

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Рациональная метаболическая инженерия *Corynebacterium glutamicum* для продукции L-валина

М.Е. Шереметьева¹✉, К.Э. Ануфриев¹, Т.М. Хлебодарова^{2,3}, Н.А. Колчанов^{2,3}, А.С. Яненко¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ m.e.sheremetieva@gmail.com

Аннотация. L-Валин – одна из девяти аминокислот, которые не могут быть синтезированы *de novo* высшими организмами и должны поступать с пищей. Эта аминокислота не только служит строительным материалом для белков, но также регулирует белковый и энергетический обмен и участвует в нейротрансмиссии. L-Валин используется в пищевой и фармацевтической промышленности, медицине и косметике, но в первую очередь в качестве кормовой добавки для животных. Добавление L-валина в корм отдельно или в смеси с другими незаменимыми аминокислотами позволяет использовать корма с меньшим содержанием сырого белка, повышает качество и количество мяса свиней и цыплят-бройлеров, а также улучшает репродуктивные функции сельскохозяйственных животных. Несмотря на то что рынок L-валина постоянно растет, в нашей стране эта аминокислота пока не производится. В современных условиях создание штаммов-продуцентов и организация производства L-валина для России особенно актуальны. Один из наиболее часто используемых базовых микроорганизмов для создания продуцентов аминокислот наряду с *Escherichia coli* – почвенная бактерия *Corynebacterium glutamicum*. Обзор посвящен анализу основных стратегий разработки продуцентов L-валина на базе *C. glutamicum*. Рассмотрены различные аспекты биосинтеза L-валина у коринебактерий: биохимия, стехиометрия и регуляция процесса, ферменты и соответствующие им гены, системы экспорта и импорта, связь биосинтеза L-валина с центральным метаболизмом клетки. Выявлены ключевые генетические элементы для создания штаммов-продуцентов на основе *C. glutamicum*. Описано использование метаболической инженерии для усиления реакций биосинтеза L-валина и уменьшения образования побочных продуктов. Показаны перспективы усовершенствования штаммов с точки зрения повышения их продуктивности и улучшения технологических характеристик. Информация, представленная в обзоре, может быть использована при получении продуцентов других аминокислот с разветвленной боковой цепью – L-лейцина и L-изолейцина, а также D-пантотената.

Ключевые слова: *Corynebacterium glutamicum*; L-валин; метаболическая инженерия; штамм-продуцент.

Для цитирования: 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. DOI 10.18699/VJGB-22-90

Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to create a producer of L-valine

M.E. Sheremetieva¹✉, K.E. Anufriev¹, T.M. Khelebdarova^{2,3}, N.A. Kolchanov^{2,3}, A.S. Yanenko¹

¹ NRC “Kurchatov Institute”, Kurchatov Genomic Center, Moscow, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ m.e.sheremetieva@gmail.com

Abstract. L-Valine is one of the nine amino acids that cannot be synthesized *de novo* by higher organisms and must come from food. This amino acid not only serves as a building block for proteins, but also regulates protein and energy metabolism and participates in neurotransmission. L-Valine is used in the food and pharmaceutical industries, medicine and cosmetics, but primarily as an animal feed additive. Adding L-valine to feed, alone or mixed with other essential amino acids, allows for feeds with lower crude protein content, increases the quality and quantity of pig meat and broiler chicken meat, as well as improves reproductive functions of farm animals. Despite the fact that the market for L-valine is constantly growing, this amino acid is not yet produced in our country. In modern conditions, the creation of strains-producers and organization of L-valine production are especially relevant for Russia. One of the basic microorganisms most commonly used for the creation of amino acid producers, along with *Escherichia coli*, is the soil bacterium *Corynebacterium glutamicum*. This review is devoted to the analysis of the main strategies for the development of L-valine producers based on *C. glutamicum*. Various aspects of L-valine biosynthesis in *C. glutamicum* are reviewed: process biochemistry, stoichiometry and regulation, enzymes and their corresponding genes, export and import systems, and the relationship of L-valine biosynthesis with central cell metabolism. Key genetic elements for the creation

of *C. glutamicum*-based strains-producers are identified. The use of metabolic engineering to enhance L-valine biosynthesis reactions and to reduce the formation of byproducts is described. The prospects for improving strains in terms of their productivity and technological characteristics are shown. The information presented in the review can be used in the production of producers of other amino acids with a branched side chain, namely L-leucine and L-isoleucine, as well as D-pantothenate.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; L-valine; metabolic engineering; producer strain.

For citation: Sheremetieva M.E., Anufriev K.E., Khlebodarova T.M., Kolchanov N.A., Yanenko A.S. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to create a producer of L-valine. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(8):743-757. DOI 10.18699/VJGB-22-90

Введение

L-Валин относится к группе протеиногенных аминокислот с разветвленной боковой цепью (branched-chain amino acids, ВСАА), куда также входят L-лейцин и L-изолейцин (далее – валин, лейцин, изолейцин). Это незаменимые аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и животных и должны присутствовать в рационе. Поэтому такие аминокислоты используются главным образом в индустрии кормов для животных и в качестве пищевой добавки для человека (Karau, Grayson, 2014). Первое особенно актуально для решения общемировой задачи интенсификации животноводства. Добавление к кормам валина, как отдельно, так и в смеси с другими ВСАА, приводит к повышению качества и количества мяса свиней и цыплят-бройлеров, повышает яйценоскость кур, увеличивает лактацию, жирность молока и аппетит у свиней (Zheng et al., 2017; Che et al., 2021; Jian et al., 2021). Необходимо, однако, соблюдать баланс между различными ВСАА, нарушение которого может снижать наблюдаемые положительные эффекты (Holen et al., 2022).

Помимо животноводства и пищевой промышленности, ВСАА находят свое применение в фармакологии и медицине. ВСАА не только служат строительным материалом для белков, но также участвуют в регуляции белкового и энергетического обмена, их потребление повышает толерантность к физическим нагрузкам и ускоряет окисление жирных кислот (Kainulainen et al., 2013). Они полезны как биологические добавки при хронических заболеваниях печени (Kawaguchi et al., 2011) и для стимуляции макрофагального фагоцитоза бактериальных патогенов со множественной лекарственной устойчивостью (Chen et al., 2017). Как и в случае с кормовыми добавками, при использовании ВСАА для производства продуктов питания и лекарств следует внимательно относиться к подбору концентраций. Избыток ВСАА в плазме крови человека повышает риск развития ряда заболеваний, включая диабет второго типа, метаболический синдром, ожирение, гипертонию и сердечно-сосудистые заболевания (Holeček, 2018; Dimou et al., 2022), но практически не сказывается на спортсменах, для которых характерны высокие физические нагрузки (Shou et al., 2019).

На мировом рынке кормовых добавок, объем которого в 2022 г., по прогнозам, может составить 34.2 млрд долларов США, аминокислоты занимают 62.3 %. Наиболее востребованы L-лизин и L-метионин (далее – лизин, метионин); рынок валина – один из самых быстрорастущих, наряду с L-треонином (далее – треонин) и L-триптофаном. Потребление кормовых аминокислот сосредоточено в Европе, США и Китае, доля России составляет ме-

нее 2 %, однако проявляет тенденцию к росту – с 2016 по 2017 г. прибавка составила 2.9 % (<https://agri-news.ru/zhurnal/2018/32018/ekonomika-menedzhment-ryinki/ryinok-kormovyix-aminokislota.html>). В настоящее время весь валин на российском рынке импортируется из Китая, одного из основных производителей этой аминокислоты.

Аминокислоты можно выделять из природных источников белка, получать путем химического синтеза, а также микробиологическим способом, основанным на применении штаммов-продуцентов. Последний вариант обладает важными достоинствами: он позволяет использовать возобновляемые сырьевые ресурсы и получать биологически активные L-энантиомеры аминокислот отдельно, а не в смеси с D-энантиомерами, и поэтому применяется ведущими производителями валина (D'Este et al., 2017).

Продуценты аминокислот разрабатывают на базе *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. *E. coli* – досконально изученная бактерия, для которой имеется обширный инструментарий генетической модификации, в связи с чем ранее штаммы-продуценты получали преимущественно на ее основе. Однако использовались и штаммы *C. glutamicum*, созданные с помощью селекции, история их применения для производства аминокислот насчитывает уже более 60 лет (Leuchtenberger et al., 2005). В последние десятилетия, достигнув значительного прогресса как в понимании метаболизма *C. glutamicum*, так и в усовершенствовании методов модификации их генома, разработчики штаммов-продуцентов все чаще стали отдавать предпочтение коринебактериям.

Это непатогенные, GC-богатые грамположительные бактерии, которые, в отличие от *E. coli*, не образуют эндотоксинов, вызывающих аллергические реакции у высших организмов, а кроме того, характеризуются гибким клеточным метаболизмом, генетической стабильностью, стрессоустойчивостью, включая устойчивость к высоким концентрациям источников углерода и метаболитов, и способностью синтезировать целевой продукт при остановке роста (Varitugo et al., 2018). В настоящее время валин, полученный путем ферментации с использованием штаммов *C. glutamicum*, признан безопасным (нетоксичным и неканцерогенным) для применения в качестве пищевой и кормовой добавки и в других биологических целях (Kang et al., 2020).

В обзоре представлены основные стратегии повышения продуктивности валина клетками *C. glutamicum* и суммированы достижения по созданию штаммов-продуцентов валина. Помимо получения валина, рассматриваются некоторые аспекты получения изолейцина, лейцина и D-пантотена-

та (далее – пантотенат), поскольку в биосинтезе данных соединений участвуют общие с валином метаболические предшественники, кофакторы и ферменты.

Биосинтез валина у *C. glutamicum* и механизмы регуляции данного процесса

Валин (2-амино-3-метилбутановая кислота) синтезируется из пирувата (пировиноградной кислоты) в результате четырех последовательных реакций, включающих (рис. 1): 1) конденсацию двух молекул пирувата с образованием 2-ацетолактата, катализируемую ацетолактатсинтазой (ANAS); 2) НАДФН-зависимое превращение 2-ацетолактата в 2,3-диоксиизовалерат, катализируемое ацетолактатредуктоизомеразой (ANAIR); 3) превращение 2,3-диоксиизовалерата в 2-оксоизовалерат, катализируемое дегидратазой дигидроксикислот (DHAD); 4) НАДФН-зависимое образование валина из 2-оксоизовалерата, катализируемое трансаминазой ВСАА (BCAT) и рядом других трансаминаз (Yamamoto et al., 2017).

В ходе синтеза на продукцию 1 моля валина расходуются 2 моля пирувата и 2 моля восстановительных эквивалентов в форме восстановленного никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФН). Пируват образуется из фосфоенолпирувата (ФЕП) в гликолизе, в ходе которого 1 моль глюкозы превращается в 2 моля пирувата. Основной источник НАДФН у коринебактерий – пентозофосфатный восстановительный путь (ПФП) (Marx et al., 1997).

2-Оксоизовалерат является также предшественником биосинтеза лейцина и пантотената (Park, Lee, 2010). У большинства микроорганизмов, включая *C. glutamicum*, эти же четыре фермента катализируют биосинтез изолейцина из пирувата и 2-оксобутирата. Последний образуется из треонина с помощью треониндегидратазы (TD). Таким образом, процессы биосинтеза всех трех ВСАА (валина, лейцина и изолейцина) тесно связаны. Синтезированные ВСАА выводятся из клетки с помощью одной системы экспорта – BrnFE (Lange et al., 2012).

Схема биосинтеза валина и связанных с этим процессом метаболических путей у *C. glutamicum* представлена на рис. 1. Ключевой фермент путей биосинтеза валина и других ВСАА – ацетолактатсинтаза ANAS, которая катализирует образование либо 2-ацетолактата из двух молекул пирувата (при биосинтезе валина и лейцина), либо образование 2-ацето,2-оксибутирата из пирувата и 2-оксобутирата (при биосинтезе изолейцина). В отличие от *E. coli*, у *C. glutamicum* обнаружена только одна форма фермента ANAS (Keilhauer et al., 1993), тетрамер, состоящий из двух каталитических и двух регуляторных субъединиц (Liu et al., 2016). Каталитическая и регуляторная субъединицы ANAS кодируются генами *ilvB* и *ilvN* соответственно. Вместе с геном *ilvC*, кодирующим ацетолактатредуктоизомеразу ANAIR, эти два гена образуют оперон *ilvBNC* с двумя дополнительными промоторами внутри него. Экспрессия с трех промоторов ведет к образованию транскриптов различной длины (рис. 2). Ген *ilvC* транскрибируется в составе всех мРНК, эффективность его экспрессии самая высокая среди трех генов (Keilhauer et al., 1993; Morbach et al., 2000).

Экспрессия оперона *ilvBNC*, как считается, контролируется через механизм аттенуации транскрипции (англ.

transcription attenuation – транскрипционное ослабление), реализуемый за счет формирования на транскрипте вторичных РНК-структур (шпилек) – терминаторов транскрипции, возникающих в регуляторной области в присутствии высоких концентраций ВСАА (см. рис. 2). Регуляторная область расположена перед геном *ilvB*; помимо участков, ответственных за формирование шпилек, она кодирует также лидерный пептид (25 аминокислот), обогащенный остатками изолейцина (2), валина (3) и лейцина (2). Предполагается, что этот пептид является сенсорным элементом регуляторной системы – при низкой концентрации какой-либо из ВСАА в клетках его трансляция замедляется, в результате чего не происходит образования терминаторных шпилек.

При недостатке одной или нескольких ВСАА экспрессия оперона *ilvBNC* увеличивалась вдвое; замена в лидерном пептиде остатков валина на остатки аланина вела к потере влияния валина на экспрессию (Morbach et al., 2000). Отмечено существенное усиление экспрессии оперона *ilvBNC* в присутствии 2-оксобутирата (Eggeling et al., 1987; Keilhauer et al., 1993; Morbach et al., 2000). Механизм такой регуляции не исследован.

Активность ANAS строго ингибируется валином ($K_i = 0.9$ мМ), а также лейцином ($K_i = 6.0$ мМ) и изолейцином ($K_i = 3.1$ мМ) по механизму обратной связи через присоединение аминокислот к регуляторной субъединице фермента (Eggeling et al., 1987; Morbach et al., 2000; Leyval et al., 2003; Elišáková et al., 2005), а также конкурентно ингибируется 2-оксоизовалератом (Krause et al., 2010a). Независимо от количества присутствующих ВСАА (одной, двух или всех трех), степень ингибирования активности ANAS не превышает 57 % (Elišáková et al., 2005).

Необходимо отметить, что ANAS имеет более низкую субстратную специфичность по отношению к пирувату ($K_m = 8.3$ мМ) (Leyval et al., 2003), чем к 2-оксобутирату ($K_m = 4.8$ мМ) (Eggeling et al., 1987), поэтому при прочих равных условиях предпочтение отдается реакции конденсации пирувата с 2-оксобутиратом, ведущей к синтезу изолейцина.

Что касается ANAIR (продукт гена *ilvC*), катализирующей этап изомеризации и превращения 2-ацетолактата в 2,3-диоксиизовалерат, а также 2-ацето,2-оксибутирата в 2,3-диокси-3-метилвалерат в пути синтеза изолейцина, то ее активность зависит от присутствия НАДФН и ингибируется по механизму обратной связи валином и лейцином, но не изолейцином (Leyval et al., 2003; Lee et al., 2019).

О регуляции активности ферментов, контролируемых третьим и четвертым, заключительным, этапами синтеза валина у *C. glutamicum*, а также о регуляции генов, кодирующих их структуру, информации мало. Известно только, что активность дегидратазы дигидроксикислот DHAD (продукт гена *ilvD*) слабо ингибируется валином и лейцином и не ингибируется изолейцином (Leyval et al., 2003), а активность трансаминазы BCAT (продукт гена *ilvE*) зависит от доступности НАДФН. Донором аминокислоты в реакции трансаминирования служит L-глутамат (далее – глутамат), который превращается в 2-оксоглутаровую кислоту; НАДФН необходим для регенерации глутамата с помощью глутаматдегидрогеназы. По-

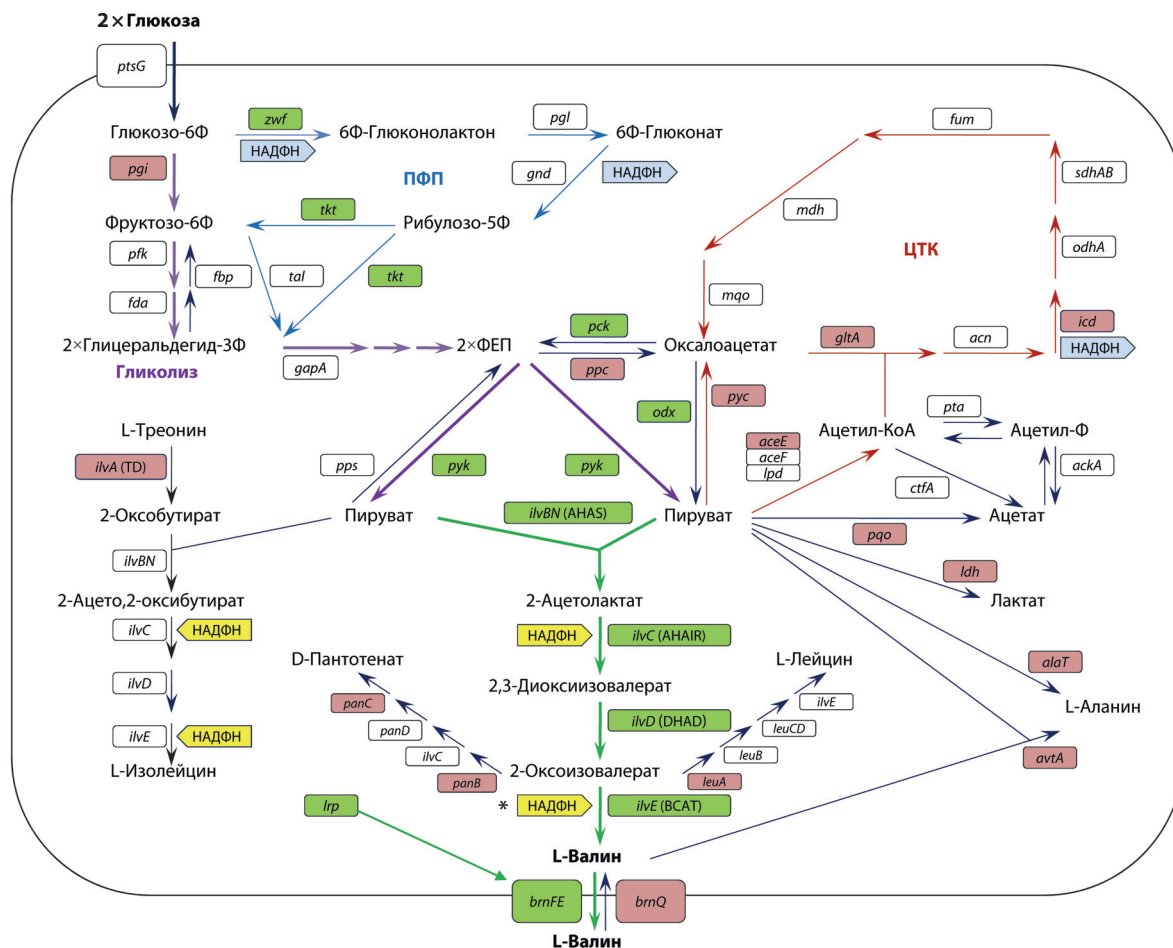


Рис. 1. Биосинтез валина и связанные с данным процессом метаболические пути в клетках *C. glutamicum*.

Выделены гены, усиление экспрессии которых приводит к повышению (зеленый цвет) или снижению (красный цвет) продукции валина. Подробное описание и расшифровка сокращений приведены в тексте. Звездочкой обозначена реакция, в которой НАДФН используется опосредованно (см. пояснения в тексте).

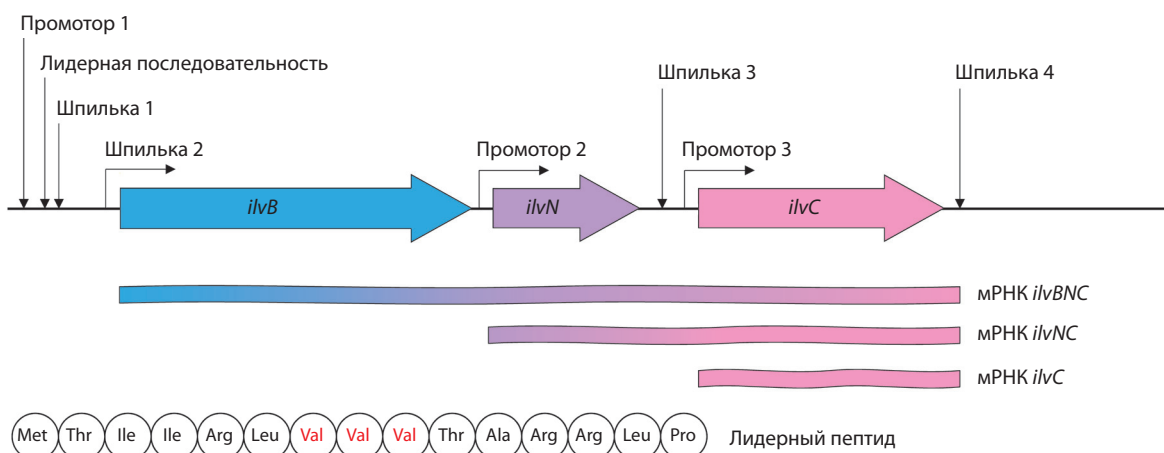


Рис. 2. Организация оперона *ilvBNC* у *C. glutamicum* и регуляция его экспрессии (адаптировано из обзора (Wang et al., 2018)).

казано, что реакция, катализируемая глутаматдегидрогеназой, является основной реакцией ассимиляции азота в условиях избытка аммиака, которые обычно имеют место в процессах производства аминокислот (Burkovski, 2003).

Показано также участие в биосинтезе валина аланин/валинтрансминазы (продукт гена *avtA*), которая использует в качестве донора аминогруппы не глутамат, а L-аланин (далее – аланин) или α-аминобутират (Leyval et al., 2003).

Анализ динамики изменения концентраций метаболитов биосинтеза валина с помощью кинетической модели в штамме *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ panBC Δ ilvA pJC1ilvBNCD показал, что лимитирующими скорость участками в этой цепи являются реакции, катализируемые ферментами АНАС и ВСАТ, и транспорт валина из клеток при помощи BrnFE (Magnus et al., 2009).

Создание валин-продуцирующих штаммов на основе *C. glutamicum*

Полученная к настоящему времени информация о биохимических, генетических и регуляторных аспектах биосинтеза валина у *C. glutamicum* позволяет считать, что барьерами на пути увеличения продукции валина у этого микроорганизма являются:

- негативная регуляция активности АНАС валином, лейцином, изолейцином и 2-оксоизовалератом (ретроингибирование);
- низкая субстратная специфичность АНАС к пирувату;
- негативная регуляция экспрессии оперона *ilvBNC* при помощи ВСАА;
- расходование пирувата на синтез изолейцина, лейцина и пантотената, а также расходование 2-оксоизовалерата на синтез последних двух соединений;
- расходование пирувата и его предшественника ФЕП – ключевых метаболитов гликолитических процессов – в энергетическом метаболизме клетки и синтезе карбоновых кислот, а также в образовании аланина;
- необходимость НАДФН для второй и четвертой реакций биосинтеза валина;
- низкая эффективность системы экспорта ВСАА BrnFE по отношению к валину.

Далее мы рассмотрим подходы к преодолению этих преград, использованные при создании валин-продуцирующих штаммов на основе *C. glutamicum* (информация о штаммах представлена в таблице).

Усиление реакций биосинтеза валина

Увеличение активности АНАС. Существует несколько подходов к увеличению активности АНАС при создании валин-продуцирующих штаммов. Ключевым является модификация гена *ilvN*, устраняющая ретроингибирование фермента. Известен целый ряд мутаций в последовательности гена *ilvN*, ведущих к ослаблению действия ВСАА на активность АНАС. К таким мутациям относятся замены трех аминокислот, Gly20Asp, Ile21Asp и Ile22Phe, в регуляторной субъединице IlvN (Elišáková et al., 2005). Наилучший эффект в этом ряду показала замена Ile22Phe, которая позже была использована и в других исследованиях (Hou et al., 2012a, b). Аналогичное действие продемонстрировали для мутаций, ведущих к заменам Ala42Val, Ala89Val и Lys136Glu в малой субъединице. Двойная мутация Ala42Val-Ala89Val привела к почти полной устойчивости фермента к ингибированию всеми тремя ВСАА (Guo et al., 2014).

Усиление субстратной специфичности АНАС к пирувату. Этот подход связан с возможностью модификаций каталитической субъединицы IlvB АНАС, увеличивающих сродство фермента к пирувату. Достоверных данных о подходящих мутациях мало. Найдена одна

мутация в гене *ilvB*, ведущая к замене аланина на валин в позиции 138 большой субъединицы АНАС, позволившая в 2.5 раза увеличить продукцию валина (Liu et al., 2019). Предполагается, что такая замена приводит к изменению субстратной специфичности АНАС по отношению к пирувату. Молекулярный механизм действия мутации остается неясным.

Известны и другие мутации в гене *ilvB* каталитической субъединицы АНАС, приводящие к увеличению активности фермента в направлении продукции валина (Chen et al., 2015; Guo et al., 2015), которые пока не нашли практического применения.

Для введения в клетки *C. glutamicum* модифицированного фермента АНАС их трансформируют плазмидой, несущей мутантный ген (Hasegawa et al., 2012; Hou et al., 2012b; Buchholz et al., 2013), либо вносят соответствующие изменения в хромосомную ДНК (Bartek et al., 2010; Hasegawa et al., 2013). Подобные манипуляции приводят к увеличению продукции валина в 2–3 раза. Использование автономных экспрессионных плазмид позволяет также увеличивать активность АНАС за счет введения в клетки дополнительных копий генов *ilvBN* или всего оперона *ilvBNC* целиком. Последнее ведет к увеличению активности не только АНАС, но и АНАИР.

Преодоление негативного влияния ВСАА на экспрессию оперона *ilvBNC*. Наиболее рациональным подходом к решению данной проблемы является сверхэкспрессия оперона *ilvBNC* с использованием экспрессионных плазмид. В настоящее время сверхэкспрессию генов *ilvBNCDE*, в различных сочетаниях, осуществляют с помощью конструкций с сильными конститутивными промоторами. Таковыми являются, например, промоторы генов супероксиддисмутазы (*Psod*) и фактора элонгации Tu (*Ptuf*) и синтетическая конструкция на основе промоторов оперонов *trp* и *lac* (*Ptac*) (Tarutina et al., 2016; Wei et al., 2018; Li et al., 2020b; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2021). Описаны и другие эффективные промоторы (Tarutina et al., 2016; Wei et al., 2018; Li et al., 2020b). Модификации такого типа приводят к увеличению продукции валина примерно на 60 % (Wei et al., 2018).

Оптимизация активности DHAD и ВСАТ, катализирующих последние этапы биосинтеза валина, обеспечивается сверхэкспрессией кодирующих эти ферменты генов (*ilvD* и *ilvE* соответственно), которая обычно достигается путем амплификации генов на плаزمиде (см. таблицу). Для продукции валина особенно важно увеличить активность ВСАТ, поскольку этот фермент катализирует скорость-лимитирующий этап биосинтеза (Magnus et al., 2009).

Минимизация образования побочных продуктов

Ферменты пути биосинтеза валина участвуют в образовании других метаболитов, таких как изолейцин, лейцин и пантотенат (см. рис. 1). Следовательно, активация этих ферментов и усиление экспрессии кодирующих их генов увеличивают выход всех перечисленных соединений, что ведет к загрязнению целевого продукта, а также к уменьшению доступности кофакторов, интермедиатов и самих ферментов для продукции валина и, как результат,

Валин-продуцирующие штаммы, сконструированные на основе *C. glutamicum*

Штамм	Валин, г/л*	Конверсия, моль/моль**	Литературный источник
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032			
$\Delta ilvA \Delta panBC$ (pJC1- <i>ilvBNCD</i>) 92 NA	10.7	–	Radmacher et al., 2002
$\Delta ilvA \Delta panBC ilvNM13$ (pECKA- <i>ilvBNC</i>)	15.2	–	Elišáková et al., 2005
$\Delta panB ilvNM13$ (P- <i>ilvAM1CG</i> P- <i>ilvDM7</i> P- <i>ilvEM6</i>)	15.9	–	Holátko et al., 2009
$\Delta aceE$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	24.6	0.60	Blombach et al., 2007
$\Delta aceE \Delta pqr$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	26.4	0.52	Blombach et al., 2008
$\Delta aceE \Delta pqr \Delta pgi$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	48.2	0.75	»
$\Delta aceE \Delta pqr \Delta pgi \Delta prc$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	28.1	0.86	»
$\Delta aceE \Delta pqr$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	24.6	0.23	Blombach et al., 2009
$\Delta aceE \Delta pqr \Delta sugR$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	35.2	0.20	»
$\Delta aceE \Delta pqr$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>) (pBB1- <i>pntAB</i>)	14.6	0.92	Bartek et al., 2011
(P- <i>ilvAM1CG</i>) $\Delta avtA$ pDXW-8- <i>ilvEBN(r)C</i>	31.2	0.17	Hou et al., 2012a
$\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$ (pECKA- <i>ilvBNC</i>)	12.5	–	Denina et al., 2010
$\Delta ilvA \Delta panB \Delta rel ilvNM13$ (pECKA- <i>ilvBNC</i>)	11.5	–	»
$\Delta ilvA \Delta panBC \Delta avtA$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	8.8	–	Marienhagen, Eggeling, 2008
$aceEA16 \Delta pqr \Delta prc$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	86.5	0.36	Buchholz et al., 2013
$\Delta prc \Delta prc icd^{Ala94Asp}$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	8.0	0.20	Schwentner et al., 2018
$\Delta prc \Delta prc icd^{Gly407Ser}$ (pJC4- <i>ilvBNCE</i>)	8.9	0.22	»
$\Delta ponA \Delta ilvA P ilvB^{G183A}$	15.6	–	Рябченко и др., 2021
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13869			
$\Delta aceE \Delta alaT \Delta ilvA$ (pJYW4- <i>ilvBNC1-lrp1-brnFE</i>)	51.2	0.47	Chen et al., 2015
$\Delta ponA \Delta ilvA P ilvB^{G183A}$	25.1	–	Рябченко и др., 2021
<i>C. glutamicum</i> R			
$\Delta ldhA$ (pCRB-BN ^{GE} C TM) (pCRB-DLD)	172.2 ^{***}	0.63	Hasegawa et al., 2012
$\Delta ldhA \Delta prc \Delta pta \Delta ackA \Delta ctfA \Delta avtA ilvN^{GE}C^{TM} + gapA+pyk+pfkA+pgi+tpi$ (pCRB-BN ^{GE} C TM) (pCRB-DLD)	149.9 ^{***}	0.88	Hasegawa et al., 2013
<i>B. flavum</i> ATCC14067 (<i>C. glutamicum</i> ssp. <i>flavum</i>)			
pDXW-8- <i>ilvEBN(r)</i>	38.1	0.24	Hou et al., 2012b
$\Delta alr \Delta aceE \Delta ilvA \Delta leuA$ (pJYW4)	9.5	–	Liu et al., 2019
$\Delta alr \Delta aceE \Delta ilvA \Delta leuA$ (pJYW4- <i>ilvB</i> ^{138Val404Ala} - <i>ilvN</i>)	14.5	–	»
$\Delta alr \Delta aceE \Delta ilvA \Delta leuA$ (pJYW4- <i>ilvB</i> ^{138Val404Ala} - <i>ilvNCE</i>)	25.9	0.49	»
<i>B. flavum</i> JV16			
<i>avtA::Cm</i> (pDXW8- <i>ilvEBN(r)C</i>)	34.4	0.22	Hou et al., 2012a
<i>C. glutamicum</i>			
$\Delta prc \Delta aceE \Delta alaT \Delta pqr$	3.2	–	Han et al., 2020

* Концентрация валина в культуральной жидкости.

** Выход целевого продукта (валина) из субстрата (глюкозы).

*** Данные получены с использованием концентрированной суспензии клеток.

к снижению уровня конверсии. Минимизация образования побочных продуктов при создании штаммов-продуцентов требует подавления соответствующих метаболических путей при сохранении способности штаммов расти на бедных средах.

Минимизация образования изолейцина. Выше отмечалось, что синтез изолейцина (2-амино-3-метилпен-

тановой кислоты) катализируется теми же ферментами, какие участвуют в биосинтезе валина, и начинается с конденсации пирувата и 2-оксобутирата (см. рис. 1). Очевидный способ минимизации образования изолейцина – снижение концентрации в клетках 2-оксобутирата, взаимодействием которого с пируватом определяется направление дальнейших реакций. 2-Оксобутират образуется

из треонина под действием треониндегидратазы TD, которая кодируется геном *ilvA* (Cordes et al., 1992). Треониндегидратаза подвержена негативной аллостерической регуляции изолейцином и положительной – валином (Möckel et al., 1992).

Наиболее распространенной модификацией данного гена при создании валин-продуцирующих штаммов является его инактивация путем делетирования ($\Delta ilvA$). С использованием такой модификации получено большинство штаммов (см. таблицу). Результатом ее становится появление у штаммов способности продуцировать валин либо значительное увеличение уже имеющейся продукции. При этом возникает ауксотрофия по изолейцину, требующая добавления изолейцина в культивационную среду, что усложняет производственный процесс и может повысить себестоимость продукции. В ряде исследований для создания валин-продуцирующих штаммов вместо полной инактивации гена *ilvA* произвели направленную модификацию его промотора, приводящую к снижению экспрессии гена, появлению брадитрофии по изолейцину и, как следствие, повышению продукции валина (Holátko et al., 2009; Hou et al., 2012a).

Еще одна мишень для модификаций, направленных на снижение биосинтеза изолейцина, – это ANAS. Вариант модификации каталитической субъединицы фермента, увеличивающий его специфичность по отношению к пирувату и перенаправляющий ресурсы клетки на продукцию валина (Liu et al., 2019), описан выше.

Минимизация образования лейцина и пантотената. 2-Оксоизовалерат является предшественником не только валина, но и лейцина и пантотената (см. рис. 1). Синтез лейцина (2-амино-4-метилпентаановой кислоты) из 2-оксоизовалерата контролируется генами *leuA*, *leuB* и *leuCD*, локализованными в разных участках хромосомы. Известно, что *leuB* и *leuCD* подвержены контролю транскрипционного репрессора LtbR, а в регуляции *leuA*, по-видимому, участвует механизм аттенуации транскрипции (Wang et al., 2019a). Модификацию, направленную на сохранение 2-оксоизовалерата для биосинтеза валина за счет уменьшения биосинтеза лейцина, осуществили J. Holátko с коллегами (2009), снизив экспрессию гена *leuA* путем замены нативного промотора более слабым. Результатом стало увеличение продукции валина на 50–70 %, что сравнимо с эффектом, наблюдаемым при ослаблении экспрессии гена *ilvA*.

Синтез пантотената (амида β -аланина и пантоевой кислоты) из 2-оксоизовалерата контролируется генами *panB* и *panC*, которые образуют один оперон (Sahm, Eggeling, 1999), и геном *panD*, расположенным в геноме отдельно (Dusch et al., 1999). Отмечено, что поток углерода, идущий на биосинтез валина, в 10 раз выше потока, идущего на биосинтез пантотената, даже в штамме с усиленной экспрессией *panBC* (Chassagnole et al., 2002). Тем не менее инактивация гена *panB* или всего оперона *panBC* хоть и ведет к ауксотрофии штаммов по пантотенату, но позволяет добиться появления продукции валина у штаммов дикого типа и увеличить продукцию валина у валин-продуцирующих штаммов более чем на 30 и даже 50 % (Radmacher et al., 2002; Holátko et al., 2009).

Увеличение доступности предшественников и кофакторов

Увеличение доступности пирувата. Пируват, центральное звено углеродного и энергетического обмена во всех организмах, – предшественник не только ВСАА и пантотената, но и множества других соединений, включая компоненты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), а также лактат и аланин (см. рис. 1). Эффективная продукция валина требует поддержания в клетках пула пирувата, а, следовательно, усиления реакций образования пирувата и/или уменьшения его нецелевого расхода. Пируват, при образовании которого синтезируется 2 моля восстановленного никотинамиддинуклеотида (НАДН), является продуктом гликолиза (Wieschalka et al., 2012). Однако при разработке продуцентов валина активуют гликолитических ферментов обычно не увеличивают, за исключением микроаэробного процесса (см. ниже). Основной подход – снижение оттока пирувата и его предшественника ФЕП в другие пути.

Одно из главных направлений оттока пирувата – ЦТК. Данный процесс становится менее активным на поздних стадиях роста, что можно было бы использовать при создании благоприятных условий для продукции валина. Действительно, снижение скорости роста *C. glutamicum* сопровождается повышением уровня пирувата в клетках и увеличением количества валина (Ruklisha et al., 2007). В валин-продуцирующих штаммах, ауксотрофных по изолейцину и пантотенату, рост культур можно контролировать, изменяя количество подпитки этими веществами; ограничение роста также ведет к увеличению продуктивности (Bartek et al., 2008).

Вовлечение пирувата и ФЕП в ЦТК происходит в результате превращения как обоих соединений в оксалоацетат (ОА), так и пирувата в ацетил-кофермент А (ацетил-КоА) непосредственно или через ацетат и ацетил-фосфат (см. рис. 1). Как правило, повышения продукции валина, а также самого пирувата пытаются добиться через снижение активности пируватдегидрогеназного комплекса (PDHC), который катализирует окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетил-КоА. У *C. glutamicum* данный комплекс состоит из трех субъединиц, E1, E2 и E3, кодируемых генами *aceE*, *aceF* и *lpd* соответственно (Eikmanns, Blombach, 2014). Инактивация гена *aceE* делетированием ($\Delta aceE$) – один из наиболее частых шагов при создании продуцента валина (см. таблицу). Полученные штаммы требуют добавления ацетата в минимальную среду, но уровень продукции валина возрастает многократно. Метаболомный анализ показал, что инактивация *aceE* у *C. glutamicum* дикого типа ведет к 13-кратному увеличению пула пирувата в клетках (Blombach et al., 2007).

Характерная особенность штаммов *C. glutamicum*, лишенных PDHC, – продукция валина в отсутствие роста клеток. Увеличения скорости утилизации глюкозы добивались добавлением мальтозы вместо глюкозы, использованием этанола вместо ацетата или инактивацией регулятора транскрипции SugR (Blombach et al., 2009; Krause et al., 2010b). SugR у *C. glutamicum* отвечает за ацетат-опосредованную репрессию генов *ptsG*, *ptsI* и *ptsH*, кодирующих ферменты фосфотрансферной системы (PTS), которая

обеспечивает сопряженные процессы транспорта сахаров в клетку и их фосфорилирования (Engels, Wendisch, 2007). Однако из-за дефицита PDHC все штаммы по-прежнему нуждались в ацетате или этаноле, который затем также превращается в ацетат в качестве дополнительного источника углерода.

Для преодоления этой потребности провели замену нативного промотора гена *aceE* на мутантные варианты из ранее созданной библиотеки промоторов на основе промотора гена *dapA* (Vasicová et al., 1999), что позволило получить серию штаммов *C. glutamicum* с постепенным снижением активности PDHC и скорости роста на среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода. Трансформированные плазмидой pJC4-*ilvBNCE*, данные штаммы продуцировали валин и не требовали ацетата в качестве дополнительного источника углерода (Buchholz et al., 2013). Использование для тех же целей промотора гена альдегиддегидрогеназы из *C. glutamicum* CP (P_{CP}₂₈₃₆), идентифицированного как промотор, регулируемый ростом, и снижающего уровень транскрипции *aceE* втрое по сравнению с нативным промотором, также хорошо сказалось и на росте клеток, и на продукции валина (Ma et al., 2018b).

Уменьшить расход пирувата в ЦТК можно и за счет снижения активности самого цикла. Так, оказалось, что эффективной продукции пирувата способствует подавление гена транскрипционного фактора RamA, ответственного за активацию ЦТК (Kataoka et al., 2019).

Превращение пирувата в ацетат катализируется пируват:хиноноксидоредуктазой (продукт гена *pqo*), инактивация которой (Δpqo) ведет к повышению продукции валина (см. таблицу), но и к ухудшению ростовых характеристик штаммов. Объединение такой модификации с инактивацией ФЕП-карбоксилазы (продукт гена *ppc*), катализирующей образование ОА из ФЕП, привело к незначительному повышению продукции валина, однако показатель конверсии глюкозы вырос на 14 % (Buchholz et al., 2013). Отмечается, что валин-продуцирующий штамм с инактивированными генами *aceE* и *pqo* лучше растет и продуцирует больше валина на среде, обогащенной мальтозой (Krause et al., 2010b).

Еще один путь оттока пирувата – образование из него ОА под действием пируваткарбоксилазы (продукт гена *pus*). Инактивация *pus* при создании продуцента валина приводит к увеличению конверсии глюкозы до 0.86 моль валина на 1 моль глюкозы (Blombach et al., 2008). При разработке лейцин-продуцирующего штамма выяснилось, что для накопления пирувата инактивация пируваткарбоксилазы выгодней, чем инактивация ФЕП-карбоксилазы (Wang et al., 2020).

Два других пути расходования пирувата в клетках *C. glutamicum* – процессы биосинтеза лактата и аланина (см. рис. 1). Образование лактата, катализируемое лактатдегидрогеназой (продукт гена *ldhA*), приобретает значение с точки зрения продукции валина в условиях недостатка кислорода (Hasegawa et al., 2012) и будет рассмотрено далее.

Минимизация синтеза аланина требуется в любых условиях, поскольку этот процесс ведет не только к нецелевому расходу пирувата, но также к потере НАДФН в реакции

переноса аминогруппы и к появлению нежелательных примесей в конечном продукте.

Образование аланина у коринебактерий катализируют трансаминазы AlaT и AvtA, использующие в качестве доноров аминокрупп глутамат и валин соответственно (Marienhagen et al., 2005; Marienhagen, Eggeling, 2008). Выше отмечалось, что AvtA является одной из трансаминаз, участвующих в биосинтезе валина, но ее роль, по сравнению с ВСАТ, незначительна.

Вопрос об участии этих трансаминаз в биосинтезе аланина у *C. glutamicum* остается открытым в силу противоречивости существующих данных. С одной стороны, показано, что инактивация *alaT* и *avtA* в валин-продуцирующем штамме снижает образование аланина примерно на 80 и 20 % соответственно (Marienhagen, Eggeling, 2008). Значительное снижение синтеза аланина (до уровня менее 0.2 г/л) наблюдается в результате инактивации обоих генов (Hou et al., 2012a). Эти данные позволяют сделать вывод, что аминотрансфераза AlaT является основной, но в синтезе аланина участвуют оба фермента. С другой стороны, в продуценте пролина инактивация *alaT* не влияет на уровень аланина, тогда как инактивация *avtA* снижает этот уровень на 48 % (Zhang et al., 2020). Более того, анализ транскриптома промышленного продуцента валина линии VWB-1 показал, что низкий уровень синтеза аланина в ней не связан с геном *alaT*, уровень транскрипции которого в этом штамме в 5.1 раза выше, чем таковой в штамме дикого типа. Предполагается, что снижение образования аланина связано с более низкой экспрессией гена *alr*, кодирующего аланинрацемазу, конвертирующую L-аланин в D-аланин (Zhang H. et al., 2018). Таким образом, нельзя дать однозначный ответ и на вопрос о том, инактивация которой из этих двух трансаминаз более выгодна с точки зрения продукции валина.

Увеличение доступности НАДФН. У *C. glutamicum* основным поставщиком НАДФН является ПФП, в котором восстановление НАДФ⁺ до НАДФН обеспечивается глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (гетеромультимерный комплекс, одна из субъединиц которого кодируется геном *zwf*) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (продукт гена *gnd*). Активность обоих ферментов подвержена негативной регуляции со стороны АТФ, НАДФН и других метаболитов (Moritz et al., 2000). Малик-фермент (НАДФ-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа) и изоцитратдегидрогеназа играют минорную роль в синтезе НАДФН из НАДФ⁺ (Bartek et al., 2010; Siedler et al., 2013). Источником НАДФ⁺ и, следовательно, НАДФН у *C. glutamicum* также может быть НАД⁺, который фосфорилируется НАД-киназой (продукт гена *ppnK*) с образованием НАДФ⁺. Этот фермент охарактеризован как полифосфат-АТФ-зависимая НАД-киназа, использующая АТФ для фосфорилирования НАД⁺ (Shi et al., 2013).

Теоретический анализ показал, что от реакций, используемых для регенерации НАДФН, существенно зависит уровень конверсии субстрата в валин. Максимальный уровень конверсии, равный 1 молью валина на 1 моль глюкозы, получается без расходования углерода на рост и синтез НАДФН. Если НАДФН обеспечивается активностью изоцитратдегидрогеназы, то показатель конверсии равен 0.5 моля валина на 1 моль глюкозы. Направление всего

потока углерода в ПФП, генерирующий НАДФН, приводит к значительно более высокой конверсии – 0.86. В этом анализе главной мишенью для перенаправления потока углерода из ЦТК в биосинтез валина оказался PDHC. Сценарий, при котором углерод вообще не расходуется на синтез НАДФН, может быть реализован за счет комбинированной активности пируваткарбоксилазы (или ФЕП-карбоксилазы), малатдегидрогеназы и малик-фермента, теоретически способного переносить водород от НАДН к НАДФ⁺ (Bartek et al., 2010). Такой путь, обозначенный как трансгидрогеназоподобный шунт, участвует в образовании НАДФН для анаэробной продукции изобутанола у *C. glutamicum* (Blombach, Eikmanns, 2011). Таким образом, усиление ПФП и активности НАД-киназы – наиболее очевидные способы увеличения пула НАДФН в клетке.

С точки зрения эффективности процесса биосинтеза валина усиление ПФП выгодно сочетать с некоторым ослаблением гликолиза. В самом деле, инактивация гена глюкозо-6-фосфатизомеразы *pgi*, направляющая поток углерода от гликолиза в ПФП, привела к более эффективной продукции валина в штамме *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta pgi$ (*pilvBNCE*) – образованию 48.0 г/л с конверсией 0.75 моль валина на 1 моль глюкозы (Blombach et al., 2008). Дальнейший анализ этого штамма показал, что инактивация *pgi* приводит к повышению внутриклеточных концентраций НАДФН и снижению образования побочных продуктов (Bartek et al., 2010). Мониторинг содержания НАДНФ в клетке с помощью НАДФН-зависимой флуоресценции также показал, что штамм *C. glutamicum*, несущий Δpgi , действительно накапливает НАДФН (Goldbeck et al., 2018).

Ухудшение роста, наблюдающееся у Δpgi -штаммов на среде с глюкозой, связывают со снижением активности PTS и предлагают преодолевать сверхэкспрессией гена *ptsG*, кодирующего глюкозо-специфичный компонент этой системы (Lindner et al., 2013). Для *pgi*-мутантов также эффективно усиление альтернативной системы транспорта глюкозы с помощью инозитолпермеаз *IoIT1*, *IoIT2* и глюкокиназы *PpgK*, которую использовали для получения продуцента лизина (Xu J.Z. et al., 2019).

Еще один подход к увеличению пула НАДФН связан с возможностью изменения специфичности гликолитических ферментов с НАД⁺ на НАДФ⁺. Он был реализован для улучшения продукции лизина – точечные мутации в гене глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *gapA*, изменившие специфичность фермента, привели к повышению продукции лизина на 35–60% (Vommarreddy et al., 2014; Xu et al., 2014).

Выше отмечено, что ферменты, синтезирующие НАДФН, подвержены негативной регуляции различными метаболитами. Поэтому одним из подходов к активации ПФП является внесение в соответствующие гены мутаций, повышающих активность ферментов. Такой подход был реализован для генов *zwf* и *gnd* в работах по созданию продуцентов метионина, пролина и рибофлавина и действительно привел к увеличению в клетках пула НАДФН и повышению уровня продукции (Wang et al., 2011; Li et al., 2016; Zhang et al., 2020).

Что касается НАД-киназы, то опубликованные к настоящему времени исследования по усилению ее активности

нацелены на продукцию изолейцина и свидетельствуют о том, что модификации, увеличивающие активность фермента (точечные мутации в гене *ppnK*, сверхэкспрессия гена *ppnK*), ведут к повышению внутриклеточной концентрации НАДФ⁺ и НАДФН и способствуют усилению биосинтеза целевого продукта (Yin et al., 2014; Zhang et al., 2020).

Другой привлекательной возможностью увеличения доступности НАДФН для биосинтеза валина является гетерологичная экспрессия генов трансгидрогеназ, таких как *pntAB* из *E. coli*, катализирующих восстановление НАДФ⁺ с участием НАДН. Ранее эта возможность использовалась для улучшения продукции лизина с помощью *C. glutamicum* (Kabus et al., 2007). Значительное увеличение внутриклеточной концентрации НАДФН наблюдалось при сочетании экспрессии *pntAB* со сверхэкспрессией гена *ppnK* (Zhan et al., 2019). Введение *PntAB* из *E. coli* в валин-продуцирующий штамм *C. glutamicum* $\Delta aceE \Delta pgi$ (*pJC4ilvBNCE*) привело к существенному снижению потока углерода в ПФП и, соответственно, к увеличению конверсии до 0.92. Это самый высокий показатель конверсии (Bartek et al., 2011), который всего на 8% ниже теоретического максимума, равного 1 моль валина на 1 моль глюкозы (Bartek et al., 2010).

Инженерия микроаэробного процесса продукции валина

При недостатке кислорода культуры *C. glutamicum* проявляют очень слабую способность к росту, однако метаболизируют сахара до органических кислот (Michel et al., 2015; Lange et al., 2018). При подавлении синтеза побочных продуктов штаммы-продуценты, адаптированные к таким условиям, показывают более высокую продуктивность, чем штаммы, требующие аэрации (Okino et al., 2008; Jojima et al., 2010, 2015; Yamamoto et al., 2013). Биосинтез валина в обычных условиях является аэробным процессом, так как осуществляется растущими культурами, активно генерирующими НАДФН. Для эффективной продукции валина при недостатке кислорода штаммам требуется комплексная модификация, затрагивающая ферменты как биосинтеза валина, так и гликолиза; такую модификацию осуществили S. Hasegawa с коллегами (2012, 2013).

В качестве базы для создания штаммов, продуцирующих валин в микроаэробных условиях, использовали штамм *C. glutamicum* R с инактивированной лактатдегидрогеназой ($\Delta ldhA$) и сверхэкспрессией генов *ilvBNCE*, кодирующих ферменты биосинтеза валина. Данный штамм не способен к продукции валина при недостатке кислорода, поскольку имеет дисбаланс кофакторов: при образовании 1 моля валина расходуется 2 моля НАДФН, а синтезируется 2 моля НАДН.

Появления продукции валина удалось достичь благодаря использованию двух подходов. Первый – изменение специфичности АНАИР с НАДФН на НАДН с помощью сайт-направленного мутагенеза гена *ilvC* (конструирование гена *ilvCTM*), а второй – замена НАДФН-зависимой трансминазы ВСАТ на НАД-зависимую лейциндегидрогеназу (*LeuDh*) из *Lysinibacillus sphaericus* (Hasegawa et al., 2012). Дополнительное введение гена *ilvN*, кодирующего мутантную регуляторную субъединицу АНАС (*ilvN^{GE}*),

устойчивую к ингибированию ВСАА, позволило создать штамм *C. glutamicum* (pCRB-BN^{GE}CTM)(pDLD)/ΔLDH), который в микроаэробных условиях при периодической ферментации с подпиткой продуцировал 172.2 г/л валина в течение 24 ч, что превышало исходный показатель более чем в 20 раз. Уровень конверсии составил 0.63 моль валина на моль глюкозы (Hasegawa et al., 2012).

Однако, помимо валина, клетки данного штамма накапливали значительные количества аланина, ацетата и сукцината в качестве побочных продуктов. Чтобы исключить их образование и повысить выход валина, в штамм были введены дополнительные модификации (Hasegawa et al., 2013). Образование сукцината через ФЕП и ОА подавили инактивацией гена *ppc*, но это привело к снижению синтеза валина и поглощения глюкозы, так как внутриклеточное соотношение НАДН/НАД⁺ заметно повысилось. Чтобы вернуть соотношение на благоприятный для продукции валина уровень, инактивировали три гена, участвующих в синтезе ацетата (*pta*, *ackA*, *ctfA*), и усилили экспрессию пяти генов (*gapA*, *pyk*, *pfkA*, *pgi*, *tpi*), кодирующих ферменты гликолиза. В результате продукция валина выросла в 9 раз, поглощение глюкозы – в 7.6 раза. Поскольку биосинтез валина стал НАДН-зависимым процессом, увеличение активности гликолитических ферментов оказалось выгодным с точки зрения накопления как пирувата, так и восстановительных эквивалентов.

Уменьшения образования аланина добились инактивацией гена *avtA*. Кроме того, гены *ilvN^{GE}* и *ilvCTM*, которые ранее экспрессировались на плазмиде, были помещены в хромосому. Продуктивность нового штамма по валину составила 149.9 г/л за 24 ч культивирования. Конверсия достигла 0.88 моля валина на моль глюкозы, что значительно превысило показатели, полученные на первом этапе (Hasegawa et al., 2013).

Следует отметить, что в обеих работах синтез валина в микроаэробных условиях изучали с использованием нерастущих клеток, предварительно сконцентрированных центрифугированием в 2–3 раза. В этом случае измеренная концентрация валина достигала очень высоких значений, но продуктивность на клетку была сопоставимой с продуктивностью, продемонстрированной в других исследованиях.

Замена специфичности ферментов с НАДФН на НАДН для адаптации процесса производства аминокислот к микроаэробным условиям была осуществлена также при разработке продуцента валина на базе *E. coli* (Savrasova, Stoyanova, 2019) и продуцентов лейцина и L-орнитина на базе *C. glutamicum* (Jiang et al., 2013; Wang et al., 2019b). Во всех случаях это привело к увеличению выхода целевого продукта.

Инженерия транспорта валина

Микроорганизмы располагают множеством транспортных систем, обеспечивающих поглощение клетками нужных компонентов среды и освобождение от метаболитов, избыток которых может оказаться токсичным (Pérez-García, Wendisch, 2018). Активность таких систем зависит от концентрации транспортируемых веществ, поэтому долгое время считалось, что для эффективного вывода целевых продуктов штаммам-продуцентам достаточно соб-

ственных регуляторных механизмов (Jones et al., 2015). Инженерию транспорта затрудняют сложность его количественной оценки и тот факт, что специфические транспортеры известны не для каждого из биотехнологически значимых веществ. Однако в последние годы растет число исследований, показавших влияние направленного изменения экспорта и импорта целевого продукта на продуктивность штаммов (Eggeling, 2016). Транспортеры валина у коринебактерий обнаружены и охарактеризованы, а значит, являются перспективным объектом модификаций при создании продуцентов.

Импорт валина. Поглощение валина, лейцина и изолейцина у коринебактерий происходит в ходе вторичного Na⁺-зависимого симпорта, осуществляемого при помощи единственного известного импортера – BrnQ (Ebbighausen et al., 1989). Наибольшее сродство BrnQ проявляет к изолейцину, для валина и лейцина этот показатель в 1.7 раза ниже (Ebbighausen et al., 1989; Tauch et al., 1998). Данных о регуляции BrnQ и соответствующего гена у коринебактерий крайне мало. Известно, что BrnQ активируется при повышении внутриклеточной концентрации ВСАА (Boles et al., 1993) и что инактивация гена *brnQ* увеличивает экспорт изолейцина из клеток *C. glutamicum* и его продукцию (Xie et al., 2012). Отмечается, что аналогичная модификация благоприятствует росту и продуктивности изолейцин-продуцирующего штамма WM001 на ранних стадиях ферментации (Zhang et al., 2020). Значение импортера для продукции валина подтверждается транскриптомным анализом промышленного продуцента VWB-1, показавшим, что уровень транскрипции гена *brnQ* в этом штамме ниже, чем в штамме дикога типа (Zhang H. et al., 2018).

Экспорт валина. За выведение ВСАА из клеток *C. glutamicum* отвечает транспортная система BrnFE (Eggeling, Sahm, 2003). Аминокислоты экспортируются в ходе вторичного H⁺-зависимого процесса, управляемого мембранным потенциалом (Hermann, Kramer, 1996). Транспортная система BrnFE – единственный известный экспортер валина, лейцина и изолейцина у *C. glutamicum*; также она переносит метионин и гомосерин – предшественник метионина, изолейцина и треонина (Kennerknecht et al., 2002; Trotschel et al., 2005; Yin et al., 2013; Qin et al., 2015; Li et al., 2020a). Гены *brnF* и *brnE*, кодирующие, соответственно, большую и малую субъединицы транспортной системы, организованы в один оперон, контролируемый транскрипционным регулятором Lrp (leucine responsive protein) (Kennerknecht et al., 2002; Lange et al., 2012). Гомологи Lrp, впервые обнаруженного и охарактеризованного в *E. coli*, присутствуют в геномах различных прокариот и регулируют гены, задействованные в метаболизме аминокислот (Brinkman et al., 2003). У *C. glutamicum* ген *lrp* расположен дивергентно перед опероном *brnFE*. Связываясь с ВСАА или метионином, Lrp переходит в активное состояние и в свою очередь активирует промотор *brnFE* (Kennerknecht et al., 2002; Lange et al., 2012) (рис. 3). Влияние концентрации аминокислот в клетке на активность Lrp уменьшается в ряду лейцин > метионин > изолейцин > валин (Lange et al., 2012).

Изучение промышленных продуцентов лейцина и валина подтверждает, что высокий уровень продукции аминокислот коррелирует с высоким уровнем экспрессии

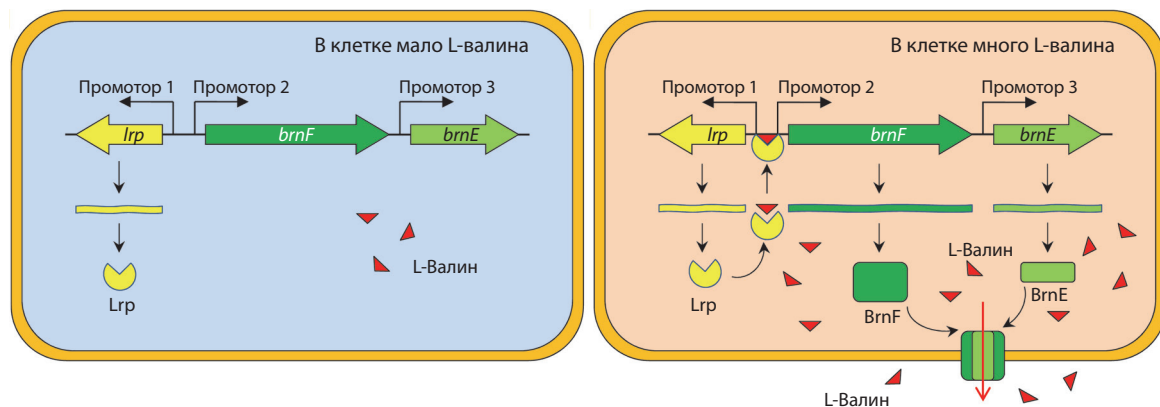


Рис. 3. Организация оперона *brnFE* у *C. glutamicum* и регуляция его экспрессии (из обзора (Wang et al., 2018)).

оперона *brnFE* (Vogt et al., 2014; Zhang H. et al., 2018) или связан с увеличением количества копий генов *lrp* и *brnFE* (Ma et al., 2018a).

Анализ влияния оперона *brnFE* на продукцию валина показал, что его сверхэкспрессия не сказывается на росте клеток *C. glutamicum* и увеличивает продукцию валина примерно в 2–3 раза (Chen et al., 2015). Аналогичный эффект сверхэкспрессия *brnFE* оказывает на продукцию изолейцина, метионина и гомосерина (Qin et al., 2015; Li et al., 2020a; Zhang et al., 2021). Максимальный эффект на продукцию изолейцина был получен при одновременном усилении экспрессии *lrp* и *brnFE* (Yin et al., 2013).

Однако выяснилось, что, в отличие от *brnFE*, сверхэкспрессия гена *lrp* подавляет рост клеток (Chen et al., 2015), хотя также существенно повышает продукцию валина. Негативный эффект был нивелирован использованием ослабленной мутантной формы данного гена *lrp*₁, обнаруженной у штамма VWB-1. Сверхэкспрессия *lrp*₁ в штамме *C. glutamicum* дикого типа привела к 16-кратному увеличению продукции валина – с 1.9 до 30.2 ммоль/л за 96 ч культивирования. Сочетание сверхэкспрессии *lrp*₁ и *brnFE* усилило эффект. На продукции изолейцина подобные манипуляции сказались незначительно, из чего авторы исследования заключили, что изолейцин – менее подходящий субстрат для BrnFE, чем валин (Chen et al., 2015). Одновременное усиление экспрессии обоих генов, *lrp* и *brnFE*, в сочетании со сверхэкспрессией генов *ilvBNC* и инактивацией *aceE*, *alaT* и *ilvA*, позволило создать штамм, который продуцировал 437 мМ (51 г/л) валина при ферментации с подпиткой (Chen et al., 2015).

Таким образом, модификации систем транспорта ВСАА, направленные на уменьшение притока аминокислот в клетку и увеличение их секреции из клетки, позитивно влияют на продукцию этих аминокислот (Xie et al., 2012).

Заключение

В последние годы интерес к использованию валина в качестве кормовой добавки существенно вырос. Только в Российской Федерации потребление валина за последние пять лет увеличилось почти в 10 раз и достигло 5000 т в год. Современное промышленное производство валина

базируется на микробиологическом синтезе с использованием возобновляемого растительного сырья и штаммов-продуцентов с измененной генетической программой. Эффективность производства аминокислот в большей степени зависит от продуктивности штаммов-продуцентов, которые являются ключевым элементом всей технологической цепочки. Несмотря на значительный прогресс в создании штаммов-продуцентов (см. таблицу), создание новых штаммов с уникальными характеристиками по-прежнему актуально.

Обращает на себя внимание высокий потенциал процессов со сниженной аэрацией, разработанных в последнее время, по сравнению с традиционными аэробными процессами продукции валина. Однако необходимо отметить, что такие процессы являются двухфазными: в первой фазе аэробно нарабатывается биомасса, во второй происходит биосинтез валина в микроаэробных условиях. В настоящее время двухфазные процессы показывают низкую эффективность, требуются дополнительные исследования в этой области.

Сейчас основным подходом к созданию валин-продуцирующих штаммов, пришедшим на смену случайному мутагенезу, является рациональная метаболическая инженерия, направленная на усиление процесса биосинтеза валина и минимизацию образования побочных продуктов. В последние годы этот подход активно обогащают применением методов системной инженерии и синтетической биологии. Комбинированный анализ «омических» данных расширяет наши знания о метаболических и регуляторных процессах *C. glutamicum* и позволяет вырабатывать новые стратегии создания продуцентов валина и других аминокислот. Реализации этих стратегий должны помочь появившиеся недавно системы быстрого редактирования генома, ускоряющие процесс получения новых штаммов.

Дальнейший прогресс в создании штаммов-продуцентов будет связан с переходом от изучения свойств популяции клеток к изучению свойств отдельных клеток (Harst et al., 2017; Hemmerich et al., 2018; Pérez-García et al., 2018), а также с широким применением компьютерного моделирования (Koduru et al., 2018) и использованием новых знаний о регуляции экспрессии генов (Dostálová et al., 2017; Shi et al., 2018; Zhang S. et al., 2018; Xu N. et al., 2019).

Подходы, отработанные при создании и совершенствовании продуцентов валина, могут быть использованы для создания продуцентов других ВСАА и пантотената – веществ, которые также обладают значительным рыночным потенциалом.

Список литературы / References

- Рябченко Л.Е., Герасимова Т.В., Леонова Т.Е., Калинина Т.И., Шереметьева М.Е., Ануфриев К.Э., Яненко А.С. Пат. RU 2753996 С1. Бактерия *Corynebacterium glutamicum* с повышенной способностью продуцировать L-валин и способ получения L-валина с использованием этой бактерии. Опул. 25.08.2021. Бюл. № 24. [Ryabchenko L.E., Gerasimova T.V., Leonova T.E., Kalinina T.I., Sheremetieva M.E., Anufriev K.E., Yanenko A.S. Patent RU 2753996 C1. Bacterium *Corynebacterium glutamicum* with increased ability to produce L-valine and method for producing L-valine using this bacterium. Date of publication: 25.08.2021. Bull. No. 24. (in Russian)]
- 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. DOI 10.1007/s00253-018-8896-6.
- Bartek T., Blombach B., Lang S., Eikmanns B.J., Wiechert W., Oldiges M., Noh K., Noack S. Comparative C-13 metabolic flux analysis of pyruvate dehydrogenase complex-deficient, L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(18):6644-6652. DOI 10.1128/aem.00575-11.
- Bartek T., Blombach B., Zonnchen E., Makus P., Lang S., Eikmanns B.J., Oldiges M. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Prog.* 2010;26(2):361-371. DOI 10.1002/btpr.345.
- Bartek T., Makus P., Klein B., Lang S., Oldiges M. Influence of L-isoleucine and pantothenate auxotrophy for L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum* revisited by metabolome analysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2008;31(3):217-225. DOI 10.1007/s00449-008-0202-z.
- Blombach B., Arndt A., Auchter M., Eikmanns B.J. L-valine production during growth of pyruvate dehydrogenase complex deficient *Corynebacterium glutamicum* in the presence of ethanol or by inactivation of the transcriptional regulator SugR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(4):1197-1200. DOI 10.1128/aem.02351-08.
- Blombach B., Eikmanns B.J. Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioeng. Bugs.* 2011;2(6):346-350. DOI 10.4161/bbug.2.6.17845.
- Blombach B., Schreiner M.E., Bartek T., Oldiges M., Eikmanns B.J. *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;79(3):471-479. DOI 10.1007/s00253-008-1444-z.
- Blombach B., Schreiner M.E., Holátko J., Bartek T., Oldiges M., Eikmanns B.J. (L)-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(7):2079-2084. DOI 10.1128/aem.02826-06.
- Boles E., Ebbighausen H., Eikmanns B., Krämer R. Unusual regulation of the uptake system for branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 1993;159:147-152. DOI 10.1007/BF00250275.
- Bommareddy R.R., Chen Z., Rappert S., Zeng A.P. A *de novo* NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Metab. Eng.* 2014;25: 30-37. DOI 10.1016/j.ymben.2014.06.005.
- Brinkman A.B., Ettema T.J., de Vos W.M., van der Oost J. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.* 2003;48(2): 287-294. DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03442.x.
- Buchholz J., Schwentner A., Brunnenkan B., Gabris C., Grimm S., Gerstmeir R., Takors R., Eikmanns B.J., Blombach B. Platform engineering of *Corynebacterium glutamicum* with reduced pyruvate dehydrogenase complex activity for improved production of L-lysine, L-valine, and 2-ketoisovalerate. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(18):5566-5575. DOI 10.1128/AEM.01741-13.
- Burkovski A. I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 2003;179(2):83-88. DOI 10.1007/s00203-002-0505-4.
- Chassagnole C., Létisse F., Diano A., Lindley N.D. Carbon flux analysis in a pantothenate overproducing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Mol. Biol. Rep.* 2002;29(1-2):129-134. DOI 10.1023/a:1020353124066.
- Che L., Xu M., Gao K., Wang L., Yang X., Wen X., Xiao H., Li M., Jiang Z. Mammary tissue proteomics in a pig model indicates that dietary valine supplementation increases milk fat content via increased *de novo* synthesis of fatty acid. *Food Sci. Nutr.* 2021;9(11): 6213-6223. DOI 10.1002/fsn3.2574.
- 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. DOI 10.1016/j.ymben.2015.03.004.
- Chen X.H., Liu S.R., Peng B., Li D., Cheng Z.X., Zhu J.X., Zhang S., Peng Y.M., Li H., Zhang T.T., Peng X.X. Exogenous L-valine promotes phagocytosis to kill multidrug-resistant bacterial pathogens. *Front. Immunol.* 2017;8:207. DOI 10.3389/fimmu.2017.00207.
- Cordes C., Möckel B., Eggeling L., Sahn H. Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 1992;112(1):113-116. DOI 10.1016/0378-1119(92)90311-c.
- Denina I., Paegle L., Prouza M., Holátko J., Pátek M., Nesvera J., Ruklisha M. Factors enhancing L-valine production by the growth-limited L-isoleucine auxotrophic strain *Corynebacterium glutamicum* DeltailvA DeltailvB ilvNM13 (pECKAilvBNC). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010;37(7):689-699. DOI 10.1007/s10295-010-0712-y.
- D'Este M., Alvarado-Morales M., Angelidaki I. Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. *Biotechnol. Adv.* 2017;36(1):14-25. DOI 10.1016/j.biotechadv.2017.09.001.
- Dimou A., Tsimihodimos V., Bairaktari E. The critical role of the branched chain amino acids (BCAAs) catabolism-regulating enzymes, branched-chain aminotransferase (BCAT) and branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKD), in human pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(7):4022. DOI 10.3390/ijms23074022.
- 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(1):133. DOI 10.1186/s13568-017-0436-8.
- Dusch N., Pühler A., Kalinowski J. Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate-alpha-decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65(4):1530-1539. DOI 10.1128/AEM.65.4.1530-1539.1999.
- Ebbighausen H., Weil B., Krämer R. Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 1989; 151(3):238-244. DOI 10.1007/BF00413136.
- Eggeling L., Cordes C., Eggeling L., Sahn H. Regulation of aceto-hydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of alpha-ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1987;25(4):346-351. DOI 10.1007/BF00252545.
- Eggeling L. Exporters for production of amino acids and other small molecules. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2016;159:199-225. DOI 10.1007/10_2016_32.
- Eggeling L., Sahn H. New ubiquitous translocators: amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 2003;180(3):155-160. DOI 10.1007/s00203-003-0581-0.
- Eikmanns B., Blombach B. The pyruvate dehydrogenase complex of *Corynebacterium glutamicum*: an attractive target for metabolic engineering. *J. Biotechnol.* 2014;192(Pt. B):339-345. DOI 10.1016/j.jbiotec.2013.12.019.
- Elišáková V., Pátek M., Holátko J., Nesvera J.N., Leyval D., Goergen J.L., Delaunay S. Feedback-resistant aceto-hydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutami-*

- cum. Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(1):207-213. DOI 10.1128/aem.71.1.207-213.2005.
- Engels V., Wendisch V.F. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2007;189(8):2955-2966. DOI 10.1128/JB.01596-06.
- Goldbeck O., Eck A.W., Seibold G.M. Real time monitoring of NADPH concentrations in *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* via the genetically encoded sensor mBFP. *Front. Microbiol.* 2018;9:2564. DOI 10.3389/fmicb.2018.02564.
- Guo Y., Han M., Xu J., Zhang W. Analysis of acetohydroxyacid synthase variants from branched-chain amino acids-producing strains and their effects on the synthesis of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Protein Expr. Purif.* 2015;109:106-112. DOI 10.1016/j.pep.2015.02.006.
- Guo Y., Han M., Yan W., Xu J., Zhang W. Generation of branched-chain amino acids resistant *Corynebacterium glutamicum* acetohydroxy acid synthase by site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2014;19:456-467. DOI 10.1007/s12257-013-0843-x.
- Han G., Xu N., Sun X., Chen J., Chen C., Wang Q. Improvement of L-valine production by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Omega.* 2020;5(10):4751-4758. DOI 10.1021/acsomega.9b02747.
- 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. DOI 10.1016/j.jprot.2017.03.01.
- Hasegawa S., Suda M., Uematsu K., Natsuma Y., Hiraga K., Jojima T., Inui M., Yukawa H. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(4):1250-1257. DOI 10.1128/aem.02806-12.
- Hasegawa S., Uematsu K., Natsuma Y., Suda M., Hiraga K., Jojima T., Inui M., Yukawa H. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78(3):865-875. DOI 10.1128/aem.07056-11.
- 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.* 2018;14(9):e1800428. DOI 10.1002/biot.201800428.
- Hermann T., Kramer R. Mechanism and regulation of isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62(9):3238-3244. DOI 10.1128/aem.62.9.3238-3244.1996.
- Holátko J., Elišáková V., Prouza M., Sobotka M., Nesvera J., Patek M. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *J. Biotechnol.* 2009;139(3):203-210. DOI 10.1016/j.jbiotec.2008.12.005.
- Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr. Metab. (Lond).* 2018;15:33. DOI 10.1186/s12986-018-0271-1.
- Holen J.P., Tokach M.D., Woodworth J.C., DeRouchey J.M., Gebhardt J.T., Titgemeyer E.C., Goodband R.D. A review of branched-chain amino acids in lactation diets on sow and litter growth performance. *Transl. Anim. Sci.* 2022;6(1):txac017. DOI 10.1093/tas/txac017.
- Hou X.H., Chen X.D., Zhang Y., Qian H., Zhang W.G. L-valine production with minimization of by-products' synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum*. *Amino Acids.* 2012a;43(6):2301-2311. DOI 10.1007/s00726-012-1308-9.
- Hou X.H., Ge X.Y., Wu D., Qian H., Zhang W.G. Improvement of L-valine production at high temperature in *Brevibacterium flavum* by overexpressing *ilvEBN(r)C* genes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012b;39(1):63-72. DOI 10.1007/s10295-011-1000-1.
- Jian H., Miao S., Liu Y., Li H., Zhou W., Wang X., Dong X., Zou X. Effects of dietary valine levels on production performance, egg quality, antioxidant capacity, immunity, and intestinal amino acid absorption of laying hens during the peak lay period. *Animals (Basel).* 2021;11(7):1972. DOI 10.3390/ani11071972.
- Jiang L.Y., Zhang Y.Y., Li Z., Liu J.Z. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for increasing the production of L-ornithine by increasing NADPH availability. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013;40(10):1143-1151. DOI 10.1007/s10295-013-1306-2.
- Jojima T., Fujii M., Mori E., Inui M., Yukawa H. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;87(1):159-165. DOI 10.1007/s00253-010-2493-7.
- Jojima T., Noburyu R., Sasaki M., Tajima T., Suda M., Yukawa H., Inui M. Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015;99(3):1165-1172. DOI 10.1007/s00253-014-6223-4.
- Jones C.M., Hernandez Lozada N.J., Pfleger B.F. Efflux systems in bacteria and their metabolic engineering applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015;99(22):9381-9393. DOI 10.1007/s00253-015-6963-9.
- Kabus A., Georgi T., Wendisch V.F., Bott M. Expression of the *Escherichia coli pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;75(1):47-53. DOI 10.1007/s00253-006-0804-9.
- Kainulainen H., Hulmi J.J., Kujala U.M. Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2013;41(4):194-200. DOI 10.1097/JES.0b013e3182a4e6b6.
- Kang K.Y., Kim M.S., Lee M.S., Oh J.J., An S., Park D., Heo I.K., Lee H.K., Song S.W., Kim S.D. Genotoxicity and acute toxicity evaluation of the three amino acid additives with *Corynebacterium glutamicum* biomass. *Toxicol. Rep.* 2020;7:241-253. DOI 10.1016/j.toxrep.2020.01.013.
- Karau A., Grayson I. Amino acids in human and animal nutrition. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014;143:189-228. DOI 10.1007/10_2014_269.
- 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. DOI 10.1080/09168451.2018.1527211.
- Kawaguchi T., Izumi N., Charlton M.R., Sata M. Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease. *Hepatology.* 2011;54(3):1063-1070. DOI 10.1002/hep.24412.
- Keilhauer C., Eggeling L., Sahm H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 1993;175(17):5595-5603. DOI 10.1128/jb.175.17.5595-5603.1993.
- Kennerknecht N., Sahm H., Yen M.R., Pátek M., Saier M.H. Jr., Eggeling L. Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J. Bacteriol.* 2002;184(14):3947-3956. DOI 10.1128/jb.184.14.3947-3956.2002.
- Koduru L., Lakshmanan M., Lee D.Y. In silico model-guided identification of transcriptional regulator targets for efficient strain design. *Microb. Cell Fact.* 2018;17(1):167. DOI 10.1186/s12934-018-1015-7.
- Krause F.S., Blombach B., Eikmanns B.J. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010a;76(24):8053-8061. DOI 10.1128/aem.01710-10.
- Krause F.S., Henrich A., Blombach B., Kramer R., Eikmanns B.J., Seibold G.M. Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use of maltose, and its application for the improvement of L-valine productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010b;76(1):370-374. DOI 10.1128/aem.01553-09.
- 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. DOI 10.1016/j.jbiotec.2011.06.003.
- Lange J., Münch E., Müller J., Busche T., Kalinowski J., Takors R., Blombach B. Deciphering the adaptation of *Corynebacterium glutamicum* in transition from aerobiosis via microaerobiosis to anaerobiosis. *Genes (Basel)*. 2018;9(6):297. DOI 10.3390/genes9060297.
- Lee D., Hong J., Kim K.J. Crystal structure and biochemical characterization of ketol-acid reductoisomerase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67(31):8527-8535. DOI 10.1021/acs.jafc.9b03262.
- Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005;69(1):1-8. DOI 10.1007/s00253-005-0155-y.
- Leyval D., Uy D., Delaunay S., Goergen J.L., Engasser J.M. Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 2003;104(1-3):241-252. DOI 10.1016/s0168-1656(03)00162-7.
- Li N., Xu S., Du G., Chen J., Zhou J. Efficient production of L-homoserine in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 by redistribution of metabolic flux. *Biochem. Eng. J.* 2020a;161:107665. DOI 10.1016/j.bej.2020.107665.
- Li N., Zeng W., Xu S., Zhou J. Obtaining a series of native gradient promoter-5'-UTR sequences in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Microb. Cell. Fact.* 2020b;19(1):120. DOI 10.1186/s12934-020-01376-3.
- Li Y., Cong H., Liu B., Song J., Sun X., Zhang J., Yang Q. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016;109(9):1185-1197. DOI 10.1007/s10482-016-0719-0.
- Lindner S.N., Petrov D.P., Hagmann C.T., Henrich A., Krämer R., Eikmanns B.J., Wendisch V.F., Seibold G.M. Phosphotransferase system-mediated glucose uptake is repressed in phosphoglucosyltransferase-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(8):2588-2595. DOI 10.1128/AEM.03231-12.
- Liu Y., Li Y., Wang X. Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100(20):8633-8649. DOI 10.1007/s00253-016-7809-9.
- Liu Y., Wang X., Zhan J., Hu J. The 138th residue of acetohydroxyacid synthase in *Corynebacterium glutamicum* is important for the substrate binding specificity. *Enzyme Microb. Technol.* 2019;129:109357. DOI 10.1016/j.enzmictec.2019.06.001.
- Liu Y., Zhang C., Zhang Y., Jiang X., Liang Y., Wang H., Li Y., Sun G. Association between excessive dietary branched-chain amino acids intake and hypertension risk in chinese population. *Nutrients*. 2022;14(13):2582. DOI 10.3390/nu14132582.
- 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.* 2018a;28(11):1916-1927. DOI 10.4014/jmb.1805.05013.
- Ma Y., Cui Y., Du L., Liu X., Xie X., Chen N. Identification and application of a growth-regulated promoter for improving L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell. Fact.* 2018b;17(1):185. DOI 10.1186/s12934-018-1031-7.
- Magnus J.B., Oldiges M., Takors R. The identification of enzyme targets for the optimization of a valine producing *Corynebacterium glutamicum* strain using a kinetic model. *Biotechnol. Prog.* 2009;25(3):754-762. DOI 10.1002/btpr.184.
- Marienhagen J., Eggeling L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases AlaT and AvtA and impact on L-valine production. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74(24):7457-7462. DOI 10.1128/AEM.01025-08.
- Marienhagen J., Kennerknecht N., Sahn H., Eggeling L. Functional analysis of all aminotransferase proteins inferred from the genome sequence of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2005;187(22):7639-7646. DOI 10.1128/JB.187.22.7639-7646.2005.
- Marx A., Striegel K., de Graaf A.A., Sahn H., Eggeling L. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng.* 1997;56(2):168-180. DOI 10.1002/(SICI)1097-0290(19971020)56:2<168::AID-BIT6>3.0.CO;2-N.
- Michel A., Koch-Koerfges A., Krumbach K., Brocker M., Bott M. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* via mixed-acid fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015;81(21):7496-7508. DOI 10.1128/AEM.02413-15.
- Möckel B., Eggeling L., Sahn H. Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 1992;174(24):8065-8072. DOI 10.1128/jb.174.24.8065-8072.1992.
- Morbach S., Junger C., Sahn H., Eggeling L. Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site. *J. Biosci. Bioeng.* 2000;90(5):501-507. DOI 10.1016/S1389-1723(01)80030-X.
- Moritz B., Striegel K., De Graaf A.A., Sahn H. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* 2000;267(12):3442-3452. DOI 10.1046/j.1432-1327.2000.01354.x.
- Okino S., Suda M., Fujikura K., Inui M., Yukawa H. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;78(3):449-454. DOI 10.1007/s00253-007-1336-7.
- Park J.H., Lee S.Y. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;85(3):491-506. DOI 10.1007/s00253-009-2307-y.
- Pérez-García F., Jorge J.M.P., Dreyszas A., Risse J.M., Wendisch V.F. Efficient production of the dicarboxylic acid glutarate by *Corynebacterium glutamicum* via a novel synthetic pathway. *Front. Microbiol.* 2018;9:2589. DOI 10.3389/fmicb.2018.02589.
- Pérez-García F., Wendisch V.F. Transport and metabolic engineering of the cell factory *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018;365(16):fny166. DOI 10.1093/femsle/fny166.
- Qin T., Hu X., Hu J., Wang X. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC13032 to produce L-methionine. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015;62(4):563-673. DOI 10.1002/bab.1290.
- Radmacher E., Vaitsikova A., Burger U., Krumbach K., Sahn H., Eggeling L. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(5):2246-2250. DOI 10.1128/aem.68.5.2246-2250.2002.
- Ruklisha M., Paegle L., Denina I. L-Valine biosynthesis during batch and fed-batch cultivations of *Corynebacterium glutamicum*: Relationship between changes in bacterial growth rate and intracellular metabolism. *Proc. Biochem.* 2007;40(4):634-640. DOI 10.1016/j.procbio.2006.11.008.
- Sahn H., Eggeling L. D-pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65(5):1973-1979. DOI 10.1128/AEM.65.5.1973-1979.1999.
- Savrasova E.A., Stoyanova N.V. Application of leucine dehydrogenase Bcd from *Bacillus subtilis* for L-valine synthesis in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Heliyon*. 2019;5(4):e01406. DOI 10.1016/j.heliyon.2019.e01406.
- 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. DOI 10.1016/j.ymben.2018.02.015.
- Shi F., Li K., Huan X., Wang X. Expression of NAD(H) kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase improve NADPH supply and L-isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013;171(2):504-521. DOI 10.1007/s12010-013-0389-6.

- 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. DOI 10.1186/s13568-018-0595-2.
- Shou J., Chen P.J., Xiao W.H. The effects of BCAAs on insulin resistance in athletes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2019;65(5):383-389. DOI 10.3177/jnsv.65.383.
- Siedler S., Lindner S.N., Bringer S., Wendisch V.F., Bott M. Reductive whole-cell biotransformation with *Corynebacterium glutamicum*: improvement of NADPH generation from glucose by a cyclized pentose phosphate pathway using *pfkA* and *gapA* deletion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013;97(1):143-152. DOI 10.1007/s00253-012-4314-7.
- Tarutina M.G., Raevskaya N.M., Shustikova T.E., Ryabchenko L.E., Yanenko A.S. Assessment of effectiveness of *Corynebacterium glutamicum* promoters and their application for the enhancement of gene activity in lysine-producing bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016;52(7):692-698. DOI 10.1134/S0003683816070073.
- Tauch A., Hermann T., Burkovski A., Kramer R., Puhler A., Kalinowski J. Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product. *Arch. Microbiol.* 1998;169(4):303-312. DOI 10.1007/s002030050576.
- Trotschel C., Deutenberg D., Bathe B., Burkovski A., Kramer R. Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2005;187(11):3786-3794. DOI 10.1128/jb.187.11.3786-3794.2005.
- Vasicová P., Pátek M., Nesvera J., Sahm H., Eikmanns B. Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* promoter. *J. Bacteriol.* 1999; 181(19):6188-6191. DOI 10.1128/JB.181.19.6188-6191.1999.
- Vogt M., Haas S., Klaffl S., Polen T., Eggeling L., van Ooyen J., Bott M. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction. *Metab. Eng.* 2014;22:40-52. DOI 10.1016/j.ymben.2013.12.001.
- Wang X., Zhang H., Quinn P.J. Production of L-valine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018;102(10):4319-4330. DOI 10.1007/s00253-018-8952-2.
- Wang Y.Y., Shi K., Chen P., Zhang F., Xu J.Z., Zhang W.G. Rational modification of the carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to enhance L-leucine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2020;47(6-7):485-495. DOI 10.1007/s10295-020-02282-8.
- Wang Y.Y., Xu J.Z., Zhang W.G. Metabolic engineering of L-leucine production in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019a;39(5):633-647. DOI 10.1080/07388551.2019.1577214.
- Wang Y.Y., Zhang F., Xu J.Z., Zhang W.G., Chen X.L., Liu L.M. Improvement of L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by altering the redox flux. *Int. J. Mol. Sci.* 2019b;20(8):2020. DOI 10.3390/ijms20082020.
- Wang Z., Chen T., Ma X., Shen Z., Zhao X. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol.* 2011;102(4):3934-3940. DOI 10.1016/j.biortech.2010.11.120.
- Wei H., Ma Y., Chen Q., Cui Y., Du L., Ma Q., Li Y., Xie X., Chen N. Identification and application of a novel strong constitutive promoter in *Corynebacterium glutamicum*. *Ann. Microbiol.* 2018;68:375-382. DOI 10.1007/s13213-018-1344-0.
- 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. DOI 10.1111/1751-7915.12013.
- Xie X., Xu L., Shi J., Xu Q., Chen N. Effect of transport proteins on L-isoleucine production with the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2012;39(10):1549-1556. DOI 10.1007/s10295-012-1155-4.
- Xu J., Han M., Zhang J., Guo Y., Zhang W. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for the L-lysine production by increasing the flux into L-lysine biosynthetic pathway. *Amino Acids*. 2014;46(9):2165-2175. DOI 10.1007/s00726-014-1768-1.
- Xu J.Z., Yu H.B., Han M., Liu L.M., Zhang W.G. Metabolic engineering of glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2019;46(7):937-949. DOI 10.1007/s10295-019-02170-w.
- 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. DOI 10.1007/s11274-019-2606-0.
- Yamamoto K., Tsuchisaka A., Yukawa H. Branched-chain amino acids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2017;159:103-128. DOI 10.1007/10_2016_28.
- Yamamoto S., Suda M., Niimi S., Inui M., Yukawa H. Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 110(11):2938-2948. DOI 10.1002/bit.24961.
- 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. DOI 10.1111/jam.12141.
- Yin L., Zhao J., Chen C., Xu X., Wang X. Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2014;19:132-142. DOI 10.1007/s12257-013-0416-z.
- Zhan M., Kan B., Dong J., Xu G., Han R., Ni Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved L-arginine synthesis by enhancing NADPH supply. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2019;46(1):45-54. DOI 10.1007/s10295-018-2103-8.
- 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.* 2018;8(1):3632. DOI 10.1038/s41598-018-21926-5.
- Zhang J., Qian F., Dong F., Wang Q., Yang J., Jiang Y., Yang S. De novo engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-proline production. *ACS Synth. Biol.* 2020;9(7):1897-1906. DOI 10.1021/acssynbio.0c00249.
- 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. DOI 10.1007/s10529-018-2539-y.
- 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. DOI 10.1002/bab.1963.
- Zheng L., Zuo F., Zhao S., He P., Wei H., Xiang Q., Pang J., Peng J. Dietary supplementation of branched-chain amino acids increases muscle net amino acid fluxes through elevating their substrate availability and intramuscular catabolism in young pigs. *Br. J. Nutr.* 2017;117(7):911-922. DOI 10.1017/S0007114517000757.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.08.2022. После доработки 26.10.2022. Принята к публикации 26.10.2022.