

УДК 577.217; 577.218

МЕТАБОЛІЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ШТАМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Г.С. АНДРІЯШ¹, О.С. СЕКАН^{1,2}, О.О. ТІГУНОВА¹, Я.Б. БЛЮМ¹, С.М. ШУЛЬГА¹

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, Україна

² Технологічний університет Люлеа, Департамент технології та дослідження деревини, Скеллефтеа, Швеція

E-mail: Shulga5@i.ua, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Огляд присвячено аналізу сучасних досягнень метаболічної інженерії *Corynebacterium glutamicum* для продукування лізину. Розглянуто ключові гени біосинтезу лізину у *C. glutamicum* та шляхи створення нових генетично модифікованих штамів. Описана роль різних плазмід, конструювання векторних касет та види промоторів для регуляції експресії генів у *C. glutamicum*. Наведено інформацію з використання вуглецевмісних субстратів (гексоз, пентоз, молочної кислоти, манітолу) для виробництва лізину. Розглянуто можливості використання технології CRISPR в генетичній інженерії *C. glutamicum*. Генетичні зміни *C. glutamicum* дозволили використання альтернативних субстратів та сприяли підвищенню рівня накопичення лізину в культуральній рідині. Узагальнено дані, які можуть слугувати для створення нових штамів-надпродуцентів лізину.

Ключові слова: *Corynebacterium glutamicum*, штам-продуцент, мікробіологічний синтез, лізин, метаболічна інженерія.

Вступ

Corynebacterium glutamicum сьогодні є одним із найпопулярніших інструментів «білої біотехнології» завдяки здатності синтезувати у великих кількостях широкий спектр амінокислот [1, 2]. Окрім цього, *C. glutamicum* також займає одне з провідних місць як модельний організм для вивчення метаболічних шляхів синтезу цільових продуктів, зручний для генетичних маніпуляцій, тощо [3–6]. Низька протеазна активність *C. glutamicum* є його перева-

гою перед іншими промисловими видами мікроорганізмів, такими як *Escherichia coli* та *Saccharomyces cerevisiae* у виробництві біоорганічних продуктів та хімікатів [7]. Разом з цим, бактерія здатна продукувати повноцінні функціональні протеїни. Окрім цього, досить широкої популярності набули генетично скореговані штами коринебактерій з низьким рівнем каталітичної активності, а приналежність цього виду бактерій до групи GRAS (generally regarded as safe) дає змогу долучити його до синтезу протеїнів у фармацевтичному секторі та використовувати у харчовій промисловості [8]. Існує постійний інтерес в створенні нових генетично модифікованих штамів з удосконаленим метаболічним потенціалом з огляду на ряд переваг *C. glutamicum*. Як правило, це стосується саме генетичних маніпуляцій для корегування метаболічних шляхів. В світлі сучасного стрімкого розвитку світового науково-технічного потенціалу в бік технологій, що об'єднуються під загальним англійським терміном «омік» (omic), постійне вдосконалення коринебактерій як промислового об'єкту привертає значну увагу [1].

Штам *C. glutamicum* як платформа для метаболічної інженерії

Вперше використання *C. glutamicum* як мікроорганізма-продуцента для ферментативного способу отримання амінокислот було рекомендовано в 1957 р. Kinoshita et al. [9]. Традиційно коринебактерії використовують для біосинтезу L-глутамату та L-лізину [10], а *C. glu-*

© Г.С. АНДРІЯШ, О.С. СЕКАН, О.О. ТІГУНОВА,
Я.Б. БЛЮМ, С.М. ШУЛЬГА, 2020

tamicum та її близький родич *Brevibacterium flavum* є основними продуцентами цих амінокислот [11]. Завдяки їх використанню об'єми щорічного виробництва таких речовин, як L-глутамат, L-лізин, L-треонін та L-ізолейцин досягли 4 млн тон [1, 2, 6]. Методи генетичної інженерії дають змогу постійно вдосконалювати процес біосинтезу амінокислот, зокрема, виробництва лізину [12]. Значних результатів в отриманні лізину свого часу вдалось досягти завдяки мутаційним змінам в трьох генах штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 [13]. З огляду на практику оптимізації роботи штамів коринебактерій видно, наскільки доцільно та ефективно їх генетичне корегування. В такому випадку найбільша увага приділяється ідентифікації та характеристики метаболічних шляхів в бактерії з можливістю маніпулювання та перебудови їх в необхідному напрямку [14, 15]. Сьогодні нараховується як мінімум п'ять основних ферментативних шляхів, направлених на перетворення субстрату з C³- в C⁴-вмісний продукт. Якщо до цього ще додати активність піруваткінази та піруватдегідрогенази, то можна лише уявити яку різноманітність біохімічних реакцій та їх продуктів можна отримати в кінці біосинтетичного шляху [1, 16]. Тому стає зрозумілим, наскільки штам *C. glutamicum* перспективний як платформа для метаболічної інженерії флаксових потоків у виробництві кінцевих продуктів [17].

Узагальнюючи цінність використання коринебактерій в сучасних біотехнологіях, можна цю бактерію охарактеризувати як: (1) наявний достатньо стабільний генетичний матеріал завдяки мало представленій рекомбіназній репараційній системі [18]; (2) невибагливу у джерелах вуглецю [19]; бактерію з пластичністю клітинного метаболізму [7]. Для коринебактерій не спостерігається репресії бактеріальної культури з боку супутніх катаболітів – продуктів деградації гексози та пентози, як джерела вуглецю в середовищі. Що ж до обмеження роботи репараційної системи, то під час використання конкурентних видів бактерій як продуцентів, спостерігається інгібування біосинтезу їх білковими системами [17]. Це, в свою чергу, веде до підвищення ступеню розчинності цільових продуктів та їх накопичення в периплазмі, або у клітинних включеннях. В порівнянні з *E. coli*

та *S. cerevisiae*, *C. glutamicum* може утилізувати цукри без етапу формування включень чи супутнього синтезу катаболітів.

Векторні системи та промотори для *C. glutamicum*

З розвитком генетичної інженерії та винайденням стратегій маніпуляції генетичним матеріалом став можливим також й аналіз функціональності генів. Успіх створення модифікованих штамів-продуцентів в такому випадку часто залежить від вибору стратегії щодо контролю цільових генів. Застосування плазмід як векторної системи є невід'ємною частиною кожної із стратегій рекомбінантної технології. Виділення плазмід з коринебактерій в свій час стало підставою для значного прориву в створенні серії векторних систем у генетичних трансформаціях та отриманні нових штамів [20]. Для доставки та експресії цільових послідовностей у *C. glutamicum* та *E. coli* загалом використовують такі векторні системи, як pWLQ2 [21], pEKEx2 [22], pXMJ19 [23], pVWEx1 [24], pCRC200 [25], pECt [26] та pBB1 [27]. Ці та інші ДНК-касети містять у своєму складі регулюючі промотори, наприклад P-*lac*, P-*tac* та P-*trc*, що контролюються ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозидом (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG). Білки, що синтезуються в результаті роботи привнесених генів під контролем цих промоторів, можуть бути ізольовані як фузійні протеїнові фракції за допомогою афінної хроматографії [28]. Для представлення чужорідних генів в геномі *C. glutamicum* також використовують малі криптичні плазміди, такі як pBL1 [29], pGA1 [30], pCG1 [31] та ін. До складу цих синтетичних систем входять, як правило, промотор, ділянка початку реплікації, ген стійкості до певного антибіотику, 5'-нетрансльований регіон, власне експресійна касета та термінатор [17].

Під час створення штамів-продуцентів традиційно використовують принцип контрольованої експресії цільових генів. На сьогоднішній день точкою відліку в усіх розроблених системах контролю експресії генів у *C. glutamicum* є підсилення роботи ендогенної РНК-полімерази [32, 33]. Так, одна з найпоширеніших експресійних систем для підвищеного рівня синтезу білків у *E. coli*, була розроблена Studier and Moffatt [34].

Принцип дії системи полягав у використанні РНК-полімерази (RNAP), що дає ряд можливостей при введенні цільового гена у геном бактерії під контролем цієї системи. Разом із системою RNAP також використовують і промотор, виділений з бактеріофагу T7. Для демонстрації успішного застосування вектору T7 RNAP-експресійної системи для трансформації *C. glutamicum* Kortman et al. [35] використовували флуоресцентний гетерологічний протеїн eYFP, як маркер рівня експресії Т-ДНК. Крім цього, поблизу промоторної ділянки T7 розташовували послідовності сайту зв'язування *lac*-оперону з метою мінімізувати транскрипцію дочірніх генів і водночас підвищити експресію чужорідних послідовностей. Як результат, під час тестування векторної касети спостерігалось збільшення синтезу флуоресцентного білка в 4 рази. Зазначається, що дана векторна система може бути використана для корегування метаболічних шляхів бактерій.

В системі RNAP контроль транскрипції, окрім вищезгаданого промотору T7, може досягатись й за рахунок використання інших промоторів, які сильніші за власні [33]. Вже описано більш ніж 50 промоторів для *C. glutamicum*. Умовно їх можна розподілити на дві групи. Однією з них є промоторні послідовності, що належать до структури генів «домашнього господарства» (housekeeping genes). Ці промоторні елементи та їх мутанти найчастіше використовують для отримання штамів-продуцентів, оскільки завдяки їм частота експресії генів підвищується, але водночас не є настільки виснажливою, як у випадку сильних промоторів [36]. До іншої групи контролюючих генетичних елементів належать стрес-індуковані промотори [37, 38]. Часто їх використовують для адаптації клітин до умов обмеженого росту на початку стаціонарної фази [39], а також до різноманітних стресових умов, як то тепловий чи холодний шок [38, 40], підвищеної кислотності, тощо. Основними вимогами до використання промоторних послідовностей є їх рівень чутливості до можливих внутрішньоклітинних токсичних метаболітів, широкий спектр застосування та відсутність чи мінімальний рівень «протікання» (leaking) під час експресії гена. Найпоширенішими промоторами для регуляції експресії генів у *C. glutamicum* є

P_{tac} та P_{araBAD} , ізольованими від *E. coli* [41]. Однак, ці регулюючі елементи не є оптимальним варіантом, оскільки мають деякі недоліки. Натомість, синтетичні промотори, створені шляхом спонтанних мутацій мають певні переваги у корегуванні генетичної експресії [42, 43]. У випадку надпродукування лізину також залучають до роботи два сильних промотора: *sod* – послідовність, що входить до послідовності гена супероксиддисмутази і *tuf* – промотор з фактору подовженої елонгації [44]. Крім того, промотор P_{dapA} також використовується у корегуванні цитрат-синтазного флаксового потоку для підвищення накопичення лізину [45].

Ділянка початку реплікації (transcriptional start points, TSP) є вагомим об'єктом у конструюванні векторної касети. В геномному матеріалі *C. glutamicum* знайдено як мінімум декілька типів сигналів TSP. Як приклад, локалізовано два промотори гена *gdh* із TSP, що знаходяться на відстані 195 п.н. та 284 п.н. від ініціюючого кодону [46]. Інші два промотори генів *ptsH* і *ptsI* охарактеризовані в *C. glutamicum* штам R [47], в той час як у штам *C. glutamicum* ATCC 13032 [48] ці гени мають окремий промотор кожний. Крім здатності підвищення адаптаційності, ділянки TPS задіяні в метаболічних процесах функціонування клітинної стінки. Ці моменти претендують на вдале використання під час конструювання вектору з метою підвищити стійкість біотехнологічних культур в присутності токсичних метаболітів.

Виявлення мутантних штамів *C. glutamicum*

Скринінг геномної послідовності в *C. glutamicum* дикого штаму, як природнього продуцента лізину, дав змогу ідентифікувати ключові гени біосинтетичних шляхів [49]. За допомогою підходу порівняння диких штамів бактерії з мутантами за тим чи іншим геном вдалось виявити 6 основних послідовностей, які використовуються для отримання штамів-надпродуцентів лізину. Мутантні штам-продуценти можливо умовно розділити за ключовими генами *hom*, *pus*, *gnd*, *mgo*, *lysC* та *leuC* [50, 51]. Крім цього, нові штам з стабільною мутацією можуть бути використані як основи для отримання дочірнього покоління мутантів з мутацією в наступному цільовому гені. Такий

підхід дозволив генерувати мінімально мutowані штами з чітко контрольованими мутаціями [49].

Виявлення мутантів за тим чи іншим геном є досить складним та трудоємним завданням, особливо під час пошуку одиничних мutowаних бактерій в опрацьованій бактеріальній біомасі. З метою пошуку одиничних мutowаних колонієутворюючих одиниць вдало використовуються технологія оптичних або хімічних біосенсорів. На основі підходу сортування флуоресцентно-активованих клітин (fluorescence-activated cell sorting, FACS) Binder із співавторами [52] продемонстрували розроблену біосенсornу оптичну систему для детекції та ізолювання мutowаних клітин *C. glutamicum* надпродуцентів лізину. Інша розробка з використання біосенсорної технології для виробництва лізину нещодавно представлена Kortmann et al [53]. Автори описали використання біосенсорів лізину для пошуку різних варіантів бактерій з мutowаною піруваткарбоксілазою, за рахунок якої підвищується рівень виробництва амінокислоти. Відповідний репортерний штам коринєбактерій спочатку трансформували варіантами бібліотеки гена *rus*, а згодом отримані мутанти ідентифікували за допомогою FACS. Таким чином вдалося виявити два нових штами бактерій, в яких відмічене підвищення титру біосинтезу лізину на 9 та 19 %, відповідно. Описаний метод рекомендується в дослідженнях з направленої еволюції інших ферментів, які приймають участь в перевтіленні бактерією джерела вуглецю в цільовий метаболіт.

В світлі використання біосенсорних технологій, котрі дозволяють відслідковувати поточні процеси мutowаних біотехнологічних штамів стає зрозумілим, що традиційні методи молекулярної біології, такі як нокаут генів, не зовсім вигідні з економічної точки зору. Оскільки досить часто зустрічається проблема протікання референтних генів в модифікованих культурах, а також постає питання використання коштовних прекурсорів у поживних середовищах після вимкнення того чи іншого метаболічного шляху. Для вирішення цієї проблеми обирають альтернативні метаболічні шляхи, які б функціонували в залежності від нагальних потреб клітини [54]. Наприклад, бажаною є активність такого флаксового потоку під час росту бакте-

ріальної культури, але за досягнення фази біосинтезу цільового продукту цей шлях мав би мінімальну активність, або був взагалі вимкненим. З метою втілення цієї стратегії на практиці для динамічного контролю метаболіту розробили штучний алостеричний фермент [55]. В такому випадку цільовий продукт водночас слугував і як внутрішньоклітинний сигнал.

Інша стратегія з використання внутрішньоклітинних сигналів була розроблена на основі результатів досліджень з контрольованої експресії гена *gltA* цитратсинтази [22] в штамх-продуцентах лізину [56]. Виявлено, що низька активність цитратсинтазного потоку призводить до підвищення виробництва лізину [45]. За низьких внутрішньоклітинних концентрацій продукту білок, що виступає як супресор, має одну конформаційну будову і завдяки їй здійснюється експресія гена *gltA* у вільному вигляді та синтезується цитратсинтаза. У випадку значного підвищення вмісту внутрішньоклітинного лізину супресор змінює свою конформацію, таким чином трансляція гена припиняється. В цей спосіб здійснюється контроль всього цитратсинтазного потоку. Цей та подібні приклади дають змогу оцінити ефективність використання методів метаболічної інженерії *C. glutamicum* для підвищення рівня синтезу цільового продукту. В результаті роботи з оптимізації флаксових потоків бактерій вся увага звернена на використання альтернативних вуглецевих джерел споживання.

Джерела вуглецю для продукування лізину штами *C. glutamicum*

Бактерія *C. glutamicum* це потужна біотехнологічна система, яка здатна споживати різноманітні вуглецеві субстрати як енергетичне джерело. Традиційна сировина для культивування – це субстрати на основі цукру, включаючи глюкозу з крохмалевмісної біомаси та мелясу цукрового буряка чи цукрової тростини. Цікавий підхід стосовно біосинтезу лізину описав у своїй роботі Hoffmann et al. [57]. Було узагальнено спостереження за промисловим виробництвом лізину і показано, що сучасне виробництво цієї амінокислоти базується на використанні глюкози та крохмалю в «Західному світі» і на цукрі-сирці й мелясі – в «Східному світі» [58]. На жаль, разом із ростом світової

популяції та зростання споживання лізину, традиційні субстрати вже дещо застаріли і їх використання не дає бажаного рівня накопичення кінцевого продукту. Це дало підставу звернути увагу на друге покоління субстратів в біотехнологічній промисловості, таких як ксилоза [59, 60], целобіоза, геміцелюлоза та целюлоза [61]. Ці та інші карбогідрати залучаються до циклу фосфорилування за допомогою фосфоенолпіруват-залежної фосфотрансферазної системи (PTS). Вперше система була описана в роботі Mori and Shiiо [62]. В *C. glutamicum* ідентифіковано 4 варіанти транспортних шляхів для системи PTS: глюкози, фруктози, сахарози та манози [63]. Всі ці системи різняться між собою за трьома ключовими білками: фермент I (EI), гістидин (HPg) та фермент II (EII). Завдяки повному сиквенсу геному бактерії вдалось ідентифікувати основні генетичні компоненти системи: гени *ptsI* та *ptsH*, глюкозо-залежний ген *ptsG*, *ptsF*, а також *ptsS* [64]. Гени задіяні в споживанні бактерією субстратів глюкози, фруктози та сахарози. Характерною рисою PTS коринебактерій є її нечутливість до супутніх вуглецевих катаболітів, синтезованих під час розпаду субстратів. На підставі цієї властивості та завдяки генетичним маніпуляціям вдалось отримати штам *C. glutamicum* ATCC 13032 *lysC*(fbr), який характеризується швидким приростом біомаси на змішаних рацемічних розчинах лактату [65]. Біосинтез лізину спостерігався як під час культивування на чистому лактаті – традиційному субстраті для дикого типу коринебактерій, так і на суміші лактату та глюкози. Для надекспресії лізину модифікували гени піруваткарбоксилази та яблуневої кислоти, поставивши їх під контроль промотора *sod*. Таким чином, культивуючи штам на лактозно-глюкозному середовищі, вдалось досягнути підвищення біосинтезу амінокислоти на 9 та 15 %, відповідно.

Незалежне від PTS споживання глюкози в коринебактеріях може здійснюватись за допомогою інозитольних метаболічних шляхів. В транспортуванні *myo*-інозиту приймають участь два гени *iolT1* та *iolT2* [66]. Для підвищення виходу лізину Lindner et al. [67] об'єднали ці гени з генами *glk* та *ppgK* в одній конструкції для надекспресії в PTS-дефіцитному штамі коринебактерій. Як результат, вда-

лось досягнути повної утилізації глюкози та підвищити вихід лізину на 20 %. Проте, у використанні подібних субстратів існує ряд перешкод, наприклад, ускладнення в процесі попереднього оброблення сировини [4, 68], а також формування інгібіторних складових під час процесу отримання кінцевого цільового продукту [4].

З іншої сторони, коринебактерія традиційно споживає кsilозні субстрати, що є ще однією окремою рисою цієї бактерії. Подібні природні системи поки що не ідентифіковані в інших мікроорганізмах [4]. Здатність споживати кsilозний субстрат забезпечується завдяки наявності функціонального гена *xylB*, що кодує кsilокіназу [60]. Завдяки мутантним штамам, за цим геном вдалось визначити роль кsilозного метаболічного шляху в життєвому циклі бактерії, як важливої ланки в основі вуглецевого метаболізму [60]. Проте, за наявності кsilози та глюкози в змішаних субстратах, перевага все ж таки надається споживанню останньої [59]. Також слід відмітити, що в цілому ефективність генетичних маніпуляцій зі складовими системи PTS можлива лише за умов високих концентрацій субстрату. Під час роботи PTS не використовується фосфоенолпіруват – основний компонент біосинтезу деяких важливих сполук, як то ароматичні амінокислоти.

Ще за однією стратегією, було створено ряд генетично інженерних штамів коринебактерії для споживання кsilози та арабінози – пентозних цукрів, присутніх в лігноцелюлозних гідролізатах [69–71]. В цих роботах досліджували модифікацію транспортних систем, що дозволило пришвидшити поглинання пентоз. Дослідження процесу транспортування в *C. glutamicum* розпочалось із характеристик перенесень компонентів з малою молекулярною вагою в бактеріальній клітині [72, 73]. Першою було досліджено генетично та біохімічно систему *LysE* синтезу лізину та аргініну. Введення другої копії гена *lysE* в хромосому дозволило значно підвищити продукування лізину [74–77]. Натомість, делеції цього гена призвели до підсилення синтезу лізин-похідних компонентів, наприклад, кадаверину [78], 5AVA [79] та L-піпеколієвої кислоти [80].

На даний момент увага дослідників більше прикута до так званого третього покоління

ня субстратів, котрі можуть виявитись найперспективнішими як з боку видобування, так і з боку цінного джерела для біосинтезу цільових продуктів. В даному випадку мається на увазі морські макроводорості — чудовий швидко поновлювальний ресурс [81, 82]. Основна складова макроводоростей — манітол, що швидко та легко видобувається з таломів. В свою чергу, *C. glutamicum* не використовує манітол як джерело вуглецю, хоча катаболічний оперон для манітолу в геномі присутній [1]. Така ситуація проявляється за рахунок конститутивної експресії репресора MtlR, що перешкоджає синтезу двох структурних генів *mtlT* та *mtlD* [83]. Тож навіть за наявності в середовищі манітолу, як основного джерела вуглецю, його поглинання не відбудеться. Натомість, видалення *mtlR* гена призводить до транскрипції генів *mtlT* та *mtlD* і споживання манітолу. В даному випадку можливий метаболізм фруктози, як продукту окислення манітолу. Автори (Hoffmann et al.), описали перший метаболічний штам *C. glutamicum*, який спроможний синтезувати лізин на субстраті манітолу. В цьому випадку, сконструйований надпродуцент коринебактерії на базі лінії LYS-12, що росте на субстраті глюкози [44], був перероблений для споживання манітолу. Процес дизайну штаму включав етапи використання C^{13} -ізоотопу для конструювання метаболічних флаксових потоків, конкурентного флаксового моделювання. Такий підхід дав змогу вперше дослідити досі невідомі фізіологічні процеси споживання та перероблення манітолу коринебактерією. Отриманий штам мав вихід лізину 0,24 моль/моль та специфічну продуктивність 1,1 Ммоль/г/год (приблизно 50 та 70 %, відповідно), вище, в порівнянні з вихідним штамом.

Загалом, створення генетично інженерних моделей та стратегій для вдосконалення *C. glutamicum*, в основному, спрямоване на підвищення поглинання натуральних субстратів, таких як глюкоза, фруктоза, мальтоза, маноза, рибоза та ін. Для досягнення надекспресії лізину в коринебактеріях за використання гена *lysC* знайдено мало даних. Це вказує на порівняно невисоку популярність *lysC* в сучасній мікробіологічній індустрії. Використання цього гена наведено в роботі Takeno et al. [84], де описано отримання штаму-надпродуценту лізину

за рахунок заміни власної системи NADPH (NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) на подібну GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) від *Streptococcus mutans*. В результаті відбувався каталіз із залученням функціональних гліколітичних шляхів. Це в свою чергу призводило до підвищення рівня поглинання глюкози із середовища та пришвидшення росту колоній. Під час культивування модифікованого штаму було виділено та виокремлено так званий «супресований мутант», в якому ідентифікували зміни в послідовності гена *gapN*. Особливість мутанту проявилась у підвищеній здатності до поглинання цукрів. Надалі мутантний ген *gapN* замінили на *gapA* і вже після того додатково ввели ген *lysC* для надекспресії лізину. Як результат, вдалось досягнути підвищення поглинання із середовища глюкози на ~70 %, фруктози на ~120 % і сахарози на ~100 %. Окрім заміни гена *gapN* було також вбудовано додаткову ферментну систему NADPH. В роботі Bommarreddy et al. [85] було проаналізовано флаксові потоки із C^{13} -ізоотопом та виявлено, що ключова роль в створенні інженерного штаму коринебактерії все ж таки належить саме NADPH та привнесений системі GAPDH.

Загалом, NADPH відіграє важливу роль у надпродукуванні лізину коринебактеріями [86]. Під час досліджень мутантних бактерій за фосфоглюкозною ізомеразою виявили сильний позитивний ефект до накопичення лізину. Цей ефект спричинений перемиканням флаксового потоку глюкози на пентозофосфатний метаболічний шлях (PPP, pentose phosphate pathway) [87]. В процесі дослідження метаболічного потенціалу PPP та завдяки секвенуванню повного геному штамів-продуцентів *C. glutamicum* було встановлено значну роль 6-фосфоглюконат-дегідрогенази в біосинтезі лізину [88]. Завдяки направленій мутації гена *gnd-S361F*, що кодує цей фермент, отримали мутантний штам, який виявився менш чутливим до алостеричного інгібування внутрішньоклітинними метаболітами в порівнянні із диким штамом. В подальшому, введення мутантного гена *gnd* в геном коринебактерій призводило до підвищення накопичення лізину [49].

У випадку використання гена *dapA* за останні роки є ряд робіт, де описано виділення

промоторної частини цього гена та її ефективне залучення до генетичних експресуючих конструкцій. Buchholz et al. [89] здійснили заміну в нативному штамі коринебактерій промоторної частини піруватдегідрогеназного комплексу (PDHC) *E1p* на мutowані варіанти промоторів гена *dapA*. Отримані трансгенні колонії проявили різний ступінь в затримці росту та «гальмування» роботи системи PDHC. Заміна промотора *aseE* на *dapA-A16* показала підвищення синтезу продукту на 100 та 44 %, відповідно, в двох коринебактеріях – продуцентах лізину (штами DM1800 та DM1933). Для підготовки трансформації коринебактерії висівали на $2 \times TY$ середовище з додаванням 0,5 % ацетату калію, а також на ВНІ середовище з 1 % глюкози. Для ферментації використали CGXII мінімальне середовище, з додаванням 0,5 % ВНІ.

Збільшення накопичення лізину також може бути досягнуто за рахунок корегування флаксових шляхів. Додаткове введення генів *dapB*, *lysC* та *lysA* у геном коринебактерій в поєднанні з геном *ddh* (діамінопімелат дегідрогеназа під контролем нативного промотору) може призвести до значної надекспресії лізину [90]. Однак, окрім введення додаткових копій цільових генів до геному було здійснено окремі модифікації для уникнення підсилення сукцинілазної та дегідрогеназної гілок. Однією з таких модифікацій була заміна нативної гомосеріндегідрогенази на мутантний варіант ферменту – V59A. Дана заміна призвела до підвищення накопичення лізину за рахунок пере-направлення джерела вуглецю з треонінової гілки [13, 91].

Технологія CRISPR

З метою покращення біотехнологічних якостей *C. glutamicum* також використовують технологію геномного корегування – CRISPR [86]. Ця система вдало використана в контексті метаболічної інженерії для пригнічення поодиноких генів та підвищення виробництва лізину [92]. Автори застосували підхід інтерферуючої CRISPR (CRISPRi) у *C. glutamicum* для цілеспрямованої репресії генів, задіяних у біосинтезі таких амінокислот, як лізин та глутамін. В результаті було встановлено, що зниження експресії гена *rck* на 98 % та, окре-

мо, гена *ruc* на 97 % призводило до підвищення титру цільових амінокислот. Такий підхід виявився більш ефективним в порівнянні з нокаутом цих генів. Надалі, Park et al. модифікували цей механізм за рахунок використання вже двоплазмідної векторної системи CRISPRi для репресії одночасно двох цільових генів *idsA* та *glgC* [93]. В результаті був отриманий новий штам-продуцент *C. glutamicum* CS DM1919 з підвищеним рівнем накопичення лізину в 1,39 рази, в порівнянні з вихідним штамом-продуцентом лізину DM1919 і редукованою активністю цитрат-синтазного метаболічного шляху.

З використанням технології CRISPR в генетичній інженерії *C. glutamicum* можна також пов'язати і поєднання системи з екзонуклеазною рекомбіназою RecT для негативної селекції мutowаних клітин [94]. Загалом, використання системи CRISPR/Cas має деяке обмеження, пов'язане з етапом утворення подвійних розривів ДНК під час редагування. Для багатьох бактеріальних штамів, позбавлених механізму негомологічного з'єднання кінців (non-homologous end joining, NHEJ) [95], використання технології редагування CRISPR має суттєве обмеження або зовсім неможлива. Для подолання цієї перешкоди було поєднано два молекулярних інструменти у одній генетичній касеті, що дало змогу досягти множинних мутацій в геномі з наступним видаленням чужорідної ділянки ДНК і отримати 7 різних мутантних ліній коринебактерій протягом двох тижнів. Цей метод було запропоновано для дослідження ефективності комбінування між собою різноманітних мутацій в штаммах-продуцентах для підвищення накопичення амінокислот. Вдосконаленням цього підходу можна вважати ще одну розроблену ДНК-конструкцію з системою CRISPR/Cas9 та поєднання двох екзонуклеазних рекомбіназ RecE та RecT (RecET) [96]. Основний мотив поєднання двох ензимів в одній касеті полягав у підвищенні ефективності гомологічної рекомбінації. Крім цього, завдяки комбінуванню рекомбіназної частини та системи CRISPR/Cas9 у модифікованих клітинах виявлено зниження експресії гена *cas9*, оскільки експресія цього гена є досить сильною і спричиняє значний вплив на життєдіяльність клітин. Подібне вирішення проблеми з використанням систе-

ми є досить актуальним та може бути використане для створення штамів-продуцентів для промислових потреб.

Висновки

Охарактеризовано бактерії виду *C. glutamicum*, як потужні біотехнологічні системи, в яких ідентифіковано ключові гени біосинтетичного шляху лізину за допомогою скринінгу геномних послідовностей. Визначення власних плазмід бактерій *C. glutamicum* стало підґрунтям для рекомбінантних біотехнологій і дало можливість використання принципу контрольованої експресії цільових генів. Модифіковані штами могли використовувати альтернативні вуглецеві субстрати. Корегування флаксових шляхів призводило до збільшення накопичення лізину. Використання технології геномного корегування CRISPR дозволило покращити біотехнологічні якості *C. glutamicum*. Розглянуті методи можуть допомогти в обранні стратегії створення нових генетично-модифікованих штамів-продуцентів виду *C. glutamicum* з підвищеним накопиченням лізину.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

METABOLIC ENGINEERING OF LYSINE PRODUCING STRAINS *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

G.S. Andriyash, O.S. Sekan, O.O. Tigonova, Ya.B. Blume, S.M. Shulga

SE «Institute for Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine
Division of Wood Science and Engineering, Department of Engineering Sciences and Mathematics, Lulea University of Technology, Skelleftea, Sweden
E-mail: Shulga5@i.ua

The review is devoted to the analysis of the current achievements of the metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of lysine. Key genes of lysine biosynthesis in *C. glutamicum* and ways of creating new genetically modified strains are considered. The role of different plasmids, vector cassettes and promoter types for the regulation of gene

expression in *C. glutamicum* is described. Information is provided on the use of carbon-containing substrates (hexose, pentose, lactic acid, mannitol) for the production of lysine. Possibilities of using CRISPR technology in genetic engineering of *C. glutamicum* are considered. Genetic changes in *C. glutamicum* allowed the use of alternative substrates and contributed to the increase of lysine accumulation in the culture fluid. The data that may serve to create new lysine overproduction strains are summarized.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ЛИЗИНА *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

А.С. Андрияш, А.С. Секан, Е.А. Тигунова, Я.Б. Блюм, С.М. Шульга

Обзор посвящен анализу современных достижений метаболической инженерии *Corynebacterium glutamicum* для накопления лизина. Рассмотрены ключевые гены биосинтеза лизина в *C. glutamicum* и пути создания новых генетически модифицированных штаммов. Описана роль различных плазмид, конструирование векторных кассет и виды промоторов для регуляции экспрессии генов в *C. glutamicum*. Приведена информация по использованию углеродсодержащих субстратов (гексоз, пентоз, молочной кислоты, маннитола) для производства лизина. Рассмотрены возможности использования технологии CRISPR в генетической инженерии *C. glutamicum*. Генетические изменения *C. glutamicum* позволили использование альтернативных субстратов и способствовали повышению уровня накопления лизина в культуральной жидкости. Обобщены данные, которые могут служить для создания новых штаммов-суперпродуцентов лизина.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Becker, J., Wittmann, C. Industrial microorganisms: *Corynebacterium glutamicum*. In: Wittmann, C., Liao, J.C. (Eds.), Industrial Biotechnology 1. Germany, Weinheim, Wiley-VCH, 2017, pp. 183–203. <https://doi.org/10.1002/9783527807796.ch6>.
2. Andriyash, G.S., Zabolotna, G.M., Bondarenko, V.S., and Shulga, S.M., Gene 16S rRNA sequence phylogenetic analysis of lysine producers, Biotechnol. Acta, 2014, v. 7, no. 6, p. 40–5 (in Ukrainian). doi: 10.15407/biotech7.06.040.
3. Tigonova, O.O., Andriyash, G.S., Beyko, N.E., and Shulga, S.M., Phylogenetic analysis of lysine, threonine and butanol strain-producers, Fact. Exper. Evol. Organisms, 2017, vol. 21, pp. 288–92 (in Ukrainian).
4. Ma, Q., Zhang, Q., Xu, Q., Zhang, C., Li, Y., Fan, X., Xie, X., and Chen, N., Systems metabolic

- engineering strategies for the production of amino acids, *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2017, no. 2, 87–96. doi: 10.1016/j.synbio.2017.07.003.
5. Andriiash, G.S., Zabolotna, G.M., and Shulga, S.M., Regulation and intensification ways of lysine biosynthesis, *Microbiol. Biotechnol.*, 2012, no. 4, pp. 6–17 (in Ukrainian). doi: 10.18524/2307-4663.2012.4(20).90435.
 6. Andriiash, G.S., Zabolotna, G.M., Tkachenko, A.F., Blume, Ya.B., and Shulga, S.M., Threonine synthesis of *Brevibacterium flavum*. In: *Threonine: Food Sources, Functions and Health Benefits, USA*, Nova Publ., 2015, pp. 1–26.
 7. Buschke, N., Schäfer, R., Becker, J., and 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, vol. 135, pp. 544–54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.047>.
 8. Date, M., Itaya, H., Matsui, H., and Kikuchi, Y., Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, vol. 42, pp. 66–70. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01802.x>.
 9. Tryfona, T., Mak, T., Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*: transmembrane transport and metabolic flux analysis, *Process Biochem.*, 2005, vol. 40, pp. 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.037>.
 10. Hermann, T., Industrial production of amino acids by coryneform bacteria, *J. Biotechnol.*, 2003, vol. 104, pp. 155–72. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00149-4).
 11. Koffas, M.A., Jung, G., Yeol, G., and Stephanopoulos, G., Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression, *Metab. Eng.*, 2003, vol. 5, pp. 32–41. [https://doi.org/10.1016/S1096-7176\(03\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S1096-7176(03)00002-8).
 12. Krömer, J.O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E., and Wittmann, C., In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome, *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 6, pp. 1769–84. doi: 10.1128/JB.186.6.1769-1784.2004.
 13. Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K., and Ikeda, M., A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 58, pp. 217–23. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0883-6>.
 14. Papagianni, M., Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria, *Microb. Cell Factories*, 2012, vol. 11, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-50>.
 15. Sun, Y., Guo, W., Wang, F., Zhan, C., Yang, Y., Liu, X., and Bai, Z., Transcriptome analysis of *Corynebacterium glutamicum* in the process of recombinant protein expression in bioreactors, *PloS One*, 2017, vol. 12, no. 4, pp. 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0174824.
 16. Eikmanns, B.J., Central metabolism: tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions in *Handbook of Corynebacterium glutamicum* (eds L. Eggeling and M. Bott), Boca Raton, FL, CRC Press, 2005, pp. 241–76.
 17. Baritugo, K.A., Kim, H.T., David, Y., Choi, J.-L., Hong, S. H., and Jeong, K.J., Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, vol. 102, p. 3915–37. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8896-6>.
 18. Nakamura, Y., Nishio, Y., Ikeo, K., and Gojobori, T., The genome stability in *Corynebacterium species* due to lack of the recombinational repair system, *Gene*, 2003, vol. 317, pp. 149–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00653-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00653-X).
 19. Leßmeier, L., Wendisch, V.F., Identification of two mutations increasing the methanol tolerance of *Corynebacterium glutamicum*, *BMC Microbiol.*, 2015, vol. 15, no. 216, doi: 10.1186/s12866-015-0558-6.
 20. Nesvera, J., Patek, M., Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 90, no. 5, pp. 1641–54. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3272-9>.
 21. Liebl, W., Sinskey, A.J., and Schleifer, K.H., Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*, *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, no. 6, pp. 1854–61. doi: 10.1128/jb.174.6.1854-1861.1992.
 22. Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K.U., and Sahm, H., Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase, *Microbiology*, 1994, vol. 140, no. 8, pp. 1817–28. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-8-1817>.
 23. Jakoby, M., Ngouoto-Nkili, C.E., and Burkovski, A., Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors, *Biotechnol. Techniques*, 1999, vol. 13, p. 437. <https://doi.org/10.1023/A:1008968419217>.
 24. Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Möckel, B., Sahm, H., and Eikmanns, B.J., Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium*

- glutamicum*, J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2001, vol. 3, pp. 295–300.
25. Yasuda, K., Jojima, T., Suda, M., Okino, S., Inui, M., and Yukawa, H., Analyses of the acetate-producing pathways in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, vol. 77, no. 4, p. 853–60. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1199-y>.
 26. Sato, H., Orishimo, K., Shirai, T., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Shimizu, H., and Wachi, M., Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*, J. Biosci. Bioeng., 2008, vol. 106, no. 1, pp. 51–8. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.51>.
 27. Krause, F.S., Blombach, B., and Eikmanns, B.J., Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production, Appl. Environ. Microbiol., 2010, vol. 76, no. 24, pp. 8053–61. doi: 10.1128/AEM.01710-10.
 28. Yang, Y.F., Zhang, J.J., Wang, S.H., and Zhou, N.Y., Purification and characterization of the ncg12923-encoded 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum*, J. Basic. Microbiol., 2010, vol. 50, no. 6, pp. 599–604. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000053>.
 29. Santamaria, R., Gil, J., Mesas, J., and Martin, J., Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*, J. Gen. Microbiol., 1984, vol. 130, 2237–46. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-9-2237>.
 30. Sonnen, H., Thierbach, G., Kautz, S., Kalinowski, J., Schneider, J., Pühler, A., and Kutzner, H.J., Characterization of pGAI, a new plasmid from *Corynebacterium glutamicum* LP-6, Gene, 1991, vol. 107, no. 1, pp. 69–74. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90298-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90298-P).
 31. Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T., and Furuya, A., Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*, Mol. Gen. Genet., 1984, vol. 196, no. 1, pp. 175–8. <https://doi.org/10.1007/BF00334113>.
 32. Kirchner, O., Tauch, A., Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*, J. Biotechnol., 2003, vol. 104, pp. 287–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00148-2).
 33. Pátek, M., Holátko, J., Busche, B., Kalinowski, J., and Nešvera, J., *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach, Microb. Biotechnol., 2013, vol. 6, no. 2, pp. 103–17.
 34. Studier, F.W., Moffatt, B.A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol., 1986, vol. 189, no. 1, pp. 113–30. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
 35. Kortmann, M., Kuhl, V., Klaffl, S., and Bott, M., A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum*: construction and comparative evaluation at the single-cell level, Microb. Biotechnol., 2015, vol. 8, no. 2, pp. 253–65. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12236>.
 36. Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Möckel B., Sahm, H., and Eikmanns, B.J., Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2001, vol. 3, no. 2, pp. 295–300.
 37. Nakunst, D., Larisch, C., Hüser, A.T., Tauch, A., Pühler, A., and Kalinowski, J., The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes, J. Bacteriol., 2007, vol. 189, no. 13, pp. 4696–707. doi: 10.1128/JB.00382-07.
 38. Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H., Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA, J. Bacteriol., 2009, vol. 191, no. 9, pp. 2964–72. doi: 10.1128/JB.00112-09.
 39. Larisch, C., Nakunst, D., Hüser, A.T., Tauch, A., and Kalinowski, J., The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase, BMC Genomics, 2007, vol. 8, doi: 10.1186/1471-2164-8-4.
 40. Busche, T., Silar, R., Pičmanová, M., Pátek, M., and Kalinowski, J., Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*, BMC Genomics, 2012, vol. 13, no. 445. doi:10.1186/1471-2164-13-445.
 41. Zhang, Y., Shang, Lai Sh., Zhang, G., Liang, Y., and Wen, T., Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum*, Appl. Environ. Microbiol., 2012, vol. 78, no. 16, pp. 5831–8. doi: 10.1128/AEM.01147-12.
 42. Yim, S.S., An, S.J., Kang, M., Lee, J., and Jeong, K.J., Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*, Biotechnol. Bioeng., 2013, vol. 110, no. 11, pp. 2959–69. <https://doi.org/10.1002/bit.24954>.
 43. Rytter, J.V., Helmark, S., Chen, J., Lezyk, M.J., Solem, C., and Jensen, P.R., Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*, Appl. Mi-

- crobiol. Biotechnol., 2014, vol. 98, no. 6, pp. 2617–23. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5481-x>.
44. Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., Wittmann, C., From zero to hero—design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production, *Metab. Eng.*, 2011, vol. 13, no. 2, pp. 159–68. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.003>.
 45. van Ooyen, J., Noack, S., Bott, M., Reth, A., and Eggeling, L., Improved L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum* and systemic insight into citrate synthase flux and activity, *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, vol. 109, no. 8, pp. 2070–81. <https://doi.org/10.1002/bit.24486>.
 46. Häussler, E., Muller, T., Palumbo, K., Patek, M., Brocker, M., Kramer, R., and Burkovski, A., A game with many players: control of *gdh* transcription in *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biotechnol.*, 2009, vol. 142, pp. 114–22. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.007>.
 47. Tanaka, Y., Okai, N., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H., Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R, *Microbiology*, 2008, vol. 154, pp. 264–74. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008862-0>.
 48. Gaigalat, L., Schlüter, J.P., Hartmann, M., Mormann, S., Tauch, A., Pühler, A., and 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, vol. 8. doi: 10.1186/1471-2199-8-104.
 49. Ikeda, M., Ohnishi, J., Hayashi, M., and Mitsuhashi, S., A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 33, pp. 610–5. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0104-5>.
 50. Hayashi, M., Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Yonetani, Y., Hashimoto, S., and Ikeda, M., Transcriptome analysis reveals global expression changes in an industrial l-lysine producer of *Corynebacterium glutamicum*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, vol. 70, pp. 546–50. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.546>.
 51. Brinkrolf, K., Schröder, J., Pühler, A., and Tauch, A., The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: Reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production, *J. Biotech.*, 2010, vol. 149, no. 3, pp. 173–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.004>.
 52. Binder, B., Siedler, S., Marienhagen, J., Bott, M., and Eggeling, L., Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation, *Nucleic. Acids Res.*, 2013, vol. 41, no. 12, pp. 6360–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt312>.
 53. Kortmann, M., Mack, C., Baumgar, M., and Bott, M., Pyruvate carboxylase variants enabling improved lysine production from glucose identified by biosensor-based high-throughput fluorescence-activated cell sorting screening, *ACS Synth. Biol.*, 2019, vol. 8, no. 2, pp. 274–81. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00510>.
 54. Wendisch, V.F., Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2014, vol. 30, pp. 51–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.05.004>.
 55. Chen, Z., Rappert, S., and Zeng, A.P., Rational design of allosteric regulation of homoserine dehydrogenase by a non-natural inhibitor L-lysine, *ACS Synth. Biol.*, 2015, vol. 4, no. 2, pp. 126–31. <https://doi.org/10.1021/sb400133g>.
 56. Zhou, L.B., Zeng, A.P., Exploring lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*, *ACS Synth. Biol.*, 2015, no. 4, pp. 729–34. <https://doi.org/10.1021/sb500332c>.
 57. Hoffmann, S.L., Jungmann, L., Schiefelbein, S., Peyriga, L., Cahoreau, E., Portais, J.C., Becker, J., and Wittmann, C., Lysine production from the sugar alcohol mannitol: Design of the cell factory *Corynebacterium glutamicum* SEA-3 through integrated analysis and engineering of metabolic pathway fluxes, *Metab. Eng.*, 2018, vol. 47, pp. 475–87. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.019>.
 58. Schneider, J., Niermann, K., and Wendisch, V.F., Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biotechnol.*, 2011, vol. 154, no. 2–3, pp. 191–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.009>.
 59. Buschke, N., Schröder, H., and Wittmann, C., Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemi-cellulose, *Biotechnol. J.*, 2011, vol. 6, no. 3, pp. 306–17. <https://doi.org/10.1002/biot.201000304>.
 60. Kawaguchi, H., Vertes, A.A., Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 5, pp. 3418–28. doi: 10.1128/AEM.72.5.3418-3428.2006.
 61. Ryu, S., Karim, M.N., A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 91, no. 3, pp. 529–42. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3261-z>.
 62. Mori, M., Shiio, I., Pyruvate formation and sugar

- metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*, Agric. Biol. Chem., 1987, vol. 51, no. 1, pp. 129–38. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.129>.
63. Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G.A., Weil, B., Krdmer, R., and Titgemeyer, F., *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS, J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2001, vol. 3, no. 3, pp. 423–8.
 64. Ikeda, M., Sugar transport systems in *Corynebacterium glutamicum*: features and applications to strain development, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012, vol. 96, no. 5, pp. 1191–200. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4488-z>.
 65. Neuner, A., Heinzle, E., Mixed glucose and lactate uptake by *Corynebacterium glutamicum* through metabolic engineering, Biotechnol. J., 2011, vol. 6, no. 3, pp. 318–29. <https://doi.org/10.1002/biot.201000307>.
 66. Ikeda, M., Mizuno, Y., Awane, S., Hayashi, M., Mitsuhashi, S., and Takeno, S., Identification and application of a different glucose uptake system that functions as an alternative to the phosphotransferase system in *Corynebacterium glutamicum*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, vol. 90, no. 4, pp. 1443–51. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3210-x>.
 67. Lindner, S.N., Seibold, G.M., Henrich, A., Krämer, R., and Wendisch, V.F., Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases, Appl. Environ. Microbiol., 2011, vol. 77, no. 11, pp. 3571–81. doi: 10.1128/AEM.02713-10.
 68. Tan, J.M., Wong, E.S., Kirkpatrick, D.S., Pletnikova, O., Ko, H.S., Tay, S.P., Ho, M.W., Troncoso, J., Gygi, S.P., Lee, M.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Lim, K.L., Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases, Hum. Mol. Genet., 2008, vol. 17, no. 3, pp. 431–9. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm320>.
 69. Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, H.R., Kurimoto, K., Saitou, M., and Matsuzaki, F., Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis, Development, 2008, vol. 135, no. 18, pp. 3113–24. doi: 10.1242/dev.022616.
 70. Meiswinkel, T.M., Gopinath, V., Lindner, S.N., Nampoothiri, K.M., and Wendisch, V.F., Accelerated pentose utilization by *Corynebacterium glutamicum* for accelerated production of lysine, glutamate, ornithine and putrescine, Microb. Biotechnol., 2013, vol. 6, no. 2, pp. 131–40.
 71. Radek, A., Krumbach, K., Gaetgens, J., Wendisch, V.F., Wiechert, W., Bott, M., Noack, S., and Marienhagen, J., Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for minimized carbon loss during utilization of D-xylose containing substrates, J. Biotechnol., 2014, vol. 192, pp. 156–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.026>.
 72. Marin, K., Krämer, R., Amino Acid Transport Systems in Biotechnologically Relevant Bacteria. In: Wendisch V.F. (eds) Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering, Microbiology Monographs, Berlin, Springer, Heidelberg, 2007, vol. 5, pp. 289–325. https://doi.org/10.1007/7171_2006_069.
 73. Eggeling, L. Exporters for Production of amino acids and other small molecules, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2017, vol. 159, pp. 199–225. https://doi.org/10.1007/10_2016_32.
 74. Blombach, B., Hans, S., Bathe, B., and Eikmanns, B.J., Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, Appl. Environ. Microbiol., 2009, vol. 75, no. 2, pp. 419–27. doi: 10.1128/AEM.01844-08.
 75. Unthan, S., Radek, A., Wiechert, W., Oldiges, M., and Noack, S., Bioprocess automation on a mini pilot plant enables fast quantitative microbial phenotyping, Microb. Cell Factories, 2015, vol. 14, pp. 32. doi:10.1186/s12934-015-0216-6. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0216-6>.
 76. Pérez-García, F., Peters-Wendisch, P., and Wendisch, V.F., Engineering *Corynebacterium glutamicum* for fast production of L-lysine and L-pipecolic acid, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016, vol. 100, 18, pp. 8075–90. doi: 10.1007/s00253-016-7682-6.
 77. Henke, N.A., Wiebe, D., Pérez-García, F., Peters-Wendisch, P., and Wendisch, V.F., Coproduction of cell-bound and secreted value-added compounds: Simultaneous production of carotenoids and amino acids by *Corynebacterium glutamicum*, Bioresour. Technol., 2018, vol. 247, pp. 744–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.167>.
 78. Kind, S., Neubauer, S., Becker, J., Yamamoto, M., Völkert, M., Abendroth, G.V., Zelder, O., and Witmann, C., From zero to hero-production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*, Metab. Eng., 2014, vol. 25, pp. 113–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.007>.
 79. Rohles, C.M., Gießelmann, G., Kohlstedt, M., Wittman, Ch., and Becker, J., Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of the carbon-5 platform chemicals 5-aminovalerate and glutarate, Microbial. Cell Factories, 2016, vol. 15, no. 1, pp. 154–67. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0553-0>.
 80. Pérez-García, F., Risse, J.M., Friesch, K., and Wendisch, V.F., Fermentative production of L-pipecolic acid from glucose and alternative carbon sources,

- Biotech. J., 2017, vol. 12, no. 7, doi: 10.1002/biot.201600646.
81. Goh, C.S., Lee, K.T., Conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2010, vol. 14, pp. 842–8. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.001>.
 82. Wang, X., Liu, X., Wang, G. Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation, *J. Integrat. Plant Biol.*, 2011, vol. 53, no. 3, pp. 246–52. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.01024.x>.
 83. Peng, X., Okai, N., Vertius, A.A., Inatomi, K., Inui, M., and Yukawa, H., Characterization of the mannitol catabolic operon of *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 91, no. 5, pp. 1375–87. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3352-x>.
 84. Takeno, S, Murata, R, Kobayashi, R, Mitsushashi, S and Ikeda, M., Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 21, pp. 7154–60. doi: 10.1128/AEM.01464-10.
 85. Bommarreddy, R.R., Chen, Z., Rappert, S., and 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, vol. 25, pp. 30–7. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.06.005>.
 86. Eggeling, L., Bott, M., A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 99, no. 8, pp. 3387–94. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6508-2>.
 87. Marx, A., Hans, S., Möckel, B., Bathe, B., de Graaf, A.A., McCormack, A.C., Stapleton, C., Burke, K., O'Donohue, M., and Dunican, L.K., Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biotechnol.*, 2003, vol. 104, pp. 185–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00153-6).
 88. Ohnishi, J., Katahira, R., Mitsushashi, S., Kakita, S., and Ikeda, M., A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, vol. 242, pp. 265–74. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.014>.
 89. Buchholz, J., Schwentner, A., Brunnenkan, B., Gabriel, C., Grimm, S., Gerstmeir, R., Takors, R., Eikmanns, B.J., and 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, vol. 79, no. 18, pp. 5566–75. doi: 10.1128/AEM.01741-13.
 90. Becker, J., Klopprogge, C., Herold, A., Zelder, O., and Bolten, C.J., Wittmann, C. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*-over expression and modification of G6P dehydrogenase, *J. Biotechnol.*, 2007, vol. 132, no. 2, pp. 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.026>.
 91. Becker, J., Wittmann, C., Advanced biotechnology: Metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and healthcare products, *Angewandte Chemie Int. Edition.*, 2015, vol. 54, pp. 3328–50. <https://doi.org/10.1002/anie.201409033>.
 92. Cleto S., Jensen, J.V., Wendisch, V.F., and Lu T.K., *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi), *ACS Synth. Biol.*, 2016, no. 5, pp. 375–85. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00216>.
 93. Park, J., Shin, H., Lee, S.-M., Um, Y., and Woo, H.M., RNA-guided single/double gene repressions in *Corynebacterium glutamicum* using an efficient CRISPR interference and its application to industrial strain, *Microbia. Cell Factories*, 2018, vol. 17, no. 4. doi: 10.1186/s12934-017-0843-1.
 94. Cho, J.S., Choi, K.R., Prabowo, C.P.S., Shin, J.H., Yang, D., Jang, J., and Lee, S.Y., CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*, *Metabol. Eng.*, 2017, no. 42, pp. 157–67. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.010>.
 95. Shuman, S., Glickman, M.S., Bacterial DNA repair by non-homologous end joining, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, vol. 5, no. 11, pp. 852–61. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1768>.
 96. Wang, B., Qitiao Hu, Q., Zhang, Y., Shi, R., Chai, X., Liu, Z., Shang, X., Zhang, Y., and Wen, T., A RecET-assisted CRISPR–Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*, *Microb. Cell Fact.*, 2018, vol. 17, no. 63, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0910-2>.

Надійшла в редакцію 20.08.19
Після доопрацювання 25.10.19
Прийнята до друку 18.03.20