

Сверхсинтез L-валина в редактированных клетках *Corynebacterium glutamicum* и причины его нестабильности

Шереметьева М.*, Дерунец А., Розанцева В., Леонова Т., Герасимова Т., Яненко А.

НИИ «Курчатовский институт», Курчатовский геномный центр, Москва, Россия

* m.e.sheremetieva@gmail.com

Ключевые слова: *Corynebacterium glutamicum*; штамм-продуцент; L-валин; ацетолактатсинтаза

Мотивация и цель: L-валин (далее – валин) – незаменимая аминокислота, участвующая не только в синтезе белков, но также в регуляторных процессах внутри клеток. Валин используется в различных областях производства, например, в фармакологии и косметологии, но наиболее широкое применение находит в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных [1].

Основные объёмы валина получают биотехнологическим способом, с помощью штаммов-продуцентов. Популярная основа для таких штаммов – безопасная и неприхотливая почвенная бактерия *Corynebacterium glutamicum* [2]. В нашей стране собственное производство валина пока отсутствует. Современные условия делают необходимым создание такого производства, включая разработку штаммов-продуцентов.

Мы сконструировали штамм *C. glutamicum* VG с уровнем продукции валина в лабораторном ферментёре не менее 70 г/л, что близко к растворимости валина в воде при 30 °С. Однако выяснилось, что продуктивность штамма после нескольких пассажей может опуститься до 40 г/л и ниже (штамм VG-X). Нашей задачей было установить причину этого явления, чтобы предотвратить падение продукции валина при использовании штамма в биотехнологическом процессе.

Методы и алгоритмы: Ферментацию штамма VG и его производных осуществляли в лабораторных ферментёрах на среде с глюкозой и кукурузным экстрактом, а также в пробирках на среде с глюкозой и гидролизатом пшеничного белка. Продуктивность культур оценивали по содержанию L-валина в культуральной жидкости, измеренному с помощью ВЭЖХ. Определение активности ключевого фермента биосинтеза валина ацетолактатсинтазы (ANAS) осуществляли методом Го с соавт. [3]. Секвенирование генов производили по Сэнгеру. Для моделирования белковых молекул применяли программу AlphaFold2 [4]. Для сверхэкспрессии генов использовали автономную плазмиду pNS2 [5].

Результаты: Анализ серии штаммов, полученных из отдельных клонов штамма VG-X, выявил, что эти штаммы имеют разную продуктивность по валину – от 0 до 100 % продуктивности штамма VG. Измерение активности фермента ANAS показало, что она также составляет от 0 до 100 % активности ANAS у штамма VG, причём варьирует пропорционально уровню продукции. Секвенирование генов *ilvBN* в этих штаммах позволило выявить ряд точечных замен нуклеотидов, среди которых – значимые мутации в гене *ilvN*. Моделирование белка IlvN (регуляторная субъединица ANAS) показало, что эти мутации вызывают изменение его структуры, результатом чего может стать нарушение функционирования фермента. Трансформация штамма, несущего одну из таких мутаций, плазмидой

pNS2 с геном *ilvN* без мутации позволила восстановить активность АНАС и продукцию валина. Отсюда следует, что падение продуктивности у этого штамма, действительно, было связано с инактивацией АНАС из-за мутации в гене *ilvN*.

Выводы: Мы предполагаем, что снижение активности АНАС в штамме VG ведёт к перенаправлению потока метаболитов от биосинтеза валина на другие процессы, поэтому клетки с соответствующими мутациями растут быстрее и накапливаются в культуре. Необходимая мера для того, чтобы продуктивность штамма VG при промышленном культивировании оставалась высокой – контроль уровня активности АНАС в посевном материале.

Финансирование: Исследование частично поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (грант № 075-15-2019-1659) и Государственным заданием НИЦ «Курчатовский институт».

L-valine supersynthesis in edited *Corynebacterium glutamicum* cells and the reasons for its instability

Sheremetieva M. *, Derunets A., Rozantseva V., Leonova T., Gerasimova T., Yanenko A.

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

* m.e.sheremetieva@gmail.com

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; producer strain; L-valine; acetolactate synthase

Motivation and Aim: L-valine (hereinafter referred to as valine) is an essential amino acid involved not only in protein synthesis but also in regulatory processes within cells. Valine is used in various fields of production, for example, in pharmacology and cosmetology, but it is most widely used as a feed additive for farm animals [1].

The main amounts of valine are obtained biotechnologically, using strains-producers. A popular basis for such strains is the safe and unpretentious soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* [2]. In Russia, domestic production of valine still doesn't exist. The current situation dictates the necessity to create such production, including the development of strains-producers.

We designed a strain of *C. glutamicum* VG with a level of valine production in the laboratory fermenter of at least 70 g/L, which is close to the solubility of valine in water at 30 °C. However, it was found that the productivity of the strain can drop to 40 g/L or lower after several passages (VG-X strain). Our goal was to determine the cause of this phenomenon in order to prevent a drop in valine production when the strain is used in a biotechnological process.

Methods and Algorithms: Fermentation of VG strain and its derivatives was carried out in laboratory fermenters on a medium with glucose and a corn extract, and in test tubes on a medium with glucose and wheat protein hydrolysate. The productivity of the cultures was assessed by the L-valine content in the culture fluid measured by HPLC. The activity of the key enzyme of valine biosynthesis, acetolactate synthase (АНАС), was determined by the method of Guo et al. [3]. Gene sequencing was performed by Sanger sequencing. AlphaFold2 program [4] was used for modeling protein molecules. The autonomous plasmid pNS2 was used for gene overexpression [5].

Results: The analysis of a series of strains derived from individual clones of VG-X strain revealed that these strains have different valine productivity, ranging from 0 to 100 % of the productivity of VG strain. Measurement of AHAS enzyme activity showed that it also ranged from 0 to 100 % of AHAS activity in VG strain, with variation proportional to the level of production. Sequencing of the *ilvBN* genes in these strains revealed a number of point nucleotide substitutions, including significant mutations in the *ilvN* gene. Modeling of the IlvN protein (regulatory subunit of AHAS) showed that these mutations cause changes in its structure, which may result in impaired functioning of the enzyme. Transformation of a strain carrying one of these mutations with plasmid pNS2 with the *ilvN* gene without the mutation allowed to restore AHAS activity and valine production. It follows that the drop in productivity in this strain was indeed due to the inactivation of AHAS due to the mutation in the *ilvN* gene.

Conclusion: We assume that a decrease in AHAS activity in VG strain leads to a redirection of metabolite flux from valine biosynthesis to other processes, so cells with the corresponding mutations grow faster and accumulate in culture. A necessary measure to ensure that the productivity of VG strain in industrial cultivation remains high is to control the level of AHAS activity in the inoculum.

Funding: This research was partially funded by the state task of the National Research Center “Kurchatov Institute” and by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation № 075-15-2019-1659.

Список литературы/References

1. Hao Y. et al. Microbial production of branched chain amino acids: Advances and perspectives. *Bioresour Technol.* 2024;397:130502. doi 10.1016/j.biortech.2024.130502
2. Sheremetieva M.E. et al. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to create a producer of L-valine. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii.* 2022;26(8):743-757. doi 10.18699/VJGB-22-90
3. Guo Y. et al. Analysis of acetohydroxyacid synthase variants from branched-chain amino acid-producing strains and their effects on the synthesis of branched-chain amino-acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Protein Expr Purif.* 2015;109:106-112. doi 10.1016/j.pep.2015.02.006
4. Mirdita M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022;19:679-682. doi 10.1038/s41592-022-01488-1
5. Ростова Ю.Г. и др. Конструирование челночного вектора для коринебактерий и *E. coli*. Клонирование и изучение экспрессии гена *lysC*. *Биотехнология.* 1993;4:14-17
[Rostova Y.G. et al. Construction of novel shuttle cloning vector for *Corynebacteria* and *E. coli*. En Cloning and expression of *lysC* gene. *Biotekhnologiya.* 1993;4:14-17 (in Russian)]