

# 代谢工程改造微生物高产氨基酸的策略\*

万方<sup>1</sup> 陈民良<sup>2</sup> 张斌<sup>1</sup> 陈进聪<sup>2</sup> 陈雪岚<sup>1\*\*</sup>

(1 江西师范大学生命科学学院 南昌 330022 2 南昌大学中德联合研究院 南昌 330047)

**摘要** 氨基酸作为一类营养物质在维持机体正常的生理生化反应方面具有重要的功能,常用作食品、药品和化妆品等的添加剂。氨基酸的生产主要依靠微生物发酵,产氨基酸菌的选育却是制约大规模工业生产氨基酸的重要因素。随着微生物分子育种技术的发展和运用,利用代谢工程改造细胞本身固有的代谢网络,指导氨基酸高产菌的选育已成为当前研究的热点。以谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)为例,就该菌株代谢网络的特征以及高产氨基酸的代谢工程策略和应用进行综述。

**关键词** 代谢工程 谷氨酸棒杆菌 分子育种 氨基酸

**中图分类号** Q812

氨基酸作为蛋白质的合成单位,对维持人类正常生理功能具有重要作用。然而,有多种代谢必需的氨基酸是人体自身不能合成的,其来源很大程度上依赖于外界食物的供给<sup>[1]</sup>。微生物发酵法是目前生产氨基酸的主流方法,因此氨基酸高产菌的选育成为当前的研究热点。

诱变育种是获得高产氨基酸菌的传统育种方法,但该方法具有很大的盲目性和随机性,往往很难获得稳定的高产菌株。氨基酸的生物合成是通过细胞内的代谢网络进行的,该代谢网络是由众多的酶催化相互关联的一系列化学反应以及特异性的膜转运系统构成<sup>[2]</sup>。因此,为了提高氨基酸的产量,科研工作者借助于基因克隆与表达技术提出了多种代谢工程改造策略,包括增加氨基酸生物合成的相关基因表达量<sup>[3]</sup>、解除终产物对关键限速酶的反馈抑制<sup>[4-5]</sup>、解除或降低阻遏蛋白对其合成途径中的各基因的阻遏作用<sup>[6]</sup>、更换表达调控元件<sup>[7]</sup>、积累 NADPH 池<sup>[8]</sup>、增加氨基酸转运蛋白转运能力<sup>[9-10]</sup>等手段理性设计细胞代谢途径对其进行遗传修饰,从而筛选高产氨基酸的菌株<sup>[11]</sup>。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)以其安全性高、遗传背景较清楚且基因组尺度代谢网络模

型<sup>[12-13]</sup>(genome-scale metabolic network, GSMN)已初步构建等优势而被广泛应用于筛选高产氨基酸菌株。本文作者结合国内外研究成果,主要就 *C. glutamicum* 应用代谢工程策略指导该菌株的分子育种,提高氨基酸产量的研究工作做一综述,并对目前存在的问题进行分析。

## 1 代谢工程

微生物代谢工程是基因工程的一个重要分支,利用 DNA 重组技术修饰或引进特定的代谢反应,达到改变生物体内的代谢流并集中流向靶产物的目的,提高产物的形成和细胞的性能<sup>[14]</sup>。代谢工程改造有赖于对分子育种技术手段的掌握,对氨基酸生物合成网络途径和相关基因表达调控机理的了解以及对产物性质的把握。

因此,对 *C. glutamicum* 的基因组特性和代谢网络特征进行分析是有必要的。据 The Model SEED 数据库统计显示,*C. glutamicum* 的全基因组长度为 3 309KB,包含了 3 138 个开放阅读框,其中 3 057 个基因功能被注释,根据 KEGG 数据库提供的 *C. glutamicum* 集成代谢网络模型可知 654 个功能被注释蛋白参与催化了 922 个代谢反应并产生 879 种代谢产物,这 654 个蛋白主要有以下几种功能:(1)参与催化 EMP 途径、PPP 途径、TCA 循环及参与催化氨基酸代谢途径的合成酶、限

收稿日期:2014-11-13 修回日期:2014-12-21

\* 国家自然科学基金资助项目(31360219,30960012)

\*\*通讯作者,电子信箱:xuelanchen162@163.com

速酶和相关调控蛋白等;(2)参与氨基酸的转运,如转运谷氨酸的 NCgl1221 蛋白<sup>[15]</sup>、转运苏氨酸的 ThrE 蛋白<sup>[16]</sup>以及转运赖氨酸和精氨酸的 LysE 蛋白等<sup>[17]</sup>;(3)参与能量因子和辅助因子的代谢,如催化  $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADPH}$  与  $\text{NADH}$ 、 $\text{NADP}^+$  相互转化的膜结合蛋白 PntAB 等<sup>[18]</sup>。因此,实现氨基酸合成网络的增流可从全局的角度系统地合理改造氨基酸合成网络相关基因靶点,在不影响微生物的生长状态下对微生物代谢通量进行定向重置,从而提高产氨基酸菌的发酵水平。

## 2 代谢工程在产氨基酸菌分子育种中的应用

*C. glutamicum* 作为一类已有 50 年研究历史的菌株,已被科研工作者经代谢工程改造以高产有机酸、乙醇、二元胺、类胡萝卜素以及氨基酸等<sup>[19]</sup>。以下就近几年应用代谢工程获得高产氨基酸的 *C. glutamicum* 策略进行介绍。

### 2.1 氨基酸合成途径的增流

增加目的氨基酸合成途径的代谢流主要通过提高相关目的基因的表达量、解除反馈抑制及反馈阻遏等手段实现。Xu 等<sup>[20]</sup>在一株精氨酸合成途径中负调控基因发生了致死突变的基础上,通过 pJCl 表达载体过表达 L-精氨酸合成相关的基因簇 *argCJBDF-argH*,发现该基因簇在细胞内所催化的酶活性较原始菌株提高了 1.5~2.7 倍,增加精氨酸合成途径的代谢通量,使精氨酸产量较原始菌株增加了 24.9%,达到了 45.3g/L,实验表明,*argCJBDF-argH* 的过表达能有效地提高了精氨酸的产量。当终产物在细胞内过量积累时,会反馈抑制氨基酸合成途径中的关键限速酶,如 *lysC* 编码的天冬氨酸激酶是赖氨酸合成途径的关键限速酶,Cremer 等发现 LysC 蛋白的 932 位半胱氨酸是终产物赖氨酸的反馈抑制结合位点<sup>[21]</sup>。因此,Becker 等<sup>[22]</sup>对 LysC 蛋白的 932 位氨基酸更换为苏氨酸,在不降低酶活的前提下解除终产物的反馈抑制,实现了赖氨酸产量零的突破,达到 13.16g/L。因此,氨基酸合成途径的限速酶是代谢工程改造中的关键靶点之一。关键酶活性不仅受到终产物的反馈抑制,其编码基因的转录水平还受到阻遏蛋白等调控蛋白的调控,如 Cg1486 转录调节因子是 IclR 蛋白家族中的一员,其 N 端的螺旋-转角-螺旋结构功能区是启动子区域的结合基序,该处可形成二聚体或四聚体<sup>[23]</sup>,结合于亮氨酸和色氨酸合成途径(分别为 *leuBCD* 和 *trpEGDCFBA*)中的操纵子,从而阻遏其下游基因的转录表达<sup>[24]</sup>。因此,Brune 等<sup>[25]</sup>通过

构建 *C. glutamicum*  $\Delta\text{cgl486}$  突变菌株,解除阻遏蛋白对相关操纵子的阻遏调控,使得 *leuB* 基因编码的 3-异丙基苹果酸脱氢酶的酶活性和 *leuA* 基因编码的  $\alpha$ -异丙基苹果酸合酶较原始菌株分别提高了 11.8 和 3.3 倍,有效地提高了亮氨酸的产量,最终获得亮氨酸高产菌。

### 2.2 旁支代谢途径的截流

氨基酸合成网络涉及到糖酵解、磷酸戊糖途径和三羧酸循环等主要代谢途径,以及相关的氨基酸代谢途径。因此,旁支代谢途径的切断,对目的氨基酸合成网络的集流是必要的。三羧酸循环是糖类、脂类、氨基酸代谢的枢纽,其中的大多数中间代谢产物都是氨基酸合成的前体物质,如  $\alpha$ -酮戊二酸是谷氨酸族氨基酸合成的前体物质,因此切断  $\alpha$ -酮戊二酸在三羧酸循环中的下游支路,如抑制  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体(ODHC 复合体)的酶活性,可实现代谢流集中涌入谷氨酸族氨基酸合成网络。ODHC 是由三种酶组成的复合体,其中 *odhA* 编码的脱氢酶的活性受到 OdhI 的调控,当 OdhI 处于磷酸化状态时会激活 OdhA 脱氢酶,而 OdhI 的磷酸化状态是由 PknG 激酶调控。基于此,Axel 等<sup>[26]</sup>通过构建 *C. glutamicum*  $\Delta\text{pknG}$  菌株,使 OdhI 处于未被磷酸化状态,则 OdhA 处于失活状态,从而抑制 ODHC 复合体的活性。因此,在添加 500mg/L 乙胺丁醇诱导培养基中,*C. glutamicum*  $\Delta\text{pknG}$  菌株的谷氨酸发酵量显著地提高,达到 14.12g/L<sup>[27]</sup>。此外,Lu 等<sup>[28]</sup>通过敲除乙酰鸟氨酸氨甲酰转移酶的编码基因 *argF*、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的编码基因 *odhA*,以及谷氨酸合成脯氨酸分支途径的关键基因 *proB*,将代谢流量集中导向鸟氨酸的合成,结果显示 *C. glutamicum* ( $\Delta\text{argF}\Delta\text{proB}\Delta\text{kgl}$ )的鸟氨酸产量达到了 4.78g/L,而原始菌株只产 0.24g/L。以上实验结果表明,旁支支路作为目的氨基酸代谢途径的竞争支路,其截流有利于代谢流集中涌入目的氨基酸合成途径。

然而,旁支代谢途径的截流可能会抑制某些营养物质的合成,影响菌株的生长,进而影响菌株产目的氨基酸的能力。为维持菌株的正常生长,需要给缺陷型菌株补充相应的营养物质,这可能更有利于终产物的积累。Yao 等<sup>[29]</sup>通过敲除 *C. glutamicum* 的 *disR* 基因(编码乙酰-CoA 羧化酶,参与脂肪酸的合成),阻断了脂肪酸合成途径,积累了大量的乙酰-CoA,为谷氨酸合成提供大量的前体物质,使其谷氨酸产量达 11.49g/L,比亲本提高了 18.5%;但重组菌株的生长较亲本有所降低。作者发现  $\Delta\text{disR}$  菌株为脂肪酸营养缺陷型菌株,

在培养基中添加 5mg/mL 吐温-80 后,结果显示不仅菌株生长恢复且产谷氨酸能力得到进一步提高,达到了 14.67g/L。因此,实施旁支支路截流的代谢改造策略会使细胞成为营养缺陷型菌株,影响菌株生长;而通过外添加合适浓度的缺陷营养不仅能使细胞的生长恢复,而且可能激发菌株产目的氨基酸的最大潜能。

### 2.3 氨基酸转运的加强

菌株经过一系列代谢工程改造后,氨基酸在胞内过量积累会抑制细胞的生长。为解除胞内过量氨基酸对细胞的毒性,细胞本身会通过改变细胞膜的通透性或者凭借相应的氨基酸转运蛋白,把胞内的氨基酸转运至胞外。因此,Petra 等<sup>[30]</sup>通过 pECT18mob2thrE 表达载体上调 *C. glutamicum* 的 thrE 基因表达量,增加 ThrE 转运蛋白的转运能力,促进细胞分泌苏氨酸,使苏氨酸产量达到了 14.69g/L,较原始菌株提高了 49%。同样,Xu 等<sup>[31]</sup>通过 pJctac 穿梭质粒同时在菌株内表达了大肠杆菌的 ArgO 和本体的 LysE 两个精氨酸转运蛋白,发现该菌株的产精氨酸量较原始菌株提高了 13.6%。因此,在 *C. glutamicum* 发酵生产氨基酸的过程中,如何将胞内氨基酸快捷地转运到胞外是提高目的氨基酸产率的关键之一。

### 2.4 能量因子和辅助因子的供给

细胞在氨基酸的转运及合成中,均涉及到能量因子的需求和辅助因子的利用,包括 ATP、NADPH 和 NADH 等。这些辅助因子在提高目的氨基酸产量上扮演着重要的角色,如在赖氨酸合成途径中,asd、dapB 和 ddh 等基因编码的酶的催化反应都涉及到 NADPH 的利用。因此,增加能量因子和辅助因子的补给是有必要的。NADPH 的补给主要来源于代谢途径中的脱氢酶催化产生,主要包括磷酸戊糖途径中相关的脱氢酶,如 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶等。Shi 等<sup>[32]</sup>对 *C. glutamicum* ssp. *Lactofermentum* JHI3-156 菌株 zwf(编码 6-磷酸葡萄糖脱氢酶)和 ppnk(编码 ATP-NAD<sup>+</sup>激酶,转换 NAD<sup>+</sup>为 NADP<sup>+</sup>)基因过量表达,结果显示 zwf 和 ppnk 同时过表达的菌株合成 NADPH 的能力及 L-异亮氨酸产量较对照菌株都获得了提高,其中 L-异亮氨酸较原始菌株提升了 85.9%。因此通过对这类酶的编码基因的高表达,增加细胞内 NADPH 的供给,以满足代谢途径中相关催化酶对辅助因子需求,最终能达到提高氨基酸的产率的目的。

## 3 展 望

近几年的研究表明,代谢工程在产氨基酸菌

分子选育中应用越来越广泛。同时,产氨基酸菌的全基因组测序的完成以及基因组尺度代谢网络模型的构建能有效地了解基因与表型的相关性,从而为代谢工程改造提供修饰靶点,以最大限度地选育氨基酸高产菌提供了可能。可以相信,随着系统生物学分析手段的进一步发展及大量试验数据的积累,多尺度多层次的系统生物学方法应用于代谢工程,将为微生物高产氨基酸菌种的选育及明确阐明表型或代谢途径得到优化的分子机制提供极佳的工具,从而进一步促进氨基酸生物生产的发展。

## 参考文献

- [1] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K, et al. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(1): 1-8.
- [2] 陈琦, 王卓, 魏冬青. 代谢网络流分析进展及应用. *科学通报*, 2010, 55(14): 1302-1309.  
Chen Q, Wang Z, Wei D Q. Progress in the applications of flux analysis of metabolic networks. *Chinese Sci Bull*, 2010, 14(55): 1302-1309.
- [3] Xu J, Han M, Zhang J, et al. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for the L-lysine production by increasing the flux into L-lysine biosynthetic pathway. *Amino Acids*, 2014, 46: 2165-2175.
- [4] Schneider J, Karin N, Volker F W. Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2011, 154: 191-198.
- [5] Xu M, Rao Z, Dou W. Site-directed mutagenesis studies on the L-Arginine-binding sites of feedback inhibition in N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) from *Corynebacterium glutamicum*. *Curr Microbiol*, 2012, 64: 164-172.
- [6] Seo Y K, Lee J, Lee S Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 416-421.
- [7] Bommarreddy A R, Chen Z, Rappert S, et al. 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. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 30-37.
- [8] Jiang L Y, Zhang Y Y, Li Z, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for increasing the production of L-ornithine by increasing NADPH availability. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2013, 10(40): 1143-1151.

- [ 9 ] Park S H, Kim H U, Kim T Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. Nature Communications, 2014, doi:10.1038/ncomms5618.
- [ 10 ] Yin L, Shi F, Hu X, et al. Increasing L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* by overexpressing global regulator Lrp and two-component export system BrnFE. Journal of Applied Microbiology, 2012, 5(114): 1369-1377.
- [ 11 ] 刘立明, 陈坚. 基因组规模代谢网络模型构建及其应用. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1176-1186.
- Liu L M, Chen J. Reconstruction and application of genome-scale metabolic network model. Chin J Biotech, 2010, 26(9): 1176-1186.
- [ 12 ] Kjeldsen K R, Nielsen J. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(2): 583-697.
- [ 13 ] Shinfuku Y, Sorpitiporn N, Sono M, et al. Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. Microbial Cell Factories, 2009, 43(8): 1-15.
- [ 14 ] 焦炳华. 现代生命科学概论. 2009, 北京: 科学出版社.
- Jiao B H. Introduction to Modern Life Science. Beijing: Science Press, 2009.
- [ 15 ] Hashimoto K, Nakamura K, Kuroda T, et al. The protein encoded by NCgl1221 in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(12): 2546-2549.
- [ 16 ] Yen M R, Tseng Y H, Simic P, et al. The ubiquitous ThrE family of putative transmembrane amino acid efflux transporters. Research in Microbiology, 2002, 153(1): 19-25.
- [ 17 ] Seryoung K, Yoneyama H. Amino acid exporter: a tool for the next-generation microbial fermentation. J Biotechnol Biomater, 2013, 3: 118-122.
- [ 18 ] Zhou Z H, Wang C, Chen G J, et al. Increasing available NADH supply during succinic acid production by *Corynebacterium glutamicum*. Applied Cellular Physiology and Metabolic Engineering, 2015, 31(1): 12-19.
- [ 19 ] Zahoor A, Ottenb A, Wendisch V F, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for glycolate production. J. Biotechnol, 2014, doi:10.1016/j.jbiotec.
- [ 20 ] Xu M J, Rao Z M, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC ~ H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(3): 495-502.
- [ 21 ] Cremer J, Eggeling L, Sahm H. Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(6): 1746-1752.
- [ 22 ] Becker J, Zelder, Häfner, et al. From zero to hero-Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. Metabolic Engineering, 2011, 13(2): 159-168.
- [ 23 ] Huang H, Zhou P, Xie J. Molecular mechanisms underlying the function diversity of transcriptional factor IclR family. Cellular Signalling, 2012, 24(6): 1270-1275.
- [ 24 ] Michael Bott. Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. Trends in Microbiology, 2007, 15(9): 417-422.
- [ 25 ] Brune I, Jochmann N, Brinkrolf K, et al. The IclR-type transcriptional repressor LtbR regulates the expression of leucine and tryptophan biosynthesis genes in the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bacteriology, 2007, 189(7): 2720 - 2733.
- [ 26 ] Axel N, Armin K, Christian S, et al. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(18): 12300-12307.
- [ 27 ] Christian S, Axel N, Lena G, et al. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(3): 691-700.
- [ 28 ] Lu D M, Liu J Z, Mao Z W, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* to enhance L-ornithine production by gene knockout and comparative proteomic analysis. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 20(4): 731-739.
- [ 29 ] Yao W, Deng X, Zhong H, et al. Double deletion of *dsrI* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36(7): 911-921.
- [ 30 ] Simic P, Willuhn J, Sahm H, et al. Identification of *glyA* (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-Threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(7): 3321-3327.
- [ 31 ] Xu M J, Rao Z M, Yang J, et al. The effect of a LYSE exporter overexpression on L-Arginine production in *Corynebacterium crenatum*. Curr Microbiol, 2013, 67(3): 271-278.
- [ 32 ] Shi F, Li K, Huan X, et al. Expression of NAD(H) kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase improve NADPH supply and L-isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*ssp. *lactofermentum*. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 171(2): 504-521.
- [ 33 ] 李桂莹, 张新波, 王智文, 等. 逆向代谢工程的最新研究进

展. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1151-1163.

metabolic engineering. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1151-

Li G Y, Zhang X B, Wang Z W, et al. Progress in inverse

1163.

## Strategy of Metabolic Engineering Microorganism for High Yield Amino Acids

WAN Fang<sup>1</sup> CHEN Min-liang<sup>2</sup> ZHANG Bin<sup>1</sup> CHEN Jin-cong<sup>2</sup> CHEN Xue-lan<sup>1</sup>

(1 College of Life Science, JiangXi Normal University, Nanchang 330022, China)

(2 Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract** Amino acids, which play the irreplaceable role in maintaining the body's normal physiology as a kind of nutrient substances, are usually used as additives in food, pharmaceuticals, and cosmetics. Production of amino acids mainly relies on microbial fermentation. However, high yield amino acid strain by selection hinders the large-scale industrial production. Application of metabolic engineering has become a hot spot of research in microbial metabolism network and genetically modification for screening high yield amino acid strain with the development of metabolic engineering strategy and technology in molecular breeding. The characteristic of *C. glutamicum* metabolism network and metabolic engineering strategy in molecular breeding of *C. glutamicum*-producing amino acids are introduced.

**Key words** Metabolic engineering *C. glutamicum* Molecular breeding Amino acid

---

## 广 告 索 引

北京中原领先科技有限公司(封面),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(封面拉页),默克化工技术(上海)有限公司(封二),仕必纯贸易(上海)有限公司(彩1),赛多利斯科学仪器(北京)有限公司(彩2),上海森松制药设备工程有限公司(彩3),镇江东方生物工程设备技术有限责任公司(彩4-5),通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司(目次对页),2015 生物制药与技术中国展(封三),沃特世科技(上海)有限公司(封底)