

DOI: 10.7868/S3034574X26010025
УДК 579.66; 577.121

Оригинальная статья

РОЛЬ АНАПЛЕРОТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ СИНТЕЗА ОКСАЛОАЦЕТАТА В ОБЕСПЕЧЕНИИ АКТИВНОГО БИОСИНТЕЗА L-ЛИЗИНА В ШТАММЕ — ПРОДУЦЕНТЕ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Т.Е. Леонова*, Л.Е. Рябченко, Т.И. Калинина, Т.В. Герасимова, А.С. Яненко

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация

*E-mail: tanpog@mail.ru

Аннотация. Изучены свойства трех мутантов штамма-продуцента L-лизина промышленного уровня *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11969, у которых блокирован один из анаплеротических путей синтеза предшественников лизина — оксалоацетата вследствие инактивации генов *ppc* (кодирует фосфоенолпируваткарбоксилазу) или *pus* (кодирует пируваткарбоксилазу) или нарушен один из путей синтеза пирувата вследствие инактивации гена *pyk* (кодирует пируваткиназу). Инактивация пируваткарбоксилазы, катализирующей синтез оксалоацетата из пирувата и CO₂, не сказывалась на продукции L-лизина. Инактивация пируваткиназы, катализирующей синтез пирувата из фосфоенолпирувата, приводила к снижению скорости синтеза L-лизина (на 20–25 %). В наибольшей степени синтез L-лизина снижался при инактивации фосфоенолпируваткарбоксилазы — на 30–50 % в зависимости от условий выращивания. Сделан вывод о том, что в штамме В-11969 в условиях сверхсинтеза L-лизина образование оксалоацетата преимущественно происходит с участием фосфоенолпируваткарбоксилазы. Однако усиление экспрессии гена *ppc* в штамме-продуценте привело к увеличению активности фосфоенолпируваткарбоксилазы, но не продукции L-лизина, что позволило предположить, что в штамме В-11969 стадия синтеза оксалоацетата не являлась лимитирующей для продукции лизина.¹

Ключевые слова: фосфоенолпируваткарбоксилаза, пируваткарбоксилаза, пируваткиназа, L-лизин, *Corynebacterium glutamicum*

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-64-00031, <https://rscf.ru/project/25-64-00031/>).

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Леонова Т.Е., Рябченко Л.Е., Калинина Т.И., Герасимова Т.В., Яненко А.С. Роль анаплеротических реакций синтеза оксалоацетата в обеспечении активного биосинтеза L-лизина в штамме — продуценте *Corynebacterium glutamicum*. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 1. С. 27–41. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010025>

© Т. Е. Леонова, Л. Е. Рябченко, Т. И. Калинина, Т. В. Герасимова, А. С. Яненко, 2026

¹ Сокращения: АЭЦ — S-(2-аминоэтил)-L-цистеин гидрохлорид, КоА — коэнзим А, МС — минимальная среда, ОД — оксалоацетатдекарбоксилаза, ПК — пируваткарбоксилаза, ПКк — пируваткиназа, ФЕП — фосфоенолпируват, ФЕПК — фосфоенолпируваткарбоксилаза, ФЕПКК — фосфоенолпируваткарбоксикиназа, ФС — ферментационная среда, ФТС — фосфотрансферазная система, ЦС — цитратсинтаза, ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

THE ROLE OF ANAPLEROTIC REACTIONS FOR OXALOACETATE SYNTHESIS IN THE L-LYSINE PRODUCING STRAIN OF *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

T.E. Leonova*, L.E. Ryabchenko, T.I. Kalinina, T.V. Gerasimova, A.S. Yanenko

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

*E-mail: tanpog@mail.ru

Abstract. The properties of three mutants of the industrial-scale L-lysine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* VKPM B-11969 were studied. These mutants had one of the anaplerotic pathways for synthesizing lysine precursors, oxaloacetate, blocked due to inactivation of the *ppc* (encodes phosphoenolpyruvate carboxylase) or *pyc* (encodes pyruvate carboxylase) genes, or one of the pyruvate synthesis pathways was disrupted due to inactivation of the *pyk* gene (encodes pyruvate kinase). Inactivation of pyruvate carboxylase, which catalyzes the synthesis of oxaloacetate from pyruvate and CO₂, did not affect L-lysine production. Inactivation of pyruvate kinase, which catalyzes the synthesis of pyruvate from phosphoenolpyruvate, resulted in a decrease in the rate of L-lysine synthesis (by 20–25 %). The synthesis of L-lysine decreased to the greatest extent with the inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase, by 30–50 % depending on the growing conditions. It was concluded that, in the B-11969 strain, under conditions of active synthesis of L-lysine, the formation of oxaloacetate occurs predominantly with the participation of phosphoenolpyruvate carboxylase. However, the increase in the expression of the *ppc* gene in the producer strain led to an increase in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase, but not in the production of L-lysine, which allowed us to assume that in the B-11969 strain the stage of oxaloacetate synthesis is not limiting for the production of lysine.

Keywords: phosphoenolpyruvate carboxylase, pyruvate carboxylase, pyruvate kinase, L-lysine, *Corynebacterium glutamicum*

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 25-64-00031, <https://rscf.ru/project/25-64-00031/>).

Ethics declarations. This article does not contain any studies involving humans or animals.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Authors contribution. All authors made significant contributions to the concept development, conduct of the study, and preparation of the article.

For Citation: Leonova T.E., Ryabchenko L.E., Kalinina T.I., Gerasimova T.V., Yanenko A.S. The role of anaplerotic reactions for oxaloacetate synthesis in the L-lysine producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(1):27–41. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010025>

ВВЕДЕНИЕ

Штаммы *Corynebacterium glutamicum* широко используются в мире для промышленного производства незаменимых аминокислот, в частности L-лизина, которые в свою очередь находят широкое применение в том числе в качестве кормовой добавки для повышения эффективности животноводства. Процесс биосинтеза L-лизина в клетках коринебактерий представляет собой сложный многостадийный процесс превращения глюкозы в лизин с участием

десятков ферментов различных метаболических путей. Уровень синтеза лизина в значительной степени зависит от доступности в сбалансированном количестве (1:1) метаболитов — предшественников лизина — оксалоацетата и пирувата. В клетках *C. glutamicum* существует сложная система метаболических реакций, обеспечивающих связь между гликолизом, глюконеогенезом и циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) за счет превращения друг в друга таких метаболитов, как фосфоенолпируват, пируват и оксалоацетат (рис. 1) [17].

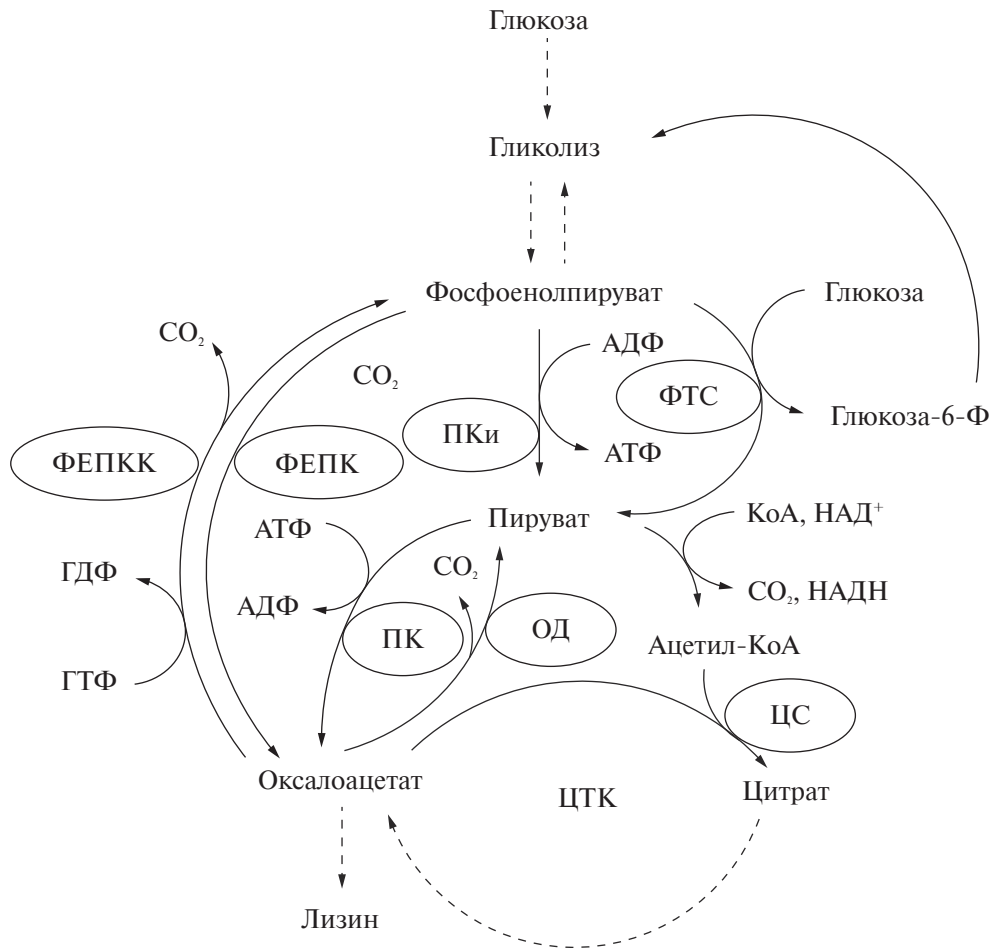


Рис. 1. Метаболические реакции взаимопревращения фосфоенолпирувата — пирувата — оксалоацетата в *C. glutamicum*. Обозначения: ФТС — фосфотрансферная система, ПКки — пируваткиназа, ПК — пируваткарбоксилаза, ОД — оксалоацетатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.112), ФЕПК — фосфоенолпируваткарбоксилаза, ФЕПКК — фосфоенолпируваткарбоксикиназа (КФ 4.1.1.32), ЦС — цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1), ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, КоА — коэнзим А

Fig. 1. Metabolic reactions of interconversion of phosphoenolpyruvate — pyruvate — oxaloacetate in *C. glutamicum*. Designations: PTS — phosphotransferase system, PYK — pyruvate kinase, PC — pyruvate carboxylase, ODC — oxaloacetate decarboxylase (EC 4.1.1.112), PEPCK — phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCK — phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32), CS — citrate synthase (EC 2.3.3.1), CAC — citric acid cycle, CoA — coenzyme A

Важнейшую роль в обеспечении синтеза оксалоацетата играют две анаплеротические реакции: образование оксалоацетата из фосфоенолпирувата с помощью фосфоенолпируваткарбоксилазы (КФ 4.1.1.31, ФЕПК, ген *prc*) и из пирувата с по-

мощью биотинзависимой пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1, ПК, ген *pyc*). Важную роль в синтезе пирувата играет фермент пируваткиназа, катализирующий его образование из фосфоенолпирувата (КФ 2.7.1.40, ген *pyk*, ПКки).

Широко распространенным является утверждение, что скорость образования оксалоацетата является лимитирующей стадией в продукции лизина [16]. Однако, несмотря на значимость анаплеротических реакций синтеза оксалоацетата, вклад каждого из ферментов (ФЕПК, ПК) — участников синтеза оксалоацетата не до конца исследован, особенно в условиях сверхпродукции лизина. В ряде работ [10, 16] было показано, что главную роль в обеспечении синтеза оксалоацетата играет ПК, в других — что ФЕПК также вносит свой вклад в этот процесс [7, 8] или даже является главным ферментом в процессе восполнения пула оксалоацетата [19].

Влияние той или иной анаплеротической реакции на синтез лизина может быть обусловлено наличием в кодирующих ПК и ФЕПК генах определенных мутаций. Так, синтез лизина в штамме АНД-2 увеличивался при введении в ген *rus* мутации Pro-458→Ser [13]. А в случае штамма LC298 введение точечной мутации в ген *ppc*, обуславливающей устойчивость ФЕПК к ингибированию малатом и аспаратом, приводило к увеличению синтеза лизина на 37% [7]. Йокота с соавт. [22] наблюдали усиление синтеза лизина на 38 % в аналогичном штамме только при сочетании этой мутации в гене *ppc* с инактивацией ПКи за счет делеции в кодирующем ее гене *pyk*.

Стоит отметить, что эти исследования в основном проводились на штаммах-продуцентах L-лизина, полученных с помощью мутагенеза и/или внесения нескольких мутаций [2, 11, 19], благодаря которым штамм начинает продуцировать лизин в небольших количествах. Обеспечение же оптимальной концентрации метаболитов — предшественников лизина — оксалоацетата и пирувата особенно важно для промышленных штаммов-продуцентов, синтез лизина в которых значительно усилен за счет мутаций, затрагивающих различные метаболические пути в клетке. С этой точки зрения важно точно знать, какие метаболические реакции являются ключевыми в этом процессе, а также важно выявить «узкие места» в биосинтезе предшественников лизина.

Цель работы — оценка вклада отдельных ферментов анаплеротических путей синтеза оксалоацетата в продукцию L-лизина в штамме-продуценте промышленного уровня *S. glutamicum* ВКПМ В-11969.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды

Table 1. Strains and plasmids

Название	Характеристика	Источник получения
<i>E. coli</i> XLI Blue	Штамм дикого типа	БРЦ ВКПМ*
Штаммы <i>S. glutamicum</i>		
<i>Brevibacterium flavum</i> (<i>S. glutamicum</i>) 90 (В-10945)	Продуцент лизина (<i>Leu</i> ⁻), S-(2-аминоэтил)-L-цистеин ^R , производный от <i>S. glutamicum</i> ATCC 13869	БРЦ ВКПМ
В-11969	Производный В-10945 нитрофурантоин ^R , Δpck , icd^{GTG} , $P_{sod^-}lysC$, $P_{sod^-}ddh$, $P_{leu^-}dapB$, $P_{sod^-}lysA$, $P_{sod^-}tkl$	БРЦ ВКПМ
Н140	Производный В-11969, Δrus	Данная работа
Н144	Производный В-11969, Δpyk	Данная работа
Н153	Производный В-11969, Δppc	Данная работа
Н166	Производный В-11969, <i>ppc</i> под <i>sod</i> -промотором	Данная работа
Плазмиды		
pJET1.2	Вектор для клонирования	Thermo Scientific (США)

Таблица 1. Продолжение

Table 1. (Contd.)

pIKA-sac13	pUC19 + Km ^R из pUC4K + <i>sacB</i> из <i>B. subtilis</i> 168	[11]
pJET1-Δ <i>рук</i>	pJET1— <i>рук</i> с делецией внутри гена <i>рук</i>	Данная работа
pIKA-Δ <i>рук</i>	pIKA- <i>рук</i> с делецией внутри гена <i>рук</i>	Данная работа
pJET1.2-Δ <i>ppc</i>	pJET1— <i>ppc</i> с делецией внутри гена <i>ppc</i>	Данная работа
pIKA-Δ <i>ppc</i>	pIKA- <i>ppc</i> с делецией внутри гена <i>ppc</i>	Данная работа
pJET1.2-Δ <i>pus</i>	pJET — <i>pus</i> с делецией внутри гена <i>pus</i>	Данная работа
pIKA-Δ <i>pus</i>	pIKA- <i>pus</i> с делецией внутри гена <i>pus</i>	Данная работа
pJET1.2-P _{sod} - <i>ppc</i>	pJET1- <i>ppc</i> под контролем промотора <i>sod</i>	Данная работа
pIKA-P _{sod} - <i>ppc</i>	pIKA- <i>ppc</i> под контролем промотора <i>sod</i>	Данная работа
pNS2-P _{sod} - <i>ppc</i>	pNS2- <i>ppc</i> под контролем промотора <i>sod</i>	Данная работа
pNS2	<i>E.coli/C.glutamicum</i> шаттл-вектор	[11]

*БРЦ ВКПМ — Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт».

*BRC VKPM, National Bioresource Center, All-Russia Collection of Industrial Microorganisms, Kurchatov Institute Research Center.

Штамм В-11969 — производный штамма-продуцента L-лизина *Brevibacterium flavum* 90 (по новой номенклатуре *C. glutamicum*) ВКПМ В-10945 (прародитель — штамм *C. glutamicum* АТСС 13869) — был получен путем замещения нативных аллелей ряда генов (табл. 1) на мутантные аллели с использованием сконструированных на основе плазмиды pIKA-sac13 [4] векторов, содержащих участки гомологии с генами-мишенями.

E. coli выращивали на среде LB при 37 °С. При необходимости в среду добавляли антибиотики: канамицин — 50 мкг/мл, ампициллин — 100 мкг/мл.

Штаммы *C. glutamicum* выращивали на среде 2×LB с 1%-ной мальтозой при 30 °С. Для трансформации *C. glutamicum* использовали ВНС-среду следующего состава (г/л): сердечно-мозговой бульон (brain heart infusion, ВНИ) Difco (США) — 37,0; сорбит — 30,0; агар-агар — 15,0 (в случае твердой среды).

Для определения уровня продукции L-лизина штаммами *C. glutamicum* ферментации проводили в пробирках с 3 мл минимальной (МС) или ферментационной (ФС) среды (табл. 2) при 30 °С и 300 об./мин на шейкер-инкубаторе Multitron 2 “Infors” (США) в течение 45–48 ч.

Таблица 2. Состав сред для ферментации со штаммами *C. glutamicum*

Table 2. Composition of fermentation media for *C. glutamicum* strains

Компонент	Среда, г/л	
	МС	ФС
Калий фосфорнокислый однозамещенный	2,5	1,0
Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный	19,7	-
Магний сернокислый 7-водный	1,0	1,0
Глюкоза	10,0	100,0
d-биотин	1·10 ⁻⁴	1·10 ⁻⁴
Тиамин гидрохлорид (витамин В1)	2·10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁴
Аммоний сернокислый	15,0	8,9
L-лейцин	0,25	-
Железо сернокислое 7-водное	0,01	-
Кальций углекислый	-	25,0
Гидролизат пшеничного глютена, 50 %	-	100,0 мл
pH	7,0–7,2	

При необходимости вносили канамицин (10 мкг/мл). В качестве посевного материала использовали культуру, выращенную в течение 17 ч при 30 °С и 300 об./мин. В среду МС посевной материал вносили в таком количестве, чтобы начальная оптическая плотность (ОП), измеренная на спектрофотометре UV-1800 “Shimadzu” (Япония) при 600 нм в кювете 1 см, составляла 0,25 ед., а в среду ФС — в количестве 10 % от объема среды.

Конструирование плазмид и штаммов. Для введения делеций в выбранные гены использовали нере-

плицирующуюся в клетках *C. glutamicum* суицидную плазмиду pКА-sac13, способную интегрировать и выщепляться из хромосомы *C. glutamicum* по механизму гомологичной рекомбинации [1]. Источником клонируемых на плазмиде pКА-sac13 генов служила хромосомная ДНК штамма *B. flavum* 90.

Для получения векторных плазмид с делеционными вариантами генов *pus* и *pyk* использовали амплификацию фрагментов этих генов с помощью 2 пар праймеров (табл. 3) с последующей сборкой их в процессе амплификации по краевым праймерам.

Таблица 3. ДНК-специфические праймеры, использованные в работе

Table 3. DNA-specific primers used in the work

Праймер	Ген	Последовательность
F1- <i>pyk</i>	<i>pyk</i>	ggtcgccgacgcgaaggctaact
R1- <i>pyk</i>	<i>pyk</i>	aaacaacaagggtgttgcgagcgcctcaacg
F2- <i>pyk</i>	<i>pyk</i>	gcgttgaggcgtcggcaaacaccctgtgt
R2- <i>pyk</i>	<i>pyk</i>	ctgttcacactctgggtcgcaa
F- <i>ppc</i>	<i>ppc</i>	gtcgacatgactgatttttacgc
R- <i>ppc</i>	<i>ppc</i>	gtcgacctagccggagtgcgcagc
F- <i>ppc</i> -test	<i>ppc</i>	tactccatacgcacatc
F- <i>pus</i> -1	<i>pus</i>	aaaggatccgatcttgtagcaaacgcg
R- <i>pus</i> -1	<i>pus</i>	ccaattcctcaagggtgcacccaagcgcataccgcgtc
F- <i>pus</i> -2	<i>pus</i>	gacgcggtatgcgcttgggtgcaacctgaaggaattgg
R- <i>pus</i> -2	<i>pus</i>	aaaggatccctgggccaagctgctcag
F- <i>ppc</i> 1679621	<i>ppc</i>	tttgcgtacgagcggtaggc
R- <i>ppc</i> 1680143	<i>ppc</i>	acgaaaggattttaccatgactgatttttacgcgat
F-sod- <i>ppc</i> 1680143	<i>ppc</i>	atcgcgtaaaaaatcagtcagtggttaaaaaatccttctgt
F-up- <i>ppc</i> 1680144-sod	<i>ppc</i>	ccggaataattggcagcta aactactttaaacactcttt
R-sod-up- <i>ppc</i> 1680144	<i>ppc</i>	aaagagtgttaagtagtttagctccaattattccgg
R-up- <i>ppc</i> 1680643	<i>ppc</i>	cttgctggcctggatgctgct
F-sod- <i>ppc</i>	<i>ppc</i>	gaaaggattttaccatgactgatttttacgcgat
F sod- <i>ppc</i> -cat	<i>ppc</i>	gggtcgacgatatctagctccaattattccggg
FpJET	pJET1.2	cgactcactataggagagcggc

Таблица 3. Продолжение

Table 3. (Contd.)

RpJET	pJET1.2	ttctttagctaaaaggtaccgtc
FM13/pUC(-40)	M13	gtttcccagtcacgac
14-Km20sqrev	Km ^R	ctaccttcttcacgaggcagacctc
F-RT	<i>ppc</i>	acctggctgaaactcaatga
R-RT	<i>ppc</i>	atcaaaaacagtgcgcgcg

Курсивом выделены сайты рестрикции.
Restriction sites are shown in italics.

В результате встроенные в плазмиду pJET1.2 фрагменты имели делеции генов *pus* и *pyk* в центральной части. Для получения делеционного варианта гена *ppc* из амплифицированного с помощью праймеров F-*ppc* и R-*ppc* (табл. 3) и лигированного в плазмиду pJET1.2 фрагмента ДНК размером 2760 п.н. с помощью рестриктазы EcoRI был вырезан внутренний участок размером 440 п.н. В дальнейшем фрагменты с делециями генов *pus*, *ppc* и *pyk* были переклонированы в вектор pKAC-sac13 для введения в штаммы *C. glutamicum*.

Для создания конструкции, содержащей ген *ppc* под промотором *sod*, с помощью ПЦР-амплификации, используя перекрывающиеся праймеры (табл. 3), была собрана последовательность, состоящая из 3 фрагментов: фрагмент, предшествующий структурному гену *ppc*, новый промотор гена *sod* и фрагмент структурного гена *ppc* со стартовым кодоном. Полученный фрагмент 1217 п.н. клонировали в плазмиду pJET1.2 и вектор pKAC-sac13.

Для конструирования штаммов *C. glutamicum* В-11969 с делециями в генах *pus*, *ppc* и *pyk* провели трансформацию штаммов плазмидами pKAC-*Друс*, pKAC-*Дppc* и pKAC-*Дpyk*. У Km^R трансформантов индуцировали выщепление плазмиды на среде ВН1 с 10 % сахарозы и среди выросших колоний искали Km^S по отсутствию роста на среде ВН1 с канамицином (10 мкг/мл). Из таких клонов выделяли хромосомную ДНК и проводили ПЦР с концевых праймеров (табл. 3) на выявление делеций. В качестве контроля ставили ПЦР с хромосомной ДНК штамма В-11969. В результате скрининга отобраны штаммы Н144 с делецией в гене *pyk*, штамм Н153 с делецией в гене *ppc* и штамм Н140 делеций в гене *pus*. Наличие делеции подтвердили секвенированием фрагментов, амплифицированных с хромосомной ДНК этих штаммов.

Для получения конструкции с геном *ppc* под контролем промотора *sod* на автономной плазмиде pNS2 [3] были амплифицированы, а затем объединены с помощью ПЦР 2 фрагмента — промотор гена *sod* и структурный ген *ppc* из штамма 90. Пра-

вильность сборки подтвердили секвенированием. Полученная плазида названа pNS2-P_{sod}-*ppc*.

Генно-инженерные методы. Выделение плазмид и трансформацию *E. coli* проводили по стандартным методикам [9]. Рестриктию и лигирование ДНК проводили в условиях, рекомендованных изготовителем ферментов Thermo Scientific (США). Амплификацию проводили с использованием Mastercycler gradient “Eppendorf” (Германия), с помощью полимеразы Phusion High-Fidelity (#F-503L) “Thermo Scientific” (США) или Taq-полимеразы (#EP0404) Fermentas (Литва) в условиях, рекомендованных изготовителем. Олигонуклеотиды были синтезированы в НИЦ «Курчатовский институт» (Россия). Приготовление компетентной культуры *C. glutamicum* и электропорацию проводили в соответствии с методом [20]. Условия электропорации: 2500 В, 25 мкФ, 200 Ом. Длительность электроимпульса составляла 4,5–5,5 мс, в зависимости от качества клеток и чистоты ДНК.

Метод ПЦР в реальном времени. Тотальные РНК были выделены из клеток *C. glutamicum* с использованием RNeasy Mini Kit “QIAGEN” (Германия). Лизис клеток производили с использованием жидкого азота. Для тщательного удаления остатков ДНК извлеченную РНК обрабатывали ДНКазой I “ThermoFisher Scientific” (США) в течение 30 мин. Синтез кДНК проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit “Евроген” (Россия) согласно протоколу производителя с использованием случайного декануклеотидного праймера. ПЦР осуществляли на приборе ABI 7500 PCR System Fast “Applied Biosystems” (США) с помощью набора реагентов qPCRMix-HS SYBR Low LowRox “Евроген” (Россия). Условия амплификации кДНК были следующие: 95 °С, 5 мин, затем 40 циклов, 95 °С в течение 30 с, 65 °С в течение 20 с и 72 °С в течение 30 с. ПЦР проводили с использованием праймеров для гена *ppc* — F-RT и R-RT.

Относительные количества мРНК были определены с использованием метода ΔΔСТ, со стандартными алгоритмами расчета, предоставленными

7500 Fast Software версии 2.3 “Applied Biosystems” (США). Все количественные определения выполнены трижды и представлены в виде усредненного значения \pm стандартное отклонение (SD).

Аналитические методы. Оптическую плотность выращенных культур измеряли на спектрофотометре UV-1800 “Shimadzu” (Япония) при 600 нм в 1-см кювете. Концентрацию L-лизина определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа UltiMate 3000 с детектором Fluorescence Detector FLD-3100 и автосемплером WPS-3000TSL ANALYTICAL “Thermo Scientist” (США). Прием и обработку данных производили с использованием компьютерной программы 2Chromleon Dionex Version 7.2.3.755.

Активности ферментов определяли в бесклеточных экстрактах, полученных путем разрушения ультразвуком клеток штаммов, суспендированных в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 7,5), в течение 5 мин при 0 °С. Остатки разрушенных клеток отделяли центрифугированием при 12000 об./мин на центрифуге 5417R “Eppendorf” (Германия) в течение 10 мин при 4 °С. Содержание белка в надосадочной жидкости определяли по методу Лоури.

Активность ПКи определяли на спектрофотометре UV-1800 “Shimadzu” (Япония) при комнатной температуре путем измерения уменьшения поглощения при длине волны 340 нм за счет превращения НАДН в НАД⁺ с участием лактатдегидрогеназы согласно [5] с модификациями. Активность ПКи рассчитывали исходя из коэффициента поглощения НАДН, как нмоль НАДН превращающегося в НАД⁺ за 1 мин (ед.) в расчете на 1 мг общего белка (ед./мг белка).

Активность ФЕПК определяли на спектрофотометре UV-1800 “Shimadzu” (Япония) при комнатной температуре, измеряя изменение поглощения при длине волны 340 нм при превращении НАДН в НАД⁺ с участием малатдегидрогеназы как описано [7] с модификациями. Активность ФЕПК рассчитывали как нмоль НАДН превращающегося в НАД⁺ за 1 мин (ед.) в расчете на 1 мг общего белка (ед./мг белка).

По окончании культивирования рассчитывали конверсию как отношение количества синтезированного L-лизина (по лизин гидрохлориду) к затраченной глюкозе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм В-11969, созданный с помощью методов классического мутагенеза, селекции и генно-инженерных методов, является продуцентом L-лизина промышленного уровня. Для выявления в данном штамме наиболее важных метаболических реакций синтеза предшественников лизина — оксалоацетата/пирувата изучали влияние нарушения синтеза ферментов ФЕПК, ПК и ПКи, путем внесения делеций в кодирующие их гены, на рост штамма и продукцию лизина.

Ферментативные свойства делеционных мутантных штаммов Н140, Н144 и Н153. С помощью метода гомологичной рекомбинации, описанного в «Методике», в геном штамма В-11969 были внесены следующие мутации — делеция в гене *pus* (штамм Н140), делеция в гене *pyk* (штамм Н144), делеция в гене *prc* (штамм Н153). Активности ферментов ФЕПК и ПКи были измерены и представлены в табл. 4.

Таблица 4. Активность ферментов ПКи и ФЕПК в штаммах В-11969, Н140, Н144 и Н153

Table 4. Activity of PYK and PEPC enzymes in strains В-11969, Н140, Н144, and Н153

Штамм	Генотип штамма	ПКи, ед./мг белка	ФЕПК, относительная активность*, %	
			без аспартата	в присутствии аспартата (10мМ)
В-11969	Исходный штамм	1122	100	17
Н140	В-11969 <i>Δpus</i>	1156	460	82,5
Н144	В-11969 <i>Δpyk</i>	139	76	НД
Н153	В-11969 <i>Δprc</i>	590	0	0

* За 100 % принята активность ФЕПК в штамме В-11969 без ингибитора — 35 ± 5 ед./мг белка. В таблице приведены средние значения не менее чем по 3 измерениям. Погрешность измерений составляет до 15 %.

* The activity of PEPC in the В-11969 strain without an inhibitor is taken as 100 %, 35 ± 5 units/mg protein. This table shows the average values for at least three measurements. The measurement error is up to 15 %.

Что касается активности ПК, то из-за значительной лабильности фермента в бесклеточных экстрактах и на пермеабилizованных клетках в наших условиях наблюдалась только фоновая активность. Поскольку известно, что активность ФЕПК активируется ацетил-коэнзимом А и фруктозо-1,6-дифосфатом, а ингибируется аспаратом и малатом [14], то интересно было также определить, сохранилось ли ингибирование ФЕПК аспаратом, предшественником лизина, в штамме продуценте лизина В-11969.

Из табл. 4 видно, что введение делеции в ген *рук* (штамм Н144) приводило к снижению активности ПКи, кодируемой этим геном, почти в 10 раз, что подтверждало нарушение синтеза этого фермента в результате введения мутации. Остаточная активность ПКи по-видимому связана с возможным наличием в этом микроорганизме другой ПКи [6]. При этом активность ФЕПК сохранялась на уровне контрольного штамма. Тогда как по данным Савада с соавт. [18] делеция гена *рук* в штамме дикого типа АТСС 13032 приводила к увеличению активности ФЕПК в 1,2 раза.

В штамме Н153 с делецией в гене *ррс* активность ФЕПК не определялась, что подтверждало нарушение синтеза этого фермента с помощью введенной мутации. При этом активность ПКи уменьшилась в 2 раза по сравнению с исходным штаммом. Чем обусловлено такое снижение активности, пока не ясно и требует дальнейших исследований.

В штамме Н140 с делецией в гене *рус*, активность ПКи сохранялась на уровне исходного штамма, но при этом активность ФЕПК увеличивалась в 4,6 раза. Возможно, это связано с тем, что в отсутствие оттока пирувата на синтез оксалоацетата с помощью ПК из него начинает синтезироваться больше ацетил-коэнзима А, который, согласно литературным данным, является активатором ФЕПК [14].

Также следует отметить, что в штамме-продуценте лизина В-11969, а также в производном штамме Н140 сохранялось ингибирование активности ФЕПК аспаратом, метаболитом — предшественником лизина (табл. 4).

Влияние нарушения синтеза ФЕПК, ПК или ПКи на рост и продукцию лизина штаммом В-11969. Ростовые характеристики и уровень продукции лизина при выращивании исходного и мутантных штаммов на средах МС и ФС представлены на рис. 2 и 3. Штаммы выращивали в пробирках, как описано в «Методике».

Из результатов, приведенных на рис. 2 а, следует, что отсутствие активности ПК (Н140) или ФЕПК (Н153) слабо сказывалось на росте штамма-продуцента на МС среде. Тогда как отсутствие активности ПКи (Н144) приводило к замедлению роста штамма.

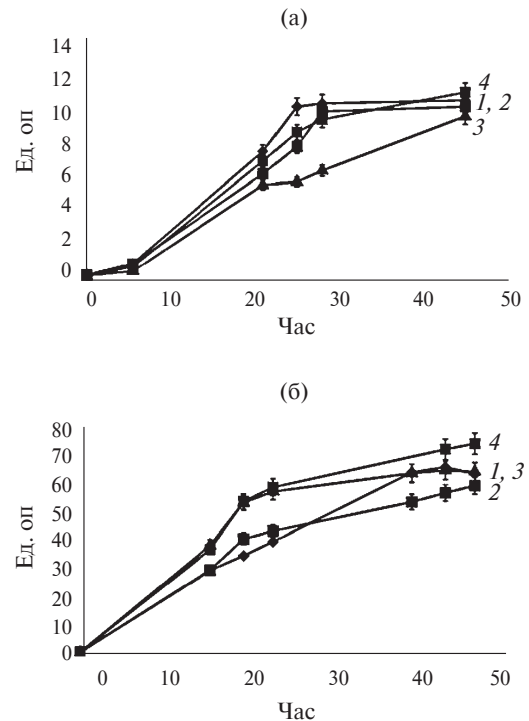


Рис. 2. Рост штаммов В-11969 (1), Н140 (2), Н144 (3) и Н153 (4) на среде МС (а) или ФС (б)

Fig. 2. Growth of strains В-11969 (1), Н140 (2), Н144 (3), and Н153 (4) on MM (а) or FM medium (б)

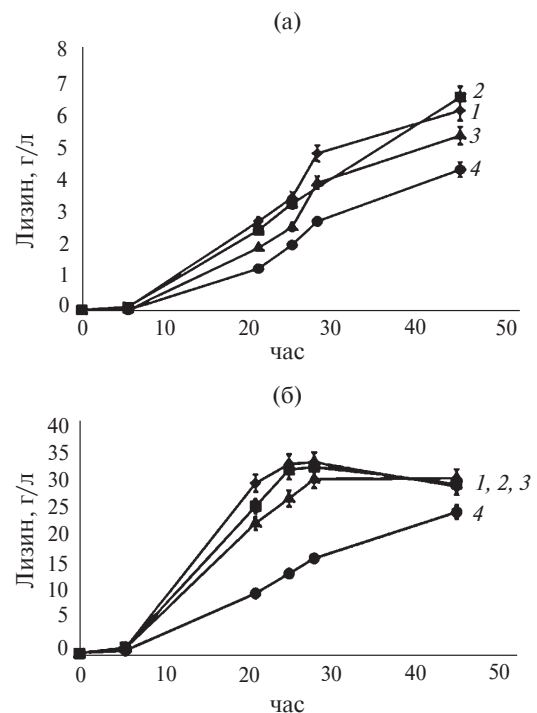


Рис. 3. Продукция лизина штаммами В-11969 (1), Н140 (2), Н144 (3) и Н153 (4) при росте на среде МС (а) или ФС (б)

Fig. 3. Lysine production by strains В-11969 (1), Н140 (2), Н144 (3), and Н153 (4) during growth on MM (а) or FM (б) medium

При выращивании штаммов на ФС среде, которая по сравнению со средой МС содержала на порядок больше глюкозы (100 по сравнению с 10 г/л) и гидролизат пшеничного глютеина, наблюдалась обратная картина (рис. 2 б) — штамм Н144 рос быстрее штаммов В-11969 и Н140. Кроме того, по сравнению с другими штаммами Н144 значительно быстрее потреблял глюкозу. Так, на 40 ч культивирования остаточная концентрация глюкозы в среде составляла 0,25 г/л (Н144), 26,4 г/л (В-11969), 34,2 г/л (Н140) и 39,7 г/л (Н153). Более быстрый рост отмечался и для штамма Н153.

Как видно из данных, представленных на рис. 3, отсутствие активности ПК (Н140) не приводило к уменьшению продукции лизина как на МС, так и на ФС среде. Продукция лизина штаммами В-11969 и Н140 на МС среде за 45 ч составила $6,75 \pm 0,3$ и $7,2 \pm 0,35$ г/л, а на ФС за 50 ч — $29,5 \pm 1,5$ и $30,0 \pm 1,5$ г/л соответственно. При этом у штамма Н140 отмечалось небольшое (на 1–2 %) увеличение конверсии глюкозы в лизин (рис. 4).

Отсутствие активности ПКи (Н144) приводило к уменьшению синтеза лизина на МС среде — $5,9 \pm 0,3$ г/л за 45 ч по сравнению с $6,75 \pm 0,3$ г/л в случае исходного штамма (рис. 3 а). При этом наибольшее замедление синтеза лизина отмечалось в первые сутки ферментации (на 20–25 %). На ФС среде (рис. 3 б) в первые сутки ферментации также отмечалось снижение скорости синтеза лизина штаммом Н144 (на 20–25 %). В то же время концентрация лизина в культуральной жидкости к концу ферментации в обоих случаях составляла $29,5 \pm 1,5$ г/л. Снижение конверсии глюкозы в лизин у штамма Н144 отмечалось на обеих средах (рис. 4).

Наибольшее снижение скорости синтеза лизина наблюдалось в случае штамма Н153 (рис. 3), у которого нарушен синтез фермента ФЕПК. На МС среде скорость синтеза лизина снижалась в среднем на 30 %, а на ФС — на 55 %. При этом также наблюдалось снижение конверсии по сравнению с исходным штаммом (рис. 4).

Таким образом, наибольшее негативное влияние на синтез лизина в клетках промышленного штамма-производителя лизина В-11969 оказывало нарушение синтеза фермента ФЕПК. По-видимому, в этом штамме более важную роль в восполнении пула оксалоацетата играла анаплеротическая реакция его синтеза из фосфоенолпирувата под действием ФЕПК, а не из пирувата под действием ПК.

Необходимо отметить, что снижение синтеза лизина, хотя и в меньшей степени, также наблюдалось при нарушении синтеза фермента ПКи. Можно предположить, что в этом случае другие метаболические пути, например, фосфотрансферная система, не обеспечивали синтез другого метаболита — предшественника лизина — пирувата в достаточном количестве.

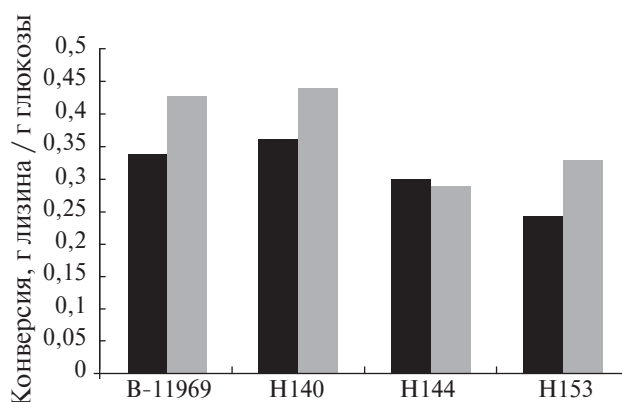


Рис. 4. Сравнение штаммов В-11969, Н140, Н144 и Н153 по уровню конверсии. Конверсия рассчитывается как отношение г синтезированного лизина к г затраченной глюкозы при культивировании штаммов на среде МС (1-й темный столбик) или ФС (2-й столбик)

Fig. 4. Comparison of strains В-11969, Н140, Н144, and Н153 by product yield. Conversion is calculated as the ratio of grams of synthesized lysine to grams of glucose consumed when culturing the strains on the MM (1st black column) or FM (2nd column) medium

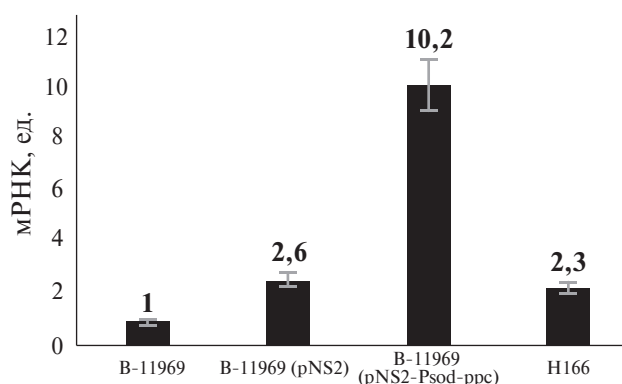


Рис. 5. Сравнение штаммов В-11969, В-11969 (pNS2), В-11969 (pNS2- P_{sod} -ppc) и Н166 по уровню экспрессии гена *ppc*. Количества мРНК рассчитывали как отношение количества мРНК ФЕПК в штамме к количеству мРНК ФЕПК в штамме В-11969

Fig. 5. Comparison of strains В-11969, В-11969 (pNS2), В-11969 (pNS2- P_{sod} -ppc), and Н166 by *ppc* gene expression level. The amount of mRNA was calculated as the ratio of the amount of mRNA PEPC in the strain to the amount of mRNA PEPC in the В-11969 strain

Влияние усиления синтеза ФЕПК на биосинтез лизина в штамме В-11969. В связи с тем, что синтез лизина в штамме В-11969 в наибольшей степени снижался при нарушении синтеза ФЕПК, было сделано предположение, что, возможно, эта реакция является «узким местом» в биосинтезе лизина и что усиление экспрессии гена *ppc* может положительно сказаться на синтезе лизина.

Был сконструирован штамм Н166, в котором экспрессия *ppc* гена усилена за счет подстановки

гена под сильный *sod*-промотор так, как описано в «Методике». Методом ПЦР в реальном времени было показано, что в штамме Н166 экспрессия гена *ppc* была выше в 2,3 раза по сравнению с исходным штаммом В-11969 (рис. 5). При этом и активность ФЕПК в штамме Н166 увеличилась в 3,2 по сравнению с исходным штаммом В-11969 (табл. 5).

Также синтез ФЕПК в штамме В-11969 был усилен за счет введения в него плазмиды рNS2- P_{sod} -*ppc*, в которой клонирован ген *ppc* под *sod*-промотором, как описано в «Методике».

В этом случае экспрессия гена *ppc* увеличилась в 10,2 раза по сравнению с исходным штаммом В-11969 и в 3,9 раза по сравнению со штаммом В-11969 (рNS2), содержащим автономную плазмиду без гена *ppc* (рис. 5). Однако активность ФЕПК при этом увеличилась только в 2,15 раза, то есть меньше, чем при усилении экспрессии *ppc* гена за счет подстановки гена в хромосоме под сильный *sod*-промотор (штамм Н166) (табл. 5). Возможно, это связано с влиянием введенной плазмиды или добавленного к среде канамицина.

Таблица 5. Уровень продукции лизина, рост культур и активность ФЕПК в разных штаммах

Table 5. Lysine production level, culture growth, and PEPC activity in different strains

Штамм	ОП	Лизин, г/л	ФЕПК, относительная активность*, %
В-11969	45,0 ± 5,0	46,0 ± 3,0	100
В-11969 (рNS2)	44,0 ± 5,0	37,0 ± 3,0	140
В-11969 (рNS2- P_{sod} - <i>ppc</i>)	43,5 ± 5,0	43,0 ± 3,0	215
Н166	40,5 ± 5,0	47,0 ± 3,0	320

* За 100 % принята активность ФЕПК в штамме В-11969 — 35 ± 5 ед/мг белка. В таблице приведены средние значения не менее чем по 3 измерениям. Погрешность измерений составляет до 15 %.

* The activity of PEPC in strain В-11969 is taken as 100 %, 35 ± 5 units/mg protein. This table shows average values for at least three measurements. The measurement error is up to 15 %.

Ростовые характеристики и уровень продукции лизина при выращивании штаммов В-11969, В-11969 (рNS2), В-11969 (рNS2- P_{sod} -*ppc*) и Н166 на среде ФС представлены в табл. 5. При выращивании на среде ФС все штаммы демонстрировали близкий рост (табл. 5).

Как видно из представленных данных (табл. 5), усиление экспрессии гена *ppc* как за счет подстановки его под сильный промотор P_{sod} , так и за счет введения в клетки на автономной плазмиде под сильным промотором не привело к увеличению продукции лизина по сравнению с исходным штаммом В-11969. Увеличение активности ФЕПК более чем в 3 раза не приводило к изменению ростовых характеристик штамма и его продуктивности по лизину, что свидетельствует о том, что в данном штамме синтез оксалоацетата с помощью ФЕПК не является лимитирующей стадией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было впервые продемонстрировано, что в штамме-продуценте лизина промышленного уровня *C. glutamicum* ВКПМ В-11969, несущего различные мутации, способствующие усилению синтеза лизина, важнейшую роль в обеспечении пополнения пула оксалоацетата для активного синтеза лизина играет фермент ФЕПК,

а не ПК. Нарушение синтеза ФЕПК приводило к снижению синтеза лизина на 30–55 % в зависимости от условий ферментации, тогда как нарушение синтеза ПК не оказывало негативного влияния на синтез лизина.

Интересно, что в этом отношении данный штамм сходен со штаммом Р, синтез лизина в котором усилен за счет только одной мутации (Т311) в гене аспараткиназы *lysC* [19].

В ряде предыдущих работ [10, 13, 16] были представлены прямо противоположные результаты — для активного синтеза лизина было необходимо функционирование ПК, а не ФЕПК. Сверхэкспрессия ПК приводила к увеличению синтеза лизина на 50 %, а инактивация фермента — к падению синтеза на 60 % [16]. Инактивация же ФЕПК никак не сказывалась на росте штамма и синтезе лизина [10].

Вероятной причиной такого различия между штаммами может быть то, что штаммы В-11969, DG52-5 [11], *C. glutamicum* АТСС 21253 и АТСС 21799 [2] были получены в том числе с помощью мутагенеза и, следовательно, несут в геноме различные мутации, которые могут оказывать прямо противоположное влияние на синтез оксалоацетата с помощью ФЕПК и ПК. Действительно, Яо с соавт. [21] показали, что введение в штамм АТСС 13032 одной мутации — делеции в ген *ftsR1*,

кодирующий субъединицу ацетил-КоА-карбоксилазы, приводит к тому, что нарушение синтеза ПК в этом штамме приводит к увеличению активности ФЕПК и синтезу глутамата, а нарушение синтеза ФЕПК вызывает значительное снижение синтеза глутамата. Тогда как в случае исходного штамма АТСС13032 наблюдалась обратная картина.

В штамме В-11969 нарушен синтез фермента ФЕПКК, который катализирует обратное превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват. Это может приводить к увеличению пула оксалоацетата, образующегося из фосфоенолпирувата, и достижению необходимого баланса в количестве оксалоацетата и пирувата без участия ПК.

Также в штамме В-11969 за счет введения мутации (ATG → GTG) в стартовый кодон гена *icd*, кодирующего фермент ЦТК изоцитратдегидрогеназу, значительно (в 5 раз, данные не приведены) снижена активность этого фермента. Можно предположить, что это приводит к снижению активности ЦТК, что, в свою очередь, может приводить к уве-

личению концентрации ацетил-КоА в клетке. Известно, что ФЕПК активируется ацетил-КоА [12], тогда как ПК, наоборот, ингибируется ацетил-КоА [15]. Соответственно, при высокой концентрации ацетил-КоА синтез оксалоацетата, скорее всего, будет осуществляться в основном за счет действия более активной ФЕПК.

В работе не удалось добиться повышения синтеза лизина за счет увеличения экспрессии кодирующего ФЕПК гена, что свидетельствует о том, что в данном штамме синтез оксалоацетата с помощью ФЕПК не является лимитирующей стадией. При этом полученные в работе данные, а также более подробное изучение распределения потоков метаболитов между отдельными реакциями синтеза/расхода ФЕП, пирувата и оксалоацетата в дальнейшем, будут полезны для разработки оптимальной стратегии создания еще более активного штамма-продуцента L-лизина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ. 2017. № 2639247.
2. Патент США. 1974. № 3825472.
3. Ростова Ю., Передельчук М., Огороков А. и др. Конструирование челночного вектора для коринебактерий и *E. coli*. Клонирование и изучение экспрессии гена *lysC*. *Биотехнология*. 1993. № 4. С. 14–17.
4. Тарутина М.Г., Раевская Н.М., Шустикова Т.Е. и др. Оценка эффективности промоторов *Corynebacterium glutamicum* и их использование для усиления активности генов у лизин-продуцирующих бактерий. *Биотехнология*. 2015. № 6. С. 16–24. <https://doi.org/10.1134/S0003683816070073>
5. Becker J., Klopprogge C., Wittmann C. Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial. Cell. Factories*. 2008. V. 7. № 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-8>
6. Chai X., Shang X., Zhang Y. et al. A novel pyruvate kinase and its application in lactic acid production under oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Biotechnol.* 2016. V. 6. № 79. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0313-6>
7. Chen Z., Bommarreddy R.R., Frank D. et al. Dereglulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *App. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 4. Pp. 1388–1393. <https://doi.org/10.1128/AEM.03535-13>
8. Cremer J., Eggeling L., Sahm H. Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 6. Pp. 1746–1752. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1746-1752.1991>
9. Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. 4 Ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Pp. 11–27.
10. Gubler M., Park S.M., Jetten M. et al. Effects of phosphoenol pyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. V. 40. Pp. 857–863. <https://doi.org/10.1007/BF00173988>
11. Menkel E., Thierbach G., Eggeling L. et al. Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. № 3. Pp. 684–688. <https://doi.org/10.1128/aem.55.3.684-688.1989>
12. Mori M., Shiio I. Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.* 1985. V. 97. № 4. Pp. 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135156>

13. Ohnishi J., Mitsunashi S., Hayashi M. et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. № 2. Pp. 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0883-6>
14. Ozaki H., Shiio I. Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum* II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *J. Biochem.* 1969. V. 66. № 3. Pp. 297–311. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129148>
15. Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., Paul S. et al. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* 1997. V. 143. № 4. Pp. 1095–1103. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1095>
16. Peters-Wendisch P.G., Schiel B., Wendisch V.F. et al. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 3. № 2. Pp. 295–300. PMID: 11321586.
17. Sauer U., Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. № 4. Pp. 765–794. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.002>
18. Sawada K., Zen-in S., Wada M. et al. Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Metab. Eng.* 2010. V. 12. № 4. Pp. 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.01.004>
19. Shinmori A., Guo Z., Maeda T. et al. Contributions of the anaplerotic reaction enzymes pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase to L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.* 2024. V. 138. № 3. Pp. 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2024.05.015>
20. Van der Rest M.E., Lange C., Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 52. № 4. Pp. 541–545. <https://doi.org/10.1007/s002530051557>
21. Yao W., Deng X., Zhong Y. et al. Double deletion of *dtsRI* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 36. № 7. P. 911–921. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0569-0>
22. Yokota A., Sawada K., Wada M. Boosting anaplerotic reactions by pyruvate kinase gene deletion and phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization for glutamic acid and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2017. V. 159. Pp. 181–198. https://doi.org/10.1007/10_2016_31

REFERENCES

1. RF Patent no. 2639247, 2017.
2. US Patent no. 3825472, 1974.
3. Rostova Iu., Peredel'chuk M., Okorokov A. et al. Construction of a shuttle vector for corynebacteria and *E. coli*. Cloning and expression study of the *lysC* gene. *Biotehnologiya.* 1993. № 4. Pp. 14–17 (In Russ.).
4. Tarutina M.G., Raevskaya N.M., Shustikova T.E. et al. Assessment of effectiveness of *Corynebacterium glutamicum* promoters and their application for the enhancement of gene activity in lysin-producing bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. № 7. P. 692–698. <https://doi.org/10.1134/S0003683816070073> (In Russ.)
5. Becker J., Klopprogge C., Wittmann C. Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial. Cell. Factories.* 2008. V. 7. № 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-8>
6. Chai X., Shang X., Zhang Y. et al. A novel pyruvate kinase and its application in lactic acid production under oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Biotechnol.* 2016. V. 6. № 79. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0313-6>
7. Chen Z., Bommareddy R.R., Frank D. et al. Dereglulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *App. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 4. P. 1388–1393. <https://doi.org/10.1128/AEM.03535-13>
8. Cremer J., Eggeling L., Sahm H. Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 6. P. 1746–1752. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1746-1752.1991>
9. Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: Laboratory Manual.* / 4 Ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Pp. 11–27.
10. Gubler M., Park S.M., Jetten M. et al. Effects of phosphoenol pyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. V. 40. Pp. 857–863. <https://doi.org/10.1007/BF00173988>

11. Menkel E., Thierbach G., Eggeling L. et al. Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. № 3. P. 684–688. <https://doi.org/10.1128/aem.55.3.684-688.1989>
12. Mori M., Shio I. Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.* 1985. V. 97. № 4. P. 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135156>
13. Ohnishi J., Mitsuhashi S., Hayashi M. et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. № 2. P. 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0883-6>
14. Ozaki H., Shio I. Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum* II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *J. Biochem.* 1969. V. 66. № 3. P. 297–311. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129148>
15. Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., Paul S. et al. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* 1997. V. 143. № 4. P. 1095–1103. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1095>
16. Peters-Wendisch P.G., Schiel B., Wendisch V.F. et al. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 3. № 2. P. 295–300. PMID: 11321586.
17. Sauer U., Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. № 4. P. 765–794. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.002>
18. Sawada K., Zen-in S., Wada M. et al. Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Metab. Eng.* 2010. V. 12. № 4. P. 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.01.004>
19. Shinmori A., Guo Z., Maeda T. et al. Contributions of the anaplerotic reaction enzymes pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase to l-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.* 2024. V. 138. № 3. P. 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2024.05.015>
20. Van der Rest M.E., Lange C., Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 52. № 4. P. 541–545. <https://doi.org/10.1007/s002530051557>
21. Yao W., Deng X., Zhong Y. et al. Double deletion of *ptsRI* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 36. № 7. P. 911–921. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0569-0>
22. Yokota A., Sawada K., Wada M. Boosting anaplerotic reactions by pyruvate kinase gene deletion and phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization for glutamic acid and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2017. V. 159. Pp. 181–198. https://doi.org/10.1007/10_2016_31

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Леонова Татьяна Евгеньевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация
E-mail: Leonova_TE@nrcki.ru, tanpog@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4667-6570>

Рябченко Людмила Евгеньевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-5524-3841>

Калинина Татьяна Игоревна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-3425-6701>

ABOUT THE AUTHORS

Leonova, Tatyana E. — PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation
E-mail: Leonova_TE@nrcki.ru, tanpog@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4667-6570>

Ryabchenko, Lyudmila E. — PhD in Biological Sciences, Leading researcher, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-5524-3841>

Kalinina, Tatyana I. — PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-3425-6701>

Герасимова Татьяна Васильевна — научный сотрудник, ФГБУ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация. **Скончалась.**

Яненко Александр Степанович — доктор биологических наук, заместитель руководителя Комплекса НБИКС-природоподобных технологий по научной работе, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0002-7277-1336>

Gerasimova, Tatyana V. — Research Fellow, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation. **Died.**

Yanenko, Alexander S. — Doctor of Biological Sciences, Deputy Head of the Kurchatov NBICS-NT Complex for scientific work, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-7277-1336>

Поступила в редакцию 27.08.2025

После доработки 07.09.2025

Принята к публикации 29.09.2025

Received August 27, 2025

Revised September 07, 2025

Accepted September 29, 2025