

УДК 579.017.8

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ БІОСИНТЕЗІ ЛЕВОКАРНІТИНУ

Решетняк Л. Р.¹, к.т.н., доцент кафедри біотехнології
<https://orcid.org/0000-0002-0049-4851>

Степанченко А. В.¹, магістр кафедри біотехнології
<https://orcid.org/0009-0004-4998-1783>

Данілова К. О.², к.т.н., с.н.с.,
заст. завідувача відділу технології продуктів бродіння
<https://orcid.org/0000-0001-6204-9975>

Поштаренко А. В.¹, к.т.н., старший викладач кафедри біотехнології
<https://orcid.org/0000-0002-3999-4474>

Кайданюк Д. О.¹, студент
<https://orcid.org/0009-0003-4064-4513>

¹Національний авіаційний університет, Київ, Україна

²Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ, Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2023-21-15>

Предмет. Левокарнітин – це заміна амінокислота, яка виконує важливу функцію в організмі людини. Збільшення комерційного попиту на L-карнітин призвело до сплеску досліджень стосовно його біосинтезу за допомогою різних штамів мікроорганізмів. Через швидкоплинність умов культивування досить важко дослідити закони росту в середовищах, що динамічно змінюються. **Мета.** Дослідження основних властивостей бактерій *Escherichia coli* при культивуванні на різних поживних середовищах. **Методи.** Швидкість росту бактерій, активність промотора та рівень субстрату вимірювали за допомогою роботизованого аналізу з високою тимчасовою роздільною здатністю по всій кривій росту в пакетній культурі. **Результати.** Культивування штаму бактерії *Escherichia coli* для біосинтезу левокарнітину проводили на різних середовищах. Активний приріст біомаси на Агарі Мак-Конкі спостерігали через 72 години культивування, в той час як на агарі з жовчі приріст біомаси був меншим на 50%. Культивування бактерій *Escherichia coli* досліджували за різними концентраціями азоту у вигляді NH_4Cl та глюкози в поживних середовищах. Було виявлено, що за низьких концентрацій азоту (0,24 мМ) клітини раптово припиняють ріст, переходячи від максимального до нульового зростання протягом 27 хвилин. За найвищою концентрацією азоту 18,7 мМ, коли кількість азоту не обмежується, клітини поступово сповільнюють ріст і переходять у стаціонарну фазу приблизно протягом 4 годин. На проміжних концентраціях азоту клітини спочатку поступово сповільнюють ріст, а потім його раптово припиняють, що відповідає закону Моно. Подібні результати було одержано при використанні глюкози як лімітуючого фактору. Дослідження промоторної активності різних генів виявило, що різка зупинка росту супроводжується пульсовою регуляцією експресії генів у відповідних шляхах асиміляції поживних речовин. Промоторна активність генів асиміляції азоту та вуглецю різко зростає в останньому поколінні перед припиненням росту. **Сфера застосування результатів.** Результати досліджень будуть використані для встановлення умов культивування мікроорганізмів за обмеженою концентрацією поживних речовин в субстраті.

Ключові слова: культивування, *Escherichia coli*, левокарнітин, поживне середовище, азот, глюкоза, промоторна активність.

PECULIARITIES OF THE CULTIVATION OF *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA DURING LEVOCARNITINE BIOSYNTHESIS

Liudmyla Reshetnyak¹, PhD, Engineering,

Associate Professor of the Department of Biotechnology

<https://orcid.org/0000-0002-0049-4851>

Anna Stepanchenko¹, graduate student

of the Department of Biotechnology

<https://orcid.org/0009-0004-4998-1783>

Kateryna Danilova², PhD, Engineering, Senior Researcher,

Deputy Head of Fermentation Products Technology Department

<https://orcid.org/0000-0001-6204-9975>

Anna Poshtarenko¹, PhD, Engineering, Senior Lecturer

of the Department of Biotechnology

<https://orcid.org/0000-0002-3999-4474>

Dmytro Kaidaniuk¹, Student

<https://orcid.org/0009-0003-4064-4513>

¹National Aviation University, Kyiv, Ukraine

²Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine

<https://doi.org/10.31073/foodresources2023-21-15>

Subject. Levocarnitine is a replaceable amino acid that performs an important function in the human body. The increase in commercial demand for L-carnitine has led to a surge in research on its biosynthesis using various strains of microorganisms. Because of the transience of cultivation conditions, it is quite difficult to study the laws of growth in dynamically changing environments. **Purpose.** Study the main properties of *Escherichia coli* bacteria when cultivated on different nutrient media. **Methods.** Bacterial growth rate, promoter activity, and substrate level were measured by robotic analysis with high temporal resolution throughout the growth curve in batch culture. **Results.** Cultivation of *Escherichia coli* for levocarnitine biosynthesis was carried out on media. Active biomass growth on McConkey Agar was observed after 72 hours of cultivation, while on bile agar biomass growth was less than 50%. Levocarnitine biosynthesis processes were studied at different concentrations of nitrogen nutrients in the form of NH_4Cl or glucose carbon in the media. It was found that at low nitrogen concentrations (0,24 mM), cells suddenly stop growing, going from maximum to zero growth within 27 minutes. At the highest nitrogen concentration of 18,7 mM, when nitrogen is not limiting, cells gradually slow down and enter a stationary phase in about 4 hours. At intermediate nitrogen concentrations, cells first gradually slow down growth, and then suddenly stop it, which corresponds to Mono's law. Similar results were obtained using glucose as a limiting factor. The study of the promoter activity of various genes revealed that a sharp stoppage of growth is accompanied by a pulse regulation of gene expression in the corresponding pathways of assimilation of nutrients. Promoter activity of nitrogen and carbon assimilation genes increases sharply in the last generation before growth ceases. **Scope of results.** The research results will be used to establish the conditions for the cultivation of microorganisms under a limited concentration of substrate nutrients.

Key words: cultivation, *Escherichia coli*, Levocarnitine, nutrient medium, nitrogen, glucose, promoter activity.

Постановка проблеми. Лівокарнітин – це заміна амінокислота, яка виконує важливу функцію в організмі людини. Карнітин синтезується в організмі здорової людини в достатній кількості, але деякі люди можуть стикнутися з дефіцитом цієї амінокислоти. Насамперед це характерно для вегетаріанців, оскільки головне джерело лівокарнітину – це продукти тваринного походження, а також при генетично-обумовленому його дефіциті. Лівокарнітин застосовується при лікуванні таких захворювань, як хвороба нирок, інфаркт міокарда, стенокардії, хвороби Альцгеймера, цукрового діабету 2 типу. Так, дослідження за участю 160 чоловіків і жінок з діагнозом нещодавнього інфаркту міокарда показало, що пероральний прийом L-карнітину (4 г/добу) на додаток до стандартної фармакологічної

терапії протягом одного року значно знижував смертність і частоту нападів стенокардії порівняно з контролем [1]. Застосування левокарнітину помірно покращувало переносимість фізичного навантаження та знижувало електрокардіографічні ознаки ішемії під час навантажувального тесту у деяких пацієнтів зі стенокардією [2].

Найбагатшими джерелами L-карнітину є м'ясо, птиця, риба та молочні продукти, тоді як фрукти, овочі та зернові містять відносно невелику його кількість. Встановлено, що всеїдні дієти забезпечують від 23 до 135 мг L-карнітину на добу в середньому для людини вагою 70 кг, тоді як строгі вегетаріанські дієти можуть забезпечити лише 1 мг на добу для людини вагою 70 кг [3]. Вміст левокарнітину в харчових продуктах наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Вміст левокарнітину в продуктах харчування

Харчові продукти	Кількість, г	Вміст L-карнітину, мг
Біфштекс	85	81
Яловичий фарш	85	80
Свинина	85	24
Канадський бекон	85	20
Молоко (цільне)	200	8
Риба (тріска)	85	5
Куряча грудка	85	3
Морозиво	100	3
Авокадо	120	2
Американський сир	30	1
Цільнозерновий хліб	60	0,2
Спаржа	120	0,2

Здорова людина отримує з їжі від 54% до 86% L-карнітину, тоді як з пероральних добавок засвоюється лише 5–25% левокарнітину (0,6–7,0 г/добу).

Для виробництва левокарнітину використовують бактерії роду *Escherichia* і *Proteus mirabilis*. Переваги виробництва левокарнітину з використанням *E. coli* полягає в її здатності до культивування в умовах високої щільності, стійкості до іммобілізації та добрій пристосованості до зміни режимів культивування.

Чисту культуру бактерій зазвичай отримують зі змішаної культури (такої, що містить багато видів) шляхом перенесення невеликого зразка в нове стерильне середовище для вирощування таким чином, щоб окремі клітини розсіяли по поверхні середовища, або шляхом багаторазового розрідження зразка перед інокуляцією. Обидва методи відокремлюють окремі клітини так, що коли вони розмножуються, кожна з них утворює окрему колонію, яку потім можна використовувати для інокуляції в більшій кількості середовища з гарантією, що буде присутній лише один тип організмів. Ізоляція чистої культури може бути посилена шляхом використання змішаного посіву із середовищем, що сприяє росту певного виду мікроорганізму, виключаючи інші [4].

Останніми роками відновився інтерес до законів росту бактерій. Дослідження кінетики мікробного росту виконувались згідно закону Моно [5], що зв'язує швидкість росту бактерій μ з концентрацією субстрату s за формулою:

$$\mu = \mu_0 \frac{c}{k_c + s}$$

де: μ – швидкість росту бактерій;

μ_0 – швидкість росту бактерій на субстраті, що насичується;

c – концентрація субстрату;

K_c – концентрація субстрату, на якому швидкість росту становить половину максимального.

Метою роботи є дослідження основних властивостей бактерій *Escherichia coli* при культивуванні на різних поживних середовищах.

Матеріали та методи досліджень. Для культивування *E. coli* були використані селективні поживні середовища Мак-Конкі та агар з жовчу. Культивування бактерій *E. coli* проводилось в умовах обмеженого рівня поживних речовин. Для досягнення цього було використано роботизовану систему, яка дозволяє вимірювати оптичну густину, що характеризує ріст бактерій і експресію генів з високою тимчасовою роздільною здатністю (~3 хв) в 96-лункових планшетах. Система переміщувала планшет між інкубатором (37°C) і автоматизованим флуориметром. Було проведено 48 повторень. Усереднення за 48 повторами дало стандартну помилку оптичної густини порядку 2% у кожній точці часу. Експерименти повторювали 2–5 разів з похибкою відтворюваності 7%. Було зроблено припущення, що утворена біомаса клітин бактерій пропорційна оптичній густині.

Даний аналіз дозволяє вимірювати швидкість росту бактерій та промоторну активність вибраних генів. Для цієї мети використовували репортерні штами, в яких досліджуваний промотор контролюється експресією зеленого флуоресцентного білка (ЗФБ). Динамічну експресію від обраних промоторів досліджували з роздільною здатністю 8 хв. Активність промотора вимірювали за швидкістю накопичення зеленої флуоресценції на одиницю оптичної густини [6].

Концентрація лімітуючого компонента в субстраті під час росту розраховувалась за формулою Моно (1). *E. coli* вирощували на граничних концентраціях аміаку або глюкози як модельних систем.

Результати та їх обговорення. Вивчення динаміки росту бактерій *E. coli* (рис. 1) показало, що активний приріст біомаси на Агарі Мак-Конкі спостерігали через 72 години культивування. В той час на агарі з жовчу приріст біомаси був меншим на 50%.

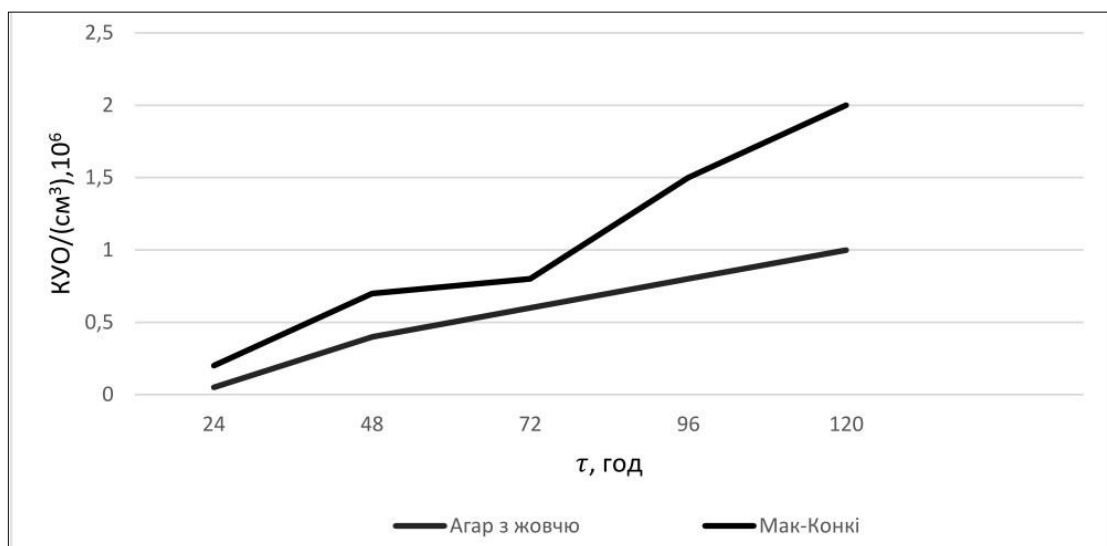


Рис. 1. Динаміка зміни біомаси клітин *E. coli* з використанням агару Мак-Конкі та агару з жовчу

На рис. 2 показано залежність кількості біомаси бактерій *E. coli*, культивованих на агарі Мак-Конкі, від тривалості культивування з додаванням до поживного середовища різних концентрацій азоту у формі хлориду амонію (NH_4Cl), починаючи від мінімальної 0,24 мМ до рівня насичення 18,7 мМ.

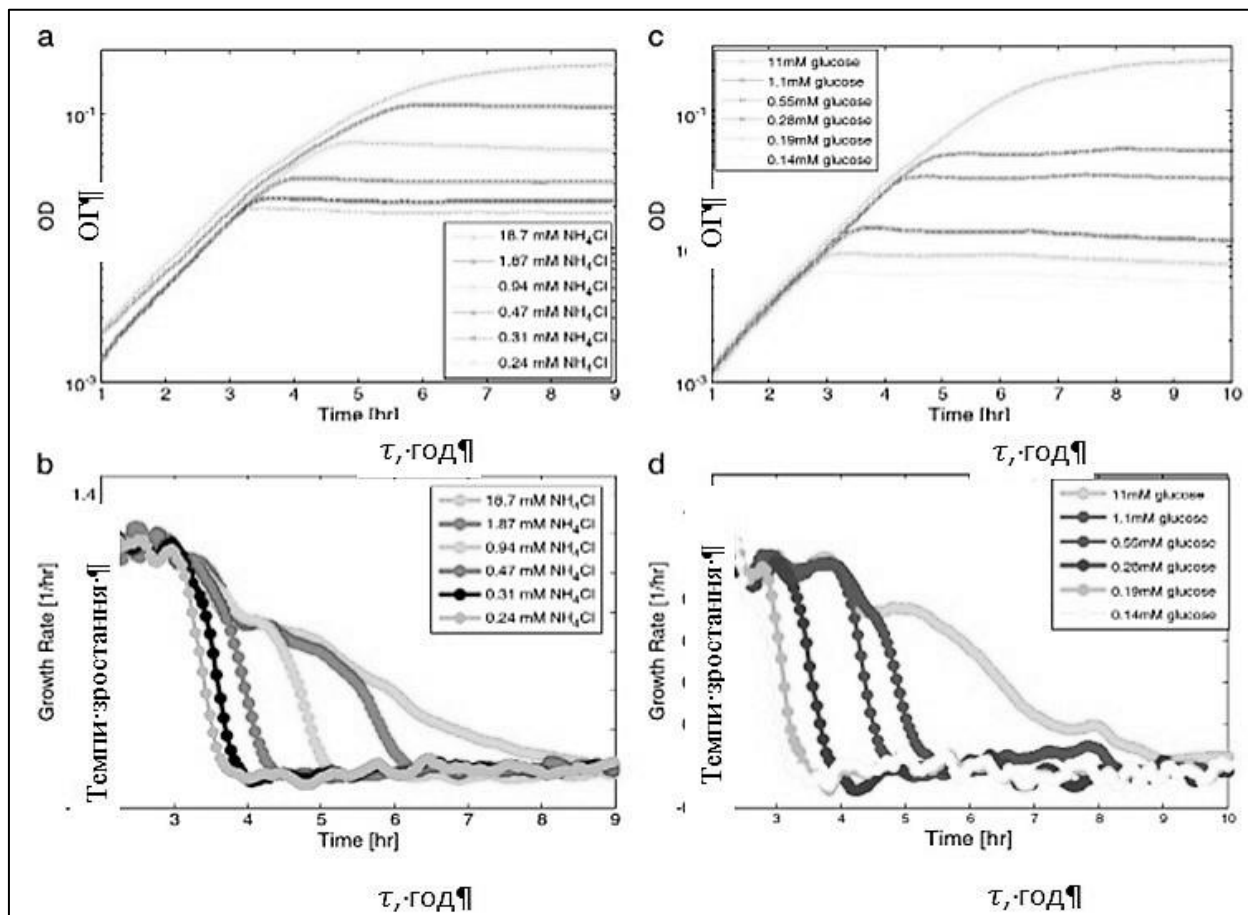


Рис. 2. Залежність кількості біомаси бактерій *E. coli* від тривалості культивування за умов обмеження концентрації NH_4Cl в поживному середовищі

Швидкість експоненціального росту біомаси бактерій була дуже подібною на всіх концентраціях азоту (час генерації 59 ± 4 хв). Ми виявили, що в умовах мінімальної концентрації азоту клітини ростуть експоненціально, а потім раптово припиняють ріст. Чим нижча концентрація азоту, тим раніше припиняється ріст.

Виявлено, що за низьких концентрацій азоту клітини раптово припиняють ріст, переходячи від максимального до нульового зростання протягом 27 ± 4 хвилин (рис. 2, концентрація азоту 0,31 і 0,24 мМ), що відповідає даним, отриманим Wanner і Egli [5]. За найвищою концентрацією азоту 18,7 мМ, коли кількість азоту не обмежується, клітини поступово сповільнюють ріст і переходять у стаціонарну фазу [6, 7]. Це поступове падіння триває приблизно 4 години (рис. 2). На проміжних концентраціях азоту клітини спочатку поступово сповільнюють ріст, а потім його раптово припиняють (рис. 2, концентрація азоту 0,94).

Подібні результати було одержано при використанні глюкози як лімітуючого субстрату (рис. 3).

Клітини, вирощені на Агарі Мак-Конкі з достатньою кількістю азоту (18,7 мМ NH_4Cl) і низькими концентраціями глюкози (менше $\sim 0,5$ мМ), раптово припиняли ріст через 30 ± 3 хв. культивування (рис. 3, концентрація глюкози 0,14, 0,28 мМ. При високих концентраціях глюкози (більше 11 мМ) ріст поступово сповільнюється приблизно протягом 4 годин (рис. 3). На проміжних концентраціях глюкози клітини демонструють перехід між поступовим уповільненням і різкою зупинкою росту. Ці дані корелюють з дослідженнями [8].

Аналіз даних рисунків 2 та 3 виявив, що бактерії можуть підтримувати свою максимальну швидкість росту протягом останнього покоління. Коли активність промотора досягає максимального рівня, швидкість росту падає згідно закону Моно. Генетичні збурення, які скасовують цей імпульс експресії генів, змінюють спосіб уповільнення росту клітин, перетворюючи різку зупинку на поступову. Промоторна активність генів асиміляції азоту та вуглецю різко зростає в останньому поколінні перед припиненням росту.

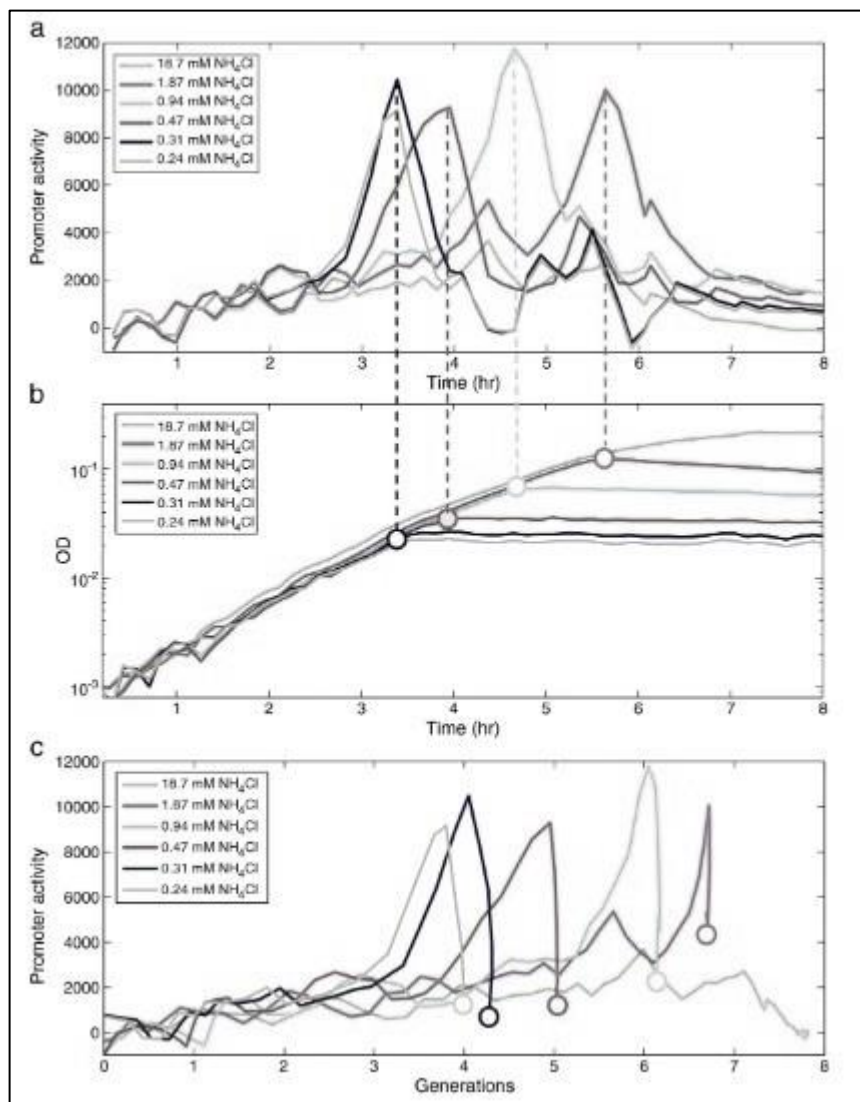


Рис. 3. Залежність кількості біомаси бактерій *E. coli* від тривалості культивування за умов обмеження концентрації глюкози в поживному середовищі

Було досліджено промотор *glnA*, який контролює оперон генів, необхідних для асиміляції аміаку (глутамінсинтетаза *glnA*, регулятор азоту *ntrC* і його регуляторний партнер кіназа *ntrB* [9–10]). Виявлено, що в умовах обмеження азоту промотор *glnA* під час експоненціальної фази мав помірну активність, яка не залежить від концентрації азоту. Потім, приблизно за одне покоління до зупинки росту, активність промотора різко зростала приблизно в 4–6 разів (рис. 4). Далі активність промотора знову падала до низьких рівнів, коли ріст зупинявся.

Промотор *glnA* різко активується в останній генерації росту (рис. 4). Промоторну активність *glnA* розраховували шляхом обчислення швидкості накопичення за одиницю часу, поділеної на оптичну густину на кількох концентраціях початкового азоту з

роздільною здатністю за часом 8 хв. Кожна точка на графіку представляє середню активність промотора 48 експериментальних реплік зі стандартною похибкою порядку ~3% у кожній одиниці часу.

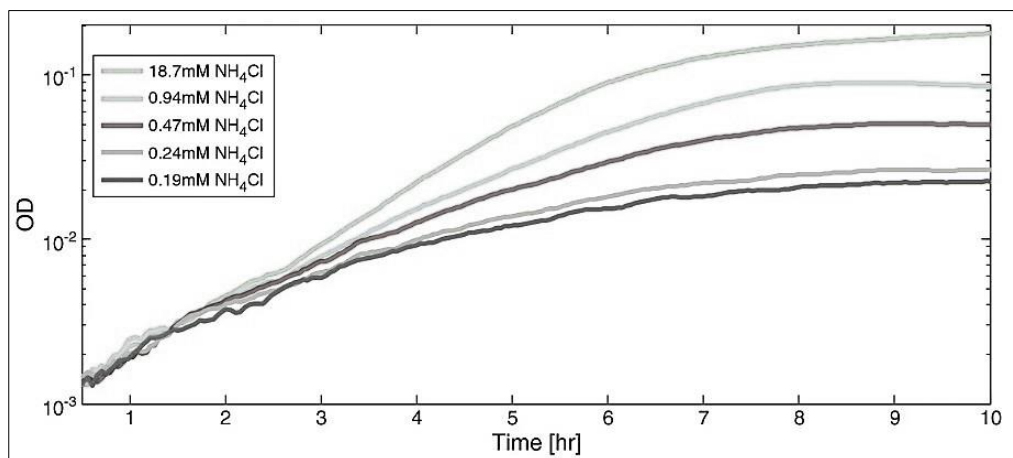


Рис. 4. Залежність промоторної активності від тривалості культивування бактерій *E. coli*

На відміну від імпульсу активності в кінці росту на низьких концентраціях азоту, активність промотора *glnA* залишалася приблизно постійною протягом усього росту на великих концентраціях азоту (18,7 mM NH₄Cl), і вона поступово знижувалася під час входу в стаціонарну фазу (рис. 4). Ми також перевірили промотор *glnK*, який контролює інші гени, залучені до асиміляції аміаку (білок регулятора азоту *glnK* і транспортер аміаку *amtB*). Ми виявили дуже схожі результати: різке підвищення активності промотора за одне покоління до зупинки росту при обмеженні концентрації азоту та базальний рівень, який не залежить від кількості азоту під час експоненціального росту. Це узгоджується з попередніми дослідженнями Ninfа і Magasanik [11], які показали, що *glnA* та *glnK* активуються, коли бактеріям *E. coli* не вистачає аміаку. Навпаки, неспоріднені промотори не показали збільшення активності промотора в кінці росту в умовах обмеження концентрації азоту. Крім того, різка зупинка росту культури бактерій після обмеження азоту не супроводжується підвищеною активністю промоторів, що контролюють відомі гени стаціонарної фази [12].

Підвищення активності промотору *glnA* в останньому поколінні перед припиненням росту при низькому вмісті азоту узгоджується з попередніми висновками про те, що при концентрації азоту 0,19 mM NH₄Cl, *glnA*, який експресується з регульованого промотора, має бути надекспресованим на 4–5 разів більше, ніж його базальні рівні дикого типу (при високому вмісті азоту), щоб досягти тієї ж швидкості росту [13]. Дослідженнями Hart та іншими [13] *glnA* було видалено з хромосоми та поставлено під контроль промотора *tac*. Таким чином, імпульсна експресія *glnA* в останньому поколінні перешкоджає росту бактерій *E. coli*. Було протестовано цей мутантний штам у поточній системі та виявлено, що він продемонстрував поступове зниження швидкості росту, а не різку зупинку на невеликих концентраціях азоту та низьких рівнях індукції. При високій індукції *glnA* раптова зупинка відновлюється.

Також було перевірено ефект видалення *NtrC*-регулятора транскрипції оперону *glnA*, а також інших оперонів, які беруть участь у метаболізмі азоту [14]. Штам *E. coli* з делецією *NtrC* вирощували на агарі Мак-Конкі із зазначеними концентраціями азоту у формі NH₄Cl. Оптичну густину вимірювали з роздільною здатністю кожні 3 хвилини. Штам бактерій *E. coli* з делецією *NtrC*, який має дефекти в регуляції генів метаболізму азоту, продемонстрував повільнішу швидкість росту при низьких концентраціях азоту та поступову, а не різку зупинку росту.

Одержані результати свідчать, що регуляція транскрипції штаму бактерій *E. coli* за допомогою *NtrC* є важливою для отримання максимальної швидкості росту та різкої зупинки росту в умовах обмеження концентрації азоту. У штамі, видаленому регулятором *NtrC*, швидкість росту поступово знижується.

Подібні результати також були знайдені для промотора *ptsG*, який контролює експресію субодиниці *PtsG* глюкозопермеази PTS в умовах обмежених концентрацій глюкози [15]. Слід зазначити, що в цьому випадку промотор є високоактивним, оскільки глюкоза є єдиним джерелом вуглецю, але збільшення та зниження активності промотора є помірними порівняно з обмежувачими умовами. Це спостереження узгоджується з нещодавніми дослідженнями *Berthoumieux* та інших, які показують імпульс рівня цАМФ і різке збільшення активності промотора гена *acs* після зменшення кількості глюкози в субстраті [16].

У сукупності одержані результати свідчать, що посилення регуляції відповідних метаболічних генів в останньому поколінні штамів бактерій *E. coli* забезпечує тривале експоненціальне зростання з наступним різким зниженням.

Висновки. Виявлено, що зростання культури бактерій *E. coli* припиняється при обмеженні концентрації азоту або вуглецю в поживному середовищі, що відповідає закону Моно. Дослідження промоторної активності різних генів виявило, що різка зупинка росту супроводжується пульсовою регуляцією експресії генів у відповідних шляхах асиміляції поживних речовин. Цей механізм дає можливість клітинам підтримувати швидкість росту протягом ще одного покоління, в якому вони можуть використовувати невеликі концентрації поживних речовин субстрату. Результати, представлені в цьому дослідженні, свідчать про стратегію, яку використовують клітини для подовження експоненціального росту при обмежених кількостях азоту та вуглецю в субстраті.

Бібліографія

1. Alhasaniah A. H. l-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci.* 2023 Feb;30(2):103555. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103555. Epub 2022 Dec 30. PMID: 36632072; PMCID: PMC9827390.
2. Fielding R, Riede L, Lugo JP, Bellamine A. l-Carnitine Supplementation in Recovery after Exercise. *Nutrients.* 2018 Mar 13;10(3):349. doi: 10.3390/nu10030349. Erratum in: *Nutrients.* 2018 Apr 26;10(5): PMID: 29534031; PMCID: PMC5872767.
3. Jen-Hong Chu. Effects of Various Lipid Sources and L-Carnitine Supplementation on the Growth Performance, Body Composition, and Antioxidants Enzyme Ability of Dog Conch Larvae, *Laevistrombus canarium*. *Aquaculture Research*, Vol. 2023, Article ID 5336474, 12 pages, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/5336474>.
4. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "pure culture". *Encyclopedia Britannica*, 11 Feb. 2020, <https://www.britannica.com/science/pure-culture>. Accessed 21 September 2023.
5. Wanner U, Egli T: Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiol Rev.* 1990. № 6. P. 19–43.
6. Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, Liebermeister W, Surette MG, Alon U: A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods.* 2006. № 3. C. 623-628. <https://doi.org/10.1038/nmeth895>.
7. Bren, A., Hart, Y., Dekel, E. et al. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst Biol* 7, 27 (2013). <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-27>.
8. Fink JW, Held NA, Manhart M. Microbial population dynamics decouple growth response from environmental nutrient concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Jan 10;120(2):e2207295120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207295120>. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36598949; PMCID: PMC9926246.
9. Kim M, Zhang Z, Okano H, Yan D, Groisman A, Hwa T. Need-based activation of ammonium uptake in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2012;8:616. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.46>. PMID: 23010999; PMCID: PMC3472687.

10. Jahn S, Haverkorn van Rijsewijk BR, Sauer U, Bettenbrock K. A role for EIIA(Ntr) in controlling fluxes in the central metabolism of *E. coli* K12. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):2879-2889. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.011>. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23886628.

11. Ninfa, AJ, Magasanik, B. (1986) Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83. P.5909-5913. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.5909>.

12. Serra DO, Hengge R. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol*. 2014 Jun;16(6):1455-71. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12483>. Epub 2014 May 5. PMID: 24725389; PMCID: PMC4238805.

13. Hart Y, Madar D, Yuan J, Bren A, Mayo AE, Rabinowitz JD, Alon U. Robust control of nitrogen assimilation by a bifunctional enzyme in *E. coli*. *Mol Cell*. 2011. № 41. C.117–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.023>.

14. Mo R, Liu Y, Chen Y, Mao Y, Gao B. Evolutionary Principles of Bacterial Signaling Capacity and Complexity. *mBio*. 2022 Jun 28;13(3):e0076422. doi: 10.1128/mbio.00764-22. Epub 2022 May 10. PMID: 35536007; PMCID: PMC9239204.

15. Serra DO, Hengge R. A c-di-GMP-Based Switch Controls Local Heterogeneity of Extracellular Matrix Synthesis which Is Crucial for Integrity and Morphogenesis of *Escherichia coli* Macrocolony Biofilms. *J Mol Biol*. 2019 Nov 22;431(23):4775–4793. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.001>. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30954572.

16. Iyer MS, Pal A, Venkatesh KV. A Systems Biology Approach To Disentangle the Direct and Indirect Effects of Global Transcription Factors on Gene Expression in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2023 Feb 7;11(2):e0210122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02101-22>. Epub ahead of print. PMID: 36749045; PMCID: PMC10100776.

References

1. Alhasaniah A. H. (2023). l-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci*. 2023 Feb;30(2):103555. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103555>. Epub 2022 Dec 30. PMID: 36632072; PMCID: PMC9827390.

2. Fielding, R., Riede, L., Lugo, J. P., Bellamine, A. (2018). l-Carnitine Supplementation in Recovery after Exercise. *Nutrients*. Mar, 13;10(3):349. <https://doi.org/10.3390/nu10030349>. Erratum in: *Nutrients*. 2018 Apr 26;10(5): PMID: 29534031; PMCID: PMC5872767.

3. Jen-Hong, Chu. (2023). Effects of Various Lipid Sources and L-Carnitine Supplementation on the Growth Performance, Body Composition, and Antioxidants Enzyme Ability of Dog Conch Larvae, *Laevistrombus canarium*. *Aquaculture Research*. Vol. 2023, Article ID 5336474, 12 p. <https://doi.org/10.1155/2023/5336474>.

4. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. (2020). "pure culture". *Encyclopedia Britannica*, 11 Feb. 2020, <https://www.britannica.com/science/pure-culture>. Accessed 21 September 2023.

5. Wanner U, Egli T: Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiol Rev*. 1990. № 6. P. 19–43.

6. Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G., Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods*. № 3. C. 623–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth895>.

7. Bren, A., Hart, Y., Dekel, E. et al. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst Biol* 7, 27 (2013). <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-27>.

8. Fink, J.W., Held, N.A., Manhart, M. (2023). Microbial population dynamics decouple growth response from environmental nutrient concentration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2023 Jan 10;120(2):e2207295120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207295120>. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36598949; PMCID: PMC9926246.

9. Kim, M., Zhang, Z., Okano, H., Yan, D., Groisman, A., Hwa, T. (2012). Need-based activation of ammonium uptake in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*. 2012;8:616. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.46>. PMID: 23010999; PMCID: PMC3472687.

10. Jahn, S., Haverkorn van Rijsewijk, B.R., Sauer, U., Bettenbrock, K. (2013). A role for EIIA(Ntr) in controlling fluxes in the central metabolism of *E. coli* K12. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):2879-2889. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.011>. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23886628.

11. Ninfa, A. J., Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 83. P. 5909–5913. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.5909>.
12. Serra, D. O., Hengge R. (2014). Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. Environ Microbiol. 2014 Jun;16(6):1455-71. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12483>. Epub 2014 May 5. PMID: 24725389; PMCID: PMC4238805.
13. Hart Y, Madar D, Yuan J, Bren A, Mayo AE, Rabinowitz JD, Alon U. Robust control of nitrogen assimilation by a bifunctional enzyme in *E. coli*. Mol Cell. 2011.№ 41. P. 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.023>.
14. Mo, R., Liu, Y., Chen, Y., Mao, Y., Gao, B. (2022). Evolutionary Principles of Bacterial Signaling Capacity and Complexity. mBio. 2022 Jun 28;13(3):e0076422. <https://doi.org/10.1128/mbio.00764-22>. Epub 2022 May 10. PMID: 35536007; PMCID: PMC9239204.
15. Serra, D. O., Hengge, R. (2019). A c-di-GMP-Based Switch Controls Local Heterogeneity of Extracellular Matrix Synthesis which Is Crucial for Integrity and Morphogenesis of *Escherichia coli* Macrocolony Biofilms. J Mol Biol. 2019 Nov 22;431(23):4775-4793. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.001>. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30954572.
16. Iyer, M. S, Pal, A., Venkatesh, K. V. (2023). A Systems Biology Approach To Disentangle the Direct and Indirect Effects of Global Transcription Factors on Gene Expression in *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2023 Feb 7;11(2):e0210122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02101-22>. Epub ahead of print. PMID: 36749045; PMCID: PMC10100776.