание штаммов – продуцентов валина, на основе которых было организовано промышленное производство этой аминокислоты для кормовых целей. Вместе с тем, учитывая высокую востребованность валина как кормовой добавки для животноводства, работы по дальнейшему повышению продуктивности штаммов сохраняют свою актуальность.

Анализ научной и патентной литературы свидетельствует о том, что дальнейший прогресс в этой области связан с использованием подходов системной МИ, в том числе, методов лабораторной эволюции, применения биосенсоров, модификации глобальных регуляторов, а также компьютерного моделирования с опорой на анализ “омических” данных. Перечисленные подходы уже привели к росту продуктивности штаммов, а

в будущем позволят значительно увеличить эффективность работы молекулярных машин микробного синтеза клеточных метаболитов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проекты № 075-15-2019-1659 и 075-15-2019-1662).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baritugo K.A., Kim H.T., David Y., Choi J.I., Hong S.H., Jeong K.J., Choi J.H., Joo J.C., Park S.J. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(9), 3915–3937. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8896-6>
2. Song Y., Matsumoto K., Yamada M., Gohda A., Brigham C.J., Sinskey A.J., Taguchi S. Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93(5), 1917–1925. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3718-0>
3. Becker J., Wittmann C. Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Metabolic Engineering: Concepts and Applications* [eds: J. Nielsen, G. Stephanopoulos, S.Y. Lee], USA, Hoboken, New Jersey, Publisher: John Wiley & Sons, 2021, 403–468. <https://doi.org/10.1002/9783527823468.ch12>
4. Wieschalka S., Blombach B., Bott M., Eikmanns B.J. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.*, 2012, 6(2), 87–102. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12013>
5. Schneider J., Wendisch V.F. Biotechnological production of polyamines by bacteria: recent achievements and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3252-0>
6. Wang L., Li G., Deng Y. Biosynthesis of diamines, research progress and application prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020, 86(23), e01972-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01972-20>
7. Wolf S., Becker J., Tsuge Y., Kawaguchi H., Kondo A., Marienhagen J., Bott M., Wendisch V.F., Wittmann C. Advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to produce high-value active ingredients for food, feed, human health, and well-being. *Essays Biochem.*, 2021, 65(2), 197–212. <https://doi.org/10.1042/EBC20200134>
8. Kogure T., Inui M. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(20), 8685–8705. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9289-6>
9. Liu X., Yang Y., Zhang W., Sun Y., Peng F., Jeffrey L., Harvey L., McNeil B., Bai Z. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium glutamicum*, progress, challenges and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2016, 36(4), 652–664. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1004519>
10. Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganism. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1957, 3, 193–205. <https://doi.org/10.2323/jgam.3.193>
11. Tsuge Y., Matsuzawa H. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2021, 37(3), 49. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03007-4>
12. Дебабов В.Г. Современные подходы к созданию промышленных штаммов микроорганизмов. *Генетика*, 2015, 51(4), 443–445.
13. Ko Y.S., Kim J.W., Lee J.A., Han T., Kim G.B., Park J.E., Lee S.Y. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production. *Chem. Soc. Rev.*, 2020, 49(14), 4615–4636. <https://doi.org/10.1039/d0cs00155d>
14. Liu J., Xu J.Z., Wang B., Rao Z.M., Zhang W.G. L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* based on systematic metabolic engineering: progress and prospects. *Amino Acids*, 2021, 53(9), 1301–1312. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03066-9>
15. Kim G.Y., Kim J., Park G., Kim H.J., Yang J., Seo S.W. Synthetic biology tools for engineering *Corynebacterium glutamicum*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2023, 21, 1955–1965. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.004>
16. Шереметьева М.Е., Ануфриев К.Э., Хлебодарова Т.М., Колчанов Н.А., Яненко А.С. Рациональная метаболическая инженерия *Corynebacterium glutamicum* для продукции L-валина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2022, 26(8), 743–757. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-90>
17. Puech V., Chami M., Lemassu A., Lanée M.A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffé M. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology (Reading)*, 2001, 147(Pt 5), 1365–1382. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1365>
18. Bayan N., Houssin C., Chami M., Leblon G. Mycomembrane and S-layer, two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.*, 2003, 104(1–3), 55–67. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00163-9)
19. Inui M., Murakami S., Okino S., Kawaguchi H., Vertès A.A., Yukawa H. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 7(4), 182–196. <https://doi.org/10.1159/000079827>
20. Hartbrich A., Schmitz G., Weuster-Botz D., de Graaf A.A., Wandrey C. Development and application of a membrane cyclone reactor for in vivo NMR spectroscopy

- with high microbial cell densities. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 51(6), 624–635.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960920\)51:6<624::AID-BIT2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960920)51:6<624::AID-BIT2>3.0.CO;2-J)
21. Wittmann C. Analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2010, 120, 21–49.
https://doi.org/10.1007/10_2009_58
 22. Gopinath V, Murali A., Dhar K.S., Nampoothiri K.M. *Corynebacterium glutamicum* as a potent biocatalyst for the bioconversion of pentose sugars to value-added products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93(1), 95–106.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3686-4>
 23. Mhatre A., Shinde S., Jha A.K., Rodriguez A., Wardak Z., Jansen A., Gladden J.M., George A., Davis R.W., Varman A.M. *Corynebacterium glutamicum* as an efficient omnivorous microbial host for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, 827386.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.827386>
 24. Wendisch V.F., Brito L.F., Gil Lopez M., Hennig G., Pfeifenschneider J., Sgobba E., Veldmann K.H. The flexible feedstock concept in Industrial Biotechnology: Metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources. *J. Biotechnol.*, 2016, 234, 139–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.022>
 25. Zahoor A., Lindner S.N., Wendisch V.F. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2012, 3, e201210004.
<https://doi.org/10.5936/cs bj.201210004>
 26. Buschke N., Schäfer R., Becker J., Wittmann C. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – optimization of substrate spectrum and process robustness by rational and evolutive strategies. *Bioresour. Technol.*, 2013, 135, 544–554.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.047>
 27. Stäbler N., Oikawa T., Bott M., Eggeling L. *Corynebacterium glutamicum* as a host for synthesis and export of D-amino acids. *J. Bacteriol.*, 2011, 193(7), 1702–1709.
<https://doi.org/10.1128/JB.01295-10>
 28. Sakai S., Tsuchida Y., Nakamoto H., Okino S., Ichihashi O., Kawaguchi H., Watanabe T., Inui M., Yukawa H. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(7), 2349–2353.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02880-06>
 29. Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkowski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B.J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Krämer R., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Möckel B., Pfeifferle W., Pühler A., Rey D.A., Rückert C., Rupp O., Sahl H., Wendisch V.F., Wiegräbe I., Tauch A. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.*, 2003, 104(1–3), 5–25.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00154-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00154-8)
 30. Ikeda M., Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome, features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 62(2–3), 99–109.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1328-1>
 31. Nakamura Y., Nishio Y., Ikeo K., Gojobori T. The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene*, 2003, 317(1–2), 149–155.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00653-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00653-x)
 32. Wendisch V.F., Jorge J.M.P., Pérez-García F., Sgobba E. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 32(6), 105.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2060-1>
 33. Wang Q., Zhang J., Al Makishah N.H., Sun X., Wen Z., Jiang Y., Yang S. Advances and perspectives for genome editing tools of *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Microbiol.*, 2021, 12, 654058.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.654058>
 34. Ohnishi J., Mizoguchi H., Takeno S., Ikeda M. Characterization of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in an industrial *Corynebacterium glutamicum* strain. *Mutat. Res.*, 2008, 649(1–2), 239–244.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.003>
 35. Zhang X., Zhang X., Xu G., Zhang X., Shi J., Xu Z. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102, 5939–5951.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9025-2>
 36. Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1), 69–73.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
 37. Okibe N., Suzuki N., Inui M., Yukawa H. Efficient markerless gene replacement in *Corynebacterium glutamicum* using a new temperature-sensitive plasmid. *J. Microbiol. Methods*, 2011, 85(2), 155–163.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.012>
 38. Tan Y., Xu D., Li Y., Wang X. Construction of a novel *sacB*-based system for marker-free gene deletion in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2012, 67(1), 44–52.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.11.001>
 39. Binder S., Siedler S., Marienhagen J., Bott M., Eggeling L. Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation. *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41(12), 6360–6369.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt312>
 40. Ma W., Wang X., Mao Y., Wang Z., Chen T., Zhao X. Development of a markerless gene replacement system

- in *Corynebacterium glutamicum* using upp as a counter-selection marker. *Biotechnol. Lett.*, 2015, 37(3), 609–617.
<https://doi.org/10.1007/s10529-014-1718-8>
41. Huang Y., Li L., Xie S., Zhao N., Han S., Lin Y., Zheng S. Recombineering using RecET in *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 via a self-excisable cassette. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 7916.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08352-9>
 42. Luo G., Zhao N., Jiang S., Zheng S. Application of RecET-Cre/loxP system in *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 for L-leucine production. *Biotechnol. Lett.*, 2021, 43(1), 297–306.
<https://doi.org/10.1007/s10529-020-03000-1>
 43. Suzuki N., Okayama S., Nonaka H., Tsuge Y., Inui M., Yukawa H. Large-scale engineering of the *Corynebacterium glutamicum* genome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 3369–3372.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3369-3372.2005>
 44. Lobanova J.S., Gorshkova N.V., Krylov A.A., Stoyanova N.V., Mashko S.V. Genome engineering of the *Corynebacterium glutamicum* chromosome by the Extended Dual-In/Out strategy. *J. Microbiol. Methods.*, 2022, 200, 106555.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106555>
 45. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, 1987, 169(12), 5429–5433.
<https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
 46. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819), 1709–1712.
<https://doi.org/10.1126/science.1138140>
 47. Peng F., Wang X., Sun Y., Dong G., Yang Y., Liu X., Bai Z. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb. Cell Fact.*, 2017, 16(1), 201.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0814-6>
 48. Jiang Y., Qian F., Yang J., Liu Y., Dong F., Xu C., Sun B., Chen B., Xu X., Li Y., Wang R., Yang S. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 15179.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15179>
 49. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096), 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
 50. Liu J., Wang Y., Lu Y., Zheng P., Sun J., Ma Y. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.*, 2017, 16(1), 205.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0815-5>
 51. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA guided endonuclease of a class 2 CRISPR Cas system. *Cell*, 2015, 163(3), 759–771.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
 52. Bikard D., Jiang W.Y., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L.A. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, 7429–7437.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt520>
 53. Cleto S., Jensen J.V.K., Wendisch V.F., Lu T.K. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth. Biol.*, 2016, 5, 375–385.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00216>
 54. Liu W., Tang D., Wang H., Lian J., Huang L., Xu Z. Combined genome editing and transcriptional repression for metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* using a catalytically active Cas12a. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103, 8911–8922.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10118-4>
 55. Abatemarco J., Hill A., Alper H.S. Expanding the metabolic engineering toolbox with directed evolution. *Biotechnol. J.*, 2013, 8(12), 1397–1410.
<https://doi.org/10.1002/biot.201300021>
 56. Vee Aune T.E., Bakke I., Drablos F., Lale R., Brautaset T., Valla S. Directed evolution of the transcription factor XylS for development of improved expression systems. *Microb. Biotechnol.*, 2010, 3(1), 38–47.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00126.x>
 57. Conrad T.M., Frazier M., Joyce A.R., Cho B.K., Knight E.M., Lewis N.E., Landick R., Palsson B.O. RNA polymerase mutants found through adaptive evolution reprogram *Escherichia coli* for optimal growth in minimal media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107(47), 20500–20505.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0911253107>
 58. Zuchowski R., Schito S., Neuheuser F., Menke P., Berger D., Hollmann N., Gujar S., Sundermeyer L., Mack C., Wirtz A., Weiergräber O.H., Polen T., Bott M., Noack S., Baumgart M. Discovery of novel amino acid production traits by evolution of synthetic co-cultures. *Microb. Cell Fact.*, 2023, 22(1), 71.
<https://doi.org/10.1186/s12934-023-02078-2>
 59. Della Corte D., van Beek H.L., Syberg F., Schallmeyer M., Tobola F., Cormann K.U., Schlicker C., Baumann P.T., Krumbach K., Sokolowsky S., Morris C.J., Grünberger A., Hofmann E., Schröder G.F., Marienhagen J. Engineering and application of a biosensor with focused ligand specificity. *Nat. Commun.*, 2020, 11(1), 4851.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18400-0>
 60. Mahr R., Frunzke J. Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100(1), 79–90.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7090-3>
 61. Mustafi N., Grünberger A., Kohlheyer D., Bott M., Frunzke J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metab. Eng.*, 2012, 14(4), 449–457.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.02.002>

62. Mustafi N., Grünberger A., Mahr R., Helfrich S., Nöh K., Blombach B., Kohlheyer D., Frunzke J. Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging of L-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. *PLoS One.*, 2014, 9(1), e85731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085731>
63. Mahr R., Gätgens C., Gätgens J., Polen T., Kalinowski J., Frunzke J. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, 2015, 32, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.017>
64. Schwentner A., Feith A., Münch E., Busche T., Rückert C., Kalinowski J., Takors R., Blombach B. Metabolic engineering to guide evolution – Creating a novel mode for L-valine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, 2018, 47, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.015>
65. Jian X., Guo X., Cai Z., Wei L., Wang L., Xing X.H., Zhang C. Single-cell microliter-droplet screening system (MISS Cell): An integrated platform for automated high-throughput microbial monoclonal cultivation and picking. *Biotechnol. Bioeng.*, 2023, 120(3), 778–792. <https://doi.org/10.1002/bit.28300>
66. Ma Y., Chen Q., Cui Y., Du L., Shi T., Xu Q., Ma Q., Xie X., Chen N. Comparative genomic and genetic functional analysis of industrial L-leucine- and L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 28(11), 1916–1927. <https://doi.org/10.4014/jmb.1805.05013>
67. Ma Q., Mo X., Zhang Q., Hou Z., Tan M., Xia L., Sun Q., Xie X., Chen N. Comparative metabolomic analysis reveals different evolutionary mechanisms for branched-chain amino acids production. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 2020, 43(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02207-5>
68. Zhang H., Li Y., Wang C., Wang X. Understanding the high L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* VWB-1 using transcriptomics and proteomics. *Sci. Rep.*, 2018a, 8(1), 3632. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21926-5>
69. Рябченко Л.Е., Герасимова Т.В., Леонова Т.Е., Калинина Т.В., Шереметьева М.Е., Ануфриев К.Э., Яненко А.С. Бактерия *Corynebacterium glutamicum* с повышенной способностью продуцировать L-валин и способ получения L-валина с использованием этой бактерии. Патент RU 2753966, бюлл. № 24, опублик. 25.08.2021
70. Engels V., Wendisch V.F. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2007, 189(8), 2955–2966. <https://doi.org/10.1128/JB.01596-06>
71. Engels V., Lindner S.N., Wendisch V.F. The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2008, 190(24), 8033–8044. <https://doi.org/10.1128/JB.00705-08>
72. Wang L., Yu H., Xu J., Ruan H., Zhang W. Deciphering the crucial roles of AraC-type transcriptional regulator Cgl2680 on NADPH metabolism and L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, 36(6), 82. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02861-y>
73. Ma Y., Ma Q., Cui Y., Du L., Xie X., Chen N. Transcriptomic and metabolomics analyses reveal metabolic characteristics of L-leucine- and L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Ann. Microbiol.*, 2019, 69, 457–468. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1431-2>
74. 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>
75. Yin L., Shi F., Hu X., Chen C., Wang X. Increasing L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* by overexpressing global regulator Lrp and two-component export system BrnFE. *J. Appl. Microbiol.*, 2013, 114(5), 1369–1377. <https://doi.org/10.1111/jam.12141>
76. Chen C., Li Y., Hu J., Dong X., Wang X. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for L-valine production. *Metab. Eng.*, 2015, 29, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.004>
77. Zhang Y., Liu Y., Zhang S., Ma W., Wang J., Yin L., Wang X. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve L-isoleucine production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2021, 68(3), 568–584. <https://doi.org/10.1002/bab.1963>
78. Pauling J., Rötger R., Tauch A., Azevedo V., Baumbach J. CoryneRegNet 6.0 – Updated database content, new analysis methods and novel features focusing on community demands. *Nucleic Acids Res.*, 2012, 40(Database issue), D610–614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr883>
79. Parise M.T.D., Parise D., Kato R.B., Pauling J.K., Tauch A., Azevedo V.A.C., Baumbach J. CoryneRegNet 7, the reference database and analysis platform for corynebacterial gene regulatory networks. *Sci. Data*, 2020, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0484-9>
80. Frunzke J., Engels V., Hasenbein S., Gätgens C., Bott M. Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol. Microbiol.*, 2008, 67(2), 305–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06020.x>
81. Tanaka Y., Ehira S., Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Coordinated regulation of *gnd*, which encodes 6-phosphogluconate dehydrogenase, by the two transcriptional regulators GntR1 and RamA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2012, 194(23), 6527–6536. <https://doi.org/10.1128/JB.01635-12>
82. Tanaka Y., Takemoto N., Ito T., Teramoto H., Yukawa H., Inui M. Genome-wide analysis of the role of global transcriptional regulator GntR1 in *Corynebacterium*

- glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2014, 196(18), 3249–3258. <https://doi.org/10.1128/JB.01860-14>
83. Klaffl S., Brocker M., Kalinowski J., Eikmanns B.J., Bott M. Complex regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* and characterization of its GntR-type regulator IolR as a repressor of myo-inositol utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2013, 195(18), 4283–4296. <https://doi.org/10.1128/JB.00265-13>
 84. Lee H.W., Pan J.G., Lebeault J.M. Enhanced L-lysine production in threonine-limited continuous culture of *Corynebacterium glutamicum* by using gluconate as a secondary carbon source with glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 49, 9–15. <https://doi.org/10.1007/s002530051130>
 85. Wiechert J., Gätgens C., Wirtz A., Frunzke J. Inducible expression systems based on xenogeneic silencing and counter-silencing and design of a metabolic toggle switch. *ACS Synth. Biol.*, 2020, 9(8), 2023–2038. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00111>
 86. Gaigalat L., Schlüter J.P., Hartmann M., Mormann S., Tauch A., Pühler A., Kalinowski J. The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate, sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Mol. Biol.*, 2007, 8, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-104>
 87. Tanaka Y., Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Regulation of expression of general components of the phosphoenolpyruvate, carbohydrate phosphotransferase system (PTS) by the global regulator SugR in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 78(2), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1313-1>
 88. Toyoda K., Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Involvement of the LuxR-type transcriptional regulator RamA in regulation of expression of the *gapA* gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2009, 191(3), 968–977. <https://doi.org/10.1128/JB.01425-08>
 89. Toyoda K., Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Genome-wide identification of in vivo binding sites of GlxR., a cyclic AMP receptor protein-type regulator in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2011, 193(16), 4123–4133. <https://doi.org/10.1128/JB.00384-11>
 90. Toyoda K., Inui M. The *ldhA* gene encoding fermentative L-lactate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* is positively regulated by the global regulator GlxR. *Microorganisms*, 2021, 9(3), 550. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030550>
 91. Kim H.J., Kim T.H., Kim Y., Lee H.S. Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2004, 186(11), 3453–3460. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3453-3460.2004>
 92. Cha P.H., Park S.-Y., Moon M.-W., Subhadra B., Oh T.-K., Kim E., Kim J.F., Lee J.-K. Characterization of an adenylate cyclase gene (*cydB*) deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 85, 1061–1068. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2066-9>
 93. Schulte J., Baumgart M., Bott M. Identification of the cAMP phosphodiesterase CpdA as novel key player in cAMP-dependent regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.*, 2017, 103(3), 534–552. <https://doi.org/10.1111/mmi.13574>
 94. Schulte J., Baumgart M., Bott M. Development of a single-cell GlxR-based cAMP biosensor for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, 2017, 258, 33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.004> <https://doi.org/10.1111/mmi.1357440>
 95. Goldbeter A., Gonze D., Houart G., Leloup J.C., Halloy J., Dupont G. From simple to complex oscillatory behavior in metabolic and genetic control networks. *Chaos*, 2001, 11(1), 247. <https://doi.org/10.1063/1.1345727> <https://doi.org/10.1111/mmi.13574260>
 96. Khlebodarova T.M., Kogai V.V., Fadeev S.I., Likhoshvai V.A. Chaos and hyperchaos in simple gene network with negative feedback and time delays. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2017, 15(2), 1650042. <https://doi.org/10.1142/S0219720016500426>
 97. Toyoda K., Teramoto H., Inui M., Yukawa H. The *ldhA* gene, encoding fermentative L-lactate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*, is under the control of positive feedback regulation mediated by LldR. *J. Bacteriol.*, 2009a, 191(13), 4251. <https://doi.org/10.1128/JB.00303-09> <https://doi.org/10.1111/mmi.135744258>
 98. Park S.Y., Moon M.W., Subhadra B., Lee J.K. Functional characterization of the *glxR* deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, involvement of GlxR in acetate metabolism and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010, 304(2), 107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01884.x> <https://doi.org/10.1111/mmi.13574115>
 99. Auchter M., Cramer A., Hüser A., Rückert C., Emer D., Schwarz P., Arndt A., Lange C., Kalinowski J., Wendisch V.F., Eikmanns B.J. RamA and RamB are global transcriptional regulators in *Corynebacterium glutamicum* and control genes for enzymes of the central metabolism. *J. Biotechnol.*, 2011, 154(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.001>
 100. Cramer A., Gerstmeir R., Schaffer S., Bott M., Eikmanns B.J. Identification of RamA, a novel LuxR-type transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2006, 188(7), 2554–2567. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2554-2567.2006>
 101. Teramoto H., Inui M., Yukawa H. Transcriptional regulators of multiple genes involved in carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, 2011, 154(2–3), 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.016>
 102. van Ooyen J., Emer D., Bussmann M., Bott M., Eikmanns B.J., Eggeling L. Citrate synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *glcA* transcripts

- which are controlled by RamA, RamB, and GlxR. *J. Biotechnol.*, 2011, 154(2–3), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.004>
103. Blombach B., Cramer A., Eikmanns B.J., Schreiner M. RamB is an activator of the pyruvate dehydrogenase complex subunit E1p gene in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 16(3–4), 236–239. <https://doi.org/10.1159/000108782>
104. Kataoka N., Vangnai A.S., Pongtharangkul T., Yakushi T., Wada M., Yokota A., Matsushita K. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a prototrophic pyruvate-producing strain, Characterization of a ramA-deficient mutant and its application for metabolic engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2019, 83(2), 372–380. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1527211>
105. Wang Z., Liu J., Chen L., Zeng AP., Solem C., Jensen P.R. Alterations in the transcription factors GntR1 and RamA enhance the growth and central metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.*, 2018, 48, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.004>
106. Kohl T.A., Baumbach J., Jungwirth B., Pühler A., Tauch A. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: *in silico* and *in vitro* detection of DNA binding sites of a global transcription regulator. *J. Biotechnol.*, 2008, 135(4), 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.011>
107. Cramer A., Auchter M., Frunzke J., Bott M., Eikmanns B.J. RamB, the transcriptional regulator of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*, is subject to regulation by RamA and RamB. *J. Bacteriol.*, 2007, 189(3), 1145–1149. <https://doi.org/10.1128/JB.01061-06>
108. Toyoda K., Teramoto H., Gunji W., Inui M., Yukawa H. Involvement of regulatory interactions among global regulators GlxR, SugR, and RamA in expression of *ramA* in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, 2013, 195(8), 1718–1726. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-13>
109. Jungwirth B., Emer D., Brune I., Hansmeier N., Pühler A., Eikmanns B.J., Tauch A. Triple transcriptional control of the resuscitation promoting factor 2 (*rpf2*) gene of *Corynebacterium glutamicum* by the regulators of acetate metabolism RamA and RamB and the cAMP-dependent regulator GlxR. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 281(2), 190–197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01098.x>
110. Shah A., Blombach B., Gauttam R., Eikmanns B.J. The RamA regulon, complex regulatory interactions in relation to central metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102(14), 5901–5910. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9085-3>
111. Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M., Bazhan S.I., Gainova I.A., Chereshev V.A., Bocharov G.A. Mathematical model of the Tat-Rev regulation of HIV-1 replication in an activated cell predicts the existence of oscillatory dynamics in the synthesis of viral components. *BMC Genomics*, 2014, 15 (Suppl 12), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S12-S1>
112. Likhoshvai V.A., Golubyatnikov V.P., Khlebodarova T.M. Limit cycles in models of circular gene networks regulated by negative feedbacks. *BMC Bioinformatics*, 2020, 21(Suppl 11), 255. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03598-z>
113. Akberdin I.R., Kozlov K.N., Kazantsev F.V., Fadev S.I., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Impact of negative feedbacks on *de novo* pyrimidines biosynthesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24(5), 4806. <https://doi.org/10.3390/ijms24054806>
114. Likhoshvai V.A., Kogai V.V., Fadeev S.I., Khlebodarova T.M. Chaos and hyperchaos in a model of ribosome autocatalytic synthesis. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 38870. <https://doi.org/10.1038/srep38870>
115. Kjeldsen K.R., Nielsen J. *In silico* genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(2), 583–597. <https://doi.org/10.1002/bit.22067>
116. Mei J., Xu N., Ye C., Liu L., Wu J. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* S9114. *Gene*, 2016, 575(2), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.038>
117. Zhang Y., Cai J., Shang X., Wang B., Liu S., Chai X., Tan T., Zhang Y., Wen T. A new genome-scale metabolic model of *Corynebacterium glutamicum* and its application. *Biotechnol. Biofuels*, 2017, 10, 169. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0856-3>
118. Feierabend M., Renz A., Zelle E., Nöh K., Wiechert W., Dräger A. High-quality genome-scale reconstruction of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Front. Microbiol.*, 2021, 12, 750206. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750206>
119. Niu J., Mao Z., Mao Y., Wu K., Shi Z., Yuan Q., Cai J., Ma H. Construction and analysis of an enzyme-constrained metabolic model of *Corynebacterium glutamicum*. *Biomolecules*, 2022, 12(10), 1499. <https://doi.org/10.3390/biom12101499>
120. Mendoza S.N., Olivier B.G., Molenaar D., Teusink B. A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools. *Genome Biol.*, 2019, 20(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1769-1>
121. Mao Z., Yuan Q., Li H., Zhang Y., Huang Y., Yang C., Wang R., Yang Y., Wu Y., Yang S., Liao X., Ma H. CAVE, a cloud-based platform for analysis and visualization of metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.*, 2023, 51(W1), W70–W77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad360>
122. Gu C., Kim G.B., Kim W.J., Kim H.U., Lee S.Y. Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biol.*, 2019, 20(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3>
123. Walakira A., Rozman D., Režen T., Mraz M., Moškon M. Guided extraction of genome-scale metabolic models for the integration and analysis of omics data. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2021, 19, 3521–3530. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.009>
124. Ye C., Wei X., Shi T., Sun X., Xu N., Gao C., Zou W. Genome-scale metabolic network models, from

- first-generation to next-generation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, 106, 4907–4920.
<https://doi.org/10.1007/s00253-022-12066-y>
125. Monk J.M., Lloyd C.J., Brunk E., Mih N., Sastry A., King Z., Takeuchi R., Nomura W., Zhang Z., Mori H., Feist A.M., Palsson B.O. iML1515, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits. *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(10), 904–908.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3956>
 126. Lee J., Yun H., Feist A.M., Palsson B.O., Lee S.Y. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 80(5), 849–62.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1654-4>
 127. Feng J., Guo X., Cai F., Fu H., Wang J. Model-based driving mechanism analysis for butyric acid production in *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.*, 2022, 15(1), 71.
<https://doi.org/10.1186/s13068-022-02169-z>
 128. Benito-Vaquero S., Parera Olm I., de Vroet T., Schaap P.J., Sousa D.Z., Martins Dos Santos V.A.P., Suarez-Diez M. Genome-scale metabolic modelling enables deciphering the ethanol metabolism via the acrylate pathway in the propionate-producer *Anaerotignum neopropionicum*. *Microb. Cell. Fact.*, 2022, 21(1) 116.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01841-1>
 129. Wu K., Mao Z., Mao Y., Niu J., Cai J., Yuan Q., Yun L., Liao X., Wang Z., Ma H. ecBSU1, a genome-scale enzyme-constrained model of *Bacillus subtilis* based on the ECMpy workflow. *Microorganisms*, 2023, 11(1), 178.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010178>
 130. Elsemman I.E., Rodriguez Prado A., Grigaitis P., Garcia Albornoz M., Harman V., Holman S.W., van Heerden J., Bruggeman F.J., Bisschops M.M.M., Sonnenschein N., Hubbard S., Beynon R., Daran-Lapujade P., Nielsen J., Teusink B. Whole-cell modeling in yeast predicts compartment-specific proteome constraints that drive metabolic strategies. *Nat. Commun.*, 2022, 13(1), 801.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28467-6>
 131. Arend M., Zimmer D., Xu R., Sommer F., Mühlhaus T., Nikoloski Z. Proteomics and constraint-based modeling reveal enzyme kinetic properties of *Chlamydomonas reinhardtii* on a genome scale. *Nat. Commun.*, 2023, 14(1), 4781.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40498-1>
 132. Cheng F., Yu H., Stephanopoulos G. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab. Eng.*, 2019, 276–289.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.003>
 133. Zhang Y., Zhang Y., Shang X., Wang B., Hu Q., Liu S., Wen T. Reconstruction of tricarboxylic acid cycle in *Corynebacterium glutamicum* with a genome-scale metabolic network model for trans-4-hydroxyproline production. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116(1), 99–109.
<https://doi.org/10.1002/bit.26818>
 134. Zhang S., Liu D., Mao Z., Mao Y., Ma H., Chen T., Zhao X., Wang Z. Model-based reconstruction of synthetic promoter library in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Lett.*, 2018, 40(5), 819–827.
<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2539-y>
 135. Xu N., Wei L., Liu J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 35(2), 33.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2606-0>
 136. Dostálová H., Holátko J., Busche T., Rucká L., Rapoport A., Halada P., Nešvera J., Kalinowski J., Pátek M. Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express.*, 2017, 7, 133.
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0436-8>
 137. Shi F., Luan M., Li Y. Ribosomal binding site sequences and promoters for expressing glutamate decarboxylase and producing γ -aminobutyrate in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express*, 2018, 8(1), 61.
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0595-2>
 138. Zheng B., Ma X., Wang N., Ding T., Guo L., Zhang X., Yang Y., Li C., Huo Y.X. Utilization of rare codon-rich markers for screening amino acid overproducers. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1), 3616.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05830-0>
 139. Harst A., Albaum S.P., Bojarzyn T., Trötschel C., Poetsch A. Proteomics of FACS-sorted heterogeneous *Corynebacterium glutamicum* populations. *J. Proteomics.*, 2017, 160, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.010>
 140. Hemmerich J., Tenhaef N., Steffens C., Kappelmann J., Weiske M., Reich S.J., Wiechert W., Oldiges M., Noack S. Less sacrifice, more insight: repeated low-volume sampling of microbioreactor cultivations enables accelerated deep phenotyping of microbial strain libraries. *Biotechnol. J.*, 2019, 14(9), e1800428.
<https://doi.org/10.1002/biot.201800428>
 141. Zheng Y., Cheng F., Zheng B., Yu H. Enhancing single-cell hyaluronic acid biosynthesis by microbial morphology engineering. *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2020, 5(4), 316–323.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.09.002>
 142. Hemmerich J., Labib M., Steffens C., Reich S.J., Weiske M., Baumgart M., Rückert C., Ruwe M., Siebert D., Wendisch V.F., Kalinowski J., Wiechert W., Oldiges M. Screening of a genome-reduced *Corynebacterium glutamicum* strain library for improved heterologous cutinase secretion. *Microb. Biotechnol.*, 2020, 13(6), 2020–2031.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13660>
 143. Schito S., Zuchowski R., Bergen D., Strohmeier D., Wollenhaupt B., Menke P., Seiffarth J., Nöh K., Kohlheyer D., Bott M., Wiechert W., Baumgart M., Noack S. Communities of Niche-optimized Strains (CoNoS) – Design and creation of stable, genome-reduced co-cultures. *Metab Eng.*, 2022, 73, 91–103.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.06.004>
 144. Bhushanam V., Malothu R. Bioprocess optimization of L-lysine production by using RSM and artificial neural networks from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Chem. Prod. Process Model.*, 2020, 15(4), 20190054.
<https://doi.org/10.1515/cppm-2019-0054>

Systems Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* to Create a Producer of L-Valine

M. E. Sheremetieva^{a, #}, T. M. Khlebodarova^{b, c}, D. D. Derbikov^a,
V. V. Rozantseva^a, N. A. Kolchanov^{b, c}, and A. S. Yanenko^a

^aNational Research Center “Kurchatov Institute”, Kurchatov Genome Center, Moscow, 123098 Russia

^bDepartment of Systems Biology, Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia

^cKurchatov Genomics Center, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia

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

Abstract—This review is devoted to the main approaches of systems metabolic engineering used in the development of *Corynebacterium glutamicum*-based producers of L-valine, an essential proteinogenic amino acid that is widely used as a feed additive. This direction of engineering is based on the concepts of systems biology, considering the living organism as a holistic system with complex interaction between elements. The review considers the following approaches: laboratory evolution as a way to obtain new mutations that increase L-valine production; the use of biosensors to select clones with such mutations; “omic” data obtained for *C. glutamicum* strains capable of producing L-valine and related amino acids; modification of genes encoding global regulatory factors; modeling of metabolic pathways relevant to amino acid production in *C. glutamicum* using full genomic data. Each of the approaches is evaluated in terms of its effectiveness in increasing the productivity of strains and improving their technological characteristics. In addition, information is presented on modern methods of *C. glutamicum* genome editing, without which it is impossible to carry out a large number of targeted modifications necessary for the realization of systems metabolic engineering approaches.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, L-valine, metabolic engineering, genome editing, producer strain