合成生物学与代谢工程在谷氨酸棒杆菌产氨基酸中的应用

龙梦飞, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 邵明龙, 许正宏, 饶志明*

江南大学生物工程学院, 工业微生物教育部重点实验室, 无锡 214000

* 联系人, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-11-04; 接受日期: 2019-01-29; 网络版发表日期: 2019-03-21

国家自然科学基金(批准号: 31770058, 31870066)、江苏省自然科学基金(批准号: BK20181205)、国家轻工技术与工程一流学科自主课题(批准号: LITE2018-06)和江苏高校优势学科建设工程项目资助

摘要 氨基酸是重要的化合物, 在食品、医药、化工等领域具有广泛用途. 多种氨基酸可以通过蛋白质水解提取法、化学合成法以及微生物法生产, 现如今大部分的氨基酸都开始尝试微生物发酵法实现工业生产. 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)作为发酵生产氨基酸的先驱者, 其生产的氨基酸产量已达年产数百万吨. 随着合成生物学技术以及新一代基因编辑技术的兴起, 谷氨酸棒杆菌能生产的氨基酸种类从传统的几种氨基酸扩大到了几乎所有氨基酸及其衍生物. 本文综述了近年来利用代谢工程及合成生物学工具对谷氨酸棒杆菌的改造技术, 并介绍了一些利用谷氨酸棒杆菌生产传统氨基酸以及非天然氨基酸的典型实例, 为谷氨酸棒杆菌突破所有氨基酸生产瓶颈提供参考.

关键词 谷氨酸棒杆菌, 代谢工程, 合成生物学, 氨基酸

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种重要的工业微生物, 其优势在于能发酵生产工业化规模的氨基酸. 20世纪90年代至今, 氨基酸市场一直呈上升趋势. 据美国GIA市场调查公司报告, 2017年各类氨基酸产品销售总量已超过800万吨, 氨基酸市场复合增长率接近6%. 而其持续增长动力之一便是氨基酸在食品保健中的重要作用, 近年来世界各国对肉类和禽肉类产品需求量的不断增加也进一步促进了氨基酸在饲料中的用量. 在饲料中添加氨基酸能有效缩短牲畜的存栏时间, 更有部分氨基酸能有效增强牲畜的体质, 这也相应地弥补了联合国关于禁止在动物饲料中

添加抗生素条令所带来的经济损失. 目前, 氨基酸的生产方式已由传统水解法转变为微生物发酵法, 谷氨酸棒杆菌无疑是发酵生产氨基酸的“弄潮儿”. 相比于其他微生物, 谷氨酸棒杆菌在工业发酵领域具有得天独厚的优点: 不产生内毒素, 为食品安全级菌株; 具有灵活易改造的代谢网络; 对碳源及目标产物的高浓度耐受性; 缺乏修复和限制修饰系统, 具有较强的遗传稳定性. 传统的诱变选育和静态、单一的基因克隆表达与调控方法已无法满足氨基酸生产需求, 代谢工程策略及多种合成生物学工具(基因编辑、合成生物学开关等)的出现可以更加方便快捷地重构代谢途径、

引用格式: 龙梦飞, 徐美娟, 张显, 等. 合成生物学与代谢工程在谷氨酸棒杆菌产氨基酸中的应用. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 541–552
Long M F, Xu M J, Zhang X, et al. Synthetic biology and metabolic engineering for amino acid production in *Corynebacterium glutamicum* (in Chinese).
Sci Sin Vitae, 2019, 49: 541–552, doi: 10.1360/N052018-00248

动态多层次地调控细胞网络、实现氨基酸的增产。图1总结了利用代谢工程和合成生物学技术改造谷氨酸棒杆菌生产氨基酸种类的占比以及近年来报道的氨基酸生产量。如今谷氨酸棒杆菌不仅是白色生物技术的支柱,更成为研究最透彻的模式生物之一。各种前沿技术如转录组学、代谢组学、全基因组代谢模型以及合成生物学技术交叉的应用在棒杆菌生产氨基酸方面均做出了巨大贡献。本文概述了近年来合成生物学与代谢工程在棒杆菌中的应用,并用典型案例缩影其在氨基酸生产方面的研究进展。

1 经典代谢工程

近年来,各种途径及元件工程以及自适应进化工程等有效地改善了基因表达水平,增加了目的产物的量。

1.1 途径及元件工程

DNA重组技术的引入使人们能更理性地改善菌

株生产性能,代谢改造微生物的第一个目标就是氨基酸合成途径(图2)。主要策略有:过表达途径中限速步骤的基因;过表达中心代谢途径到目标氨基酸途径的第一个基因,增加氨基酸合成途径的碳流量;生产L-赖氨酸和L-色氨酸等具有分支途径的氨基酸,可过表达分支节点的基因或敲除分支基因,从而将代谢流量引向目标物质;改造途径中的关键基因,消除产物反馈抑制。氨基酸合成途径的“瓶颈”被消除之后,下一步就是实现更多的氨基酸前体流向目标途径,改变起始密码子的强度是调节途径流量的有效方式。如在L-赖氨酸的生产中,直接将异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, ICD)的起始密码子ATG替换成GTG, ICD的酶活下降70%,导致代谢流从TCA循环流向回补途径, L-赖氨酸产量提升40%,而将丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)和葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphoisomerase, G6PI)的起始密码子ATG替换成GTG,酶活分别下降60%和40%, L-赖氨酸的产量分别提高17%和10%^[1]。除GTG外,还有表达水平更低的起始密码子TTG(图2),将*odhA*基因的起始密码子替

图1 棒杆菌生产氨基酸的比例及产量

Figure 1 The proportion and yield of amino acids produced by *Corynebacterium glutamicum*

图2 谷氨酸棒杆菌生产氨基酸的途径

Figure 2 Biosynthetic pathways of amino acids in *Corynebacterium glutamicum*

换成TTG后有助于腐胺的生物合成^[2]。除了天然密码子的替换策略, 将非天然密码子系统引入到微生物中也是一种非常有效的策略, 在酶的催化中心换成其他非天然氨基酸残基, 从而突破酶的进化^[3]。

其他多种基于质粒系统的表达元件(图3)也用于基因的表达和调控^[4], 包括启动子、5'非编码区(5' untranslated region, 5'UTR)、复制子等。Albersmeier等人^[5]利用RNA-seq鉴定和分析了谷氨酸棒杆菌的2454个转录起始位点(transcriptional start site, TSS), 发现无引导序列的启动子在-10区(TAAnnT)具有高度保守性(图2), 而-35区没有明显的保守, 只有距离-10区附近20左右有3个稍微保守的TTG, 这进一步推进了谷氨酸棒杆菌基因组信息的挖掘, 有助于发现重要的启动子元件。Yim等人^[6]则在谷氨酸棒杆菌中构建了含核心序列AGGA的70 bp随机序列的合成启动子文库, 并利用绿色荧光蛋白作为报告基因结合高通量流式细胞仪筛选得到相对荧光强度200~1200的不同强度的启动子序列, 为需要不同表达水平的基因拓宽了思路。和启动子文库类似, 核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)文库也具有富含嘌呤的核心序列, 它的序列则是

根据计算机随机生成或其他原则设计的, 利用合成的RBS位点及不同间隔序列可平衡基因之间的表达水平。更有研究者开发了RBS强度计算器, 其也是一个调控基因表达的有力工具(<https://www.denovodna.com/software/>)。然而, 无规律的5'UTR序列与目的基因连接的附加作用是造成某些基因表达不符常规的重要原因, 即对某个特定基因有效的RBS序列可能不会对所有的基因奏效。Guimaraes研究组^[7]在*E. coli*中构建了双顺反子表达系统(图3), 与单顺反子不同的是其结构在5'UTR后添加了短肽编码序列以及含TAA结构的SD序列(shine-dalgarno sequence), 且TAA与目的基因起始密码子ATG重叠了“A”, 该顺反子将5'UTR: 目的基因接头副作用导致的基因表达波动率降至1.5%, 为生物元件系统的标准化奠定了基础。该研究表明, 如果前导肽在双顺反子mRNA中良好翻译, 则下游靶基因的翻译也可以得到促进, 即后顺反子的有效翻译取决于相邻前顺反子的先前翻译。Liu等人^[8]从谷氨酸棒杆菌的蛋白质组数据中鉴定出12个高度表达的基因并将其用于构建双顺反子遗传表达部分, 将含有启动子、5'UTR、N-末端序列和与靶基因相关的保守SD序列构

图3 谷氨酸棒杆菌表达质粒相关元件

Figure 3 Elements of plasmid for clone and expression in *Corynebacterium glutamicum*

成双顺反子后,与相应的启动子-5'UTR部分相比,双顺反子使谷氨酸棒杆菌中绿色荧光蛋白表达水平增加1.4~790倍。

1.2 自适应进化工程

自适应进化又称定向进化,是目前备受关注的菌种改良技术。在微生物进化过程中,选择压力的存在使菌种发生随机突变,适应环境的基因型得以保存。基于此,人工施加的选择压力能使菌株沿着特定方向进化,从而获得较优的表型或生理特性,如对高温、酸碱的耐受性等优良的工业属性。

实验室最常用的适应进化方法就是在特定条件下对菌种进行不断的传代培养,通过突变的不断富集,最终获得理想的表型。将谷氨酸棒杆菌培养在一定选择压力的恒化器中,自适应性进化后,其耐受能力得到显著增强。Oide等人^[9]对基因工程棒杆菌GLY3进行了长达两个月的连续传代培养,得到了三株优良的菌株,它们不仅有良好的耐热性,还对有机溶剂异丁醇具有交叉耐受性。全基因组测序结果表明,过表达的糖酵解相关基因缺失突变和编码海藻糖-6-磷酸合酶的基因*otsA*的错义突变可能是菌株获得交叉耐受性的原因,这表明细菌的耐受机制与能量代谢有关。Pfeifer等人^[10]将谷氨酸棒杆菌ATCC13032及其变体MB001进

行自适应进化后,筛选到生长速率和葡萄糖消耗速率明显提高的突变株,全基因组测序发现三个关键基因(丙酮酸激酶、1-磷酸果糖激酶、MIT家族 Mg^{2+}/Co^{2+} 转运蛋白)的突变有助于提高细胞的生长速率,从而有助于工业微生物突破现有的生产效率。自适应进化还能应用于质粒的高拷贝和不同碳源的利用,近年开发的超级诱变质粒将有望与自适应进化相结合,筛选出更优工业属性的菌株^[11]。

1.3 “底盘”改造

虽然代谢工程方法蓬勃发展,但是微生物大量的物质及能量代谢组成了复杂的代谢调控系统,尤其是一些重组基因和跳跃遗传元件,为代谢改造带来了不可预知的影响^[12],而一些非必需的基因对于工业微生物的生产是不相关甚至是不利的。“底盘”细胞,即基因组减少过的宿主,其只提供必要的功能基因,因此降低了代谢网络的复杂性,理论上能进行更有效的生物合成。目前谷氨酸棒杆菌“底盘”细胞构建主要为自上而下(基因组减少)的方式。Choi等人^[13]在谷氨酸棒杆菌中鉴定了两个插入序列(insertion sequence, IS)元件,对其敲除后能提高聚羟基丁酸和 γ -氨基丁酸的生产性能。除了IS元件,删除前噬菌体序列及其他不必要的基因,既简化了基因组,也能继续维持细胞的生

产特性.

除了对基因组改造外, 还可以对谷氨酸棒杆菌胞内“空间”进行改造. 真核生物进化出了多种功能性封装代谢途径的细胞器, 如叶绿体、线粒体等, 实现了代谢上的空间分离. 值得一提的是, 在原核微生物中, 很多代谢中间体都是有毒性的, 而类似真核生物“区室”的存在有利于减弱代谢中间物对细胞的影响. 根据基因组数据库(<http://img.jgi.doe.gov>)公开的基因组数据, 约20%的微生物具有细菌微室结构(bacterial micro-compartments, BMCs)基因. 已知的BMCs结构有三种, 用于CO₂固定的羧基体、1,2-丙二醇代谢体(propanediol utilization, PDU)和乙醇胺分解体(ethanolamine utilization, EUT). BMCs在工业微生物中的利用有利于生产一些有毒或挥发性的物质, Huber等人^[14]将*Citrobacter freundii*来源的PDU代谢体基因簇构建在谷氨酸棒杆菌中, 通过透射电子显微镜看到了明显的BMCs微室结构, 并通过C端融合成功将增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)靶向到微室中. 往往代谢改造的基因工程菌生产的产物还能作为后续代谢产物的底物, 即可对生产某种物质的底盘细胞继续改造来生产途径之后或之前的物质. 如使2-酮异戊酸生产棒杆菌中乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶的基因失活后引入乳酸菌来源的酮酸脱羧酶、酿酒酵母的醇脱氢酶和大肠杆菌来源的转氢酶, 在缺氧条件下能成功生产异丁醇. 这种生产具有挥发性的物质的菌株若再结合BMCs, 可能会进一步提升生产性能. 谷氨酸高产菌或者精氨酸高产菌也能用于鸟氨酸和瓜氨酸等精氨酸衍生生物的生产.

2 合成生物学技术

随着代谢工程的不断发展, 多种合成生物学技术的引入也为谷氨酸棒杆菌的改造迎来新的发展.

2.1 基因编辑工具

细胞的代谢改造与基因编辑工具密不可分, 传统的基因编辑技术基于同源重组打靶, 实现目的基因的敲除、敲入以及突变. 锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALENs)以及CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced short

palindromic repeats)等核酸内切酶的发现为基因编辑技术带来了重大改革.

传统的谷氨酸棒杆菌基因编辑依赖于低效率的重组手段, 如将含依赖于条件致死果聚糖蔗糖酶*sacB*基因的自杀载体整合到基因组中, 再通过第二轮筛选即可得到阳性菌落, 但假阳性结果和低频率双交换大大限制了谷氨酸棒杆菌改造的效率和通量. CRISPR自1987年发现以来, 到发现细菌的CRISPR/Cas系统能直接作用于靶DNA, 再到对II型CRISPR/Cas9系统改造成操作简易的基因编辑工具, 最后到CRISPR/Cas9系统应用于哺乳细胞中. 经过30年的发展, CRISPR/Cas9已成功在多种生物中得到应用. 随着其广泛运用, 研究者也尝试将其运用于谷氨酸棒杆菌中. CRISPR/Cas9系统包括Cas9蛋白和sgRNA(single guide RNA)两部分, 目前最常用的Cas9蛋白来源于*Streptococcus pneumoniae*, 且除了spCas9, cpf1也可用于谷氨酸棒杆菌的基因编辑. sgRNA由tracrRNA(trans-activating RNA)和crRNA(CRISPR-derived RNA)整合而来, 由于tracrRNA和Cas9蛋白的序列相对固定, 因此只需要改变crRNA序列就可以改变靶基因, 再添加一个修复模板就可用于基因组编辑. 值得一提的是, 谷氨酸棒杆菌缺乏非同源末端连接修复方式, 因此DNA双链断裂必需依靠供体DNA或者内源DNA才能完成修复, 修复切断的模板可以是环状dsDNA(double-stranded DNA)、线性dsDNA或者线性ssDNA(single-stranded DNA). 根据所用的核酸酶以及修复模板的不同, 以及Cas9和sgRNA是否构建在同一个质粒上, 研究者用不同策略成功地在谷氨酸棒杆菌中实现了基因编辑(表1)^[15-18]. 但该系统也有一定的局限性, Cas9的表达水平、Cas9复制过程中的较高突变率、同源臂的长度以及sgRNA的设计均会影响敲除效率.

人们还开发了CRISPR/dCas9系统, dCas9(dead Cas9)是Cas9的突变体, 虽无核酸酶活性, 但是在sgRNA的引导下可与特定的DNA序列结合, 从而对特定基因表达进行调控. dCas9在sgRNA引导下可被用来抑制基因表达, 这一方法称为CRISPR干扰技术(CRISPR interference, CRISPRi). Cleto等人^[19]成功将CRISPRi系统应用于谷氨酸棒杆菌中, 实现了对基因的选择性调控.

CRISPR/Cas9也可以与其他系统如群体感应系统和胞嘧啶脱氨酶筛选系统结合起来, Zeng等人^[20]应用

表 1 CRISPR在谷氨酸棒杆菌中的应用

Table 1 Application of CRISPR in *Corynebacterium glutamicum*

	核酸内切酶	识别sgRNA	修复模板	质粒数	参考文献
Knock-off	Cas9	NTT	HRarms	2	[15]
	Cas9	NTT	RecT/ssDNA	2	[16]
	CpfI	TTTN	RecT/ssDNA	2	[17]
		TTTN	HRarms	1	
	Cas9	NTT	HRarms	2	[18]
		NTT	RecT/ssDNA	1	
Knock-down	Cas9	NTT	—	2	[19]

CRISPR/Cas9-CodA (sm)反向筛选系统在链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中建立了一种无标记的基因组编辑和筛选技术. Lian等人^[21]报告了一种在酿酒酵母中基于正交三功能CRISPR系统的组合代谢工程的策略, 该策略结合转录激活、转录干扰和基因缺失(CRISPR-transcriptional activation & interference & gene deletion, CRISPR-AID)、模块化、并行和高通量的方式扰乱代谢和调节网络.

2.2 合成生物学开关

在代谢网络中, 敲除某一基因能提高底物向目标产物转化, 但这一结果往往是静态的、不可调节的, 可能会导致细胞生长率下降, 从而致使产量降低. 基于这一影响, 研究者开发了一系列合成生物学开关, 实现了基因表达时空上的“开”与“关”, 从而提高产物浓度.

NP-photocaged IPTG是异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -d-thiogalactoside, IPTG)的衍生物, 其能被光解进而酶解成IPTG, 诱导 P_{lac} 启动子驱动的朱乐倍半萜合酶的表达(图4). 由于目标产物对菌体生长有严重影响, 所以需要在细胞生长前期抑制该酶表达. Binder等人^[22]开发了一种光控开关, 即当菌体达到一定浓度后, 光诱导朱乐倍半萜合酶基因的表达, 从而降低了目标产物对菌体生长的影响, 由此提高了目标产物的产量.

除了光感应外, 人们将群体感应系统也运用到了开关设计中(图4), *esal*能产生自诱导物高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactone, AHL), AHL能抑制 P_{cas} 启动子, 且随着AHL在胞内的积累, 抑制效果越来越明显(图4), 反之*easR*能激活 P_{cas} . Gupta等人^[23]利用这一原

理在 P_{cas} 启动子后连上目的基因, 利用诱导物动态的调控, 构建了感应群体密度的“拨动”开关.

还有一种核糖开关, 它能实时感应配体的浓度, 配体浓度低时基因可以正常表达; 配体浓度高时配体与核糖开关结合从而发生构象改变, 基因表达被抑制, 这样“开”、“关”就能动态地调节基因表达. 常见的以氨基酸作为配体的核糖开关有L-赖氨酸、L-谷氨酸、S-腺苷甲硫氨酸以及L-甘氨酸核糖开关(表2)^[24-27], 其中L-赖氨酸核糖开关已成功在谷氨酸棒杆菌中得到应用. Zhou等人^[28]利用来自大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的赖氨酸核糖开关分别调控谷氨酸棒杆菌中TCA循环途径的关键酶柠檬酸合酶的表达, L-赖氨酸产量分别提高63%和38%.

2.3 生物感应器

与上述的合成生物学开关类似, 生物感应器也能动态地调控基因表达, 且它们可与自适应进化结合, 通过高通量筛选方法帮助工业微生物快速、高效、“可视”地进化. 从原理上分类, 生物传感器可以分为三种: (i) 组成型的报告蛋白复合物, 感应于待分析物而产生的基于荧光共振能量转移信号(fluorescence resonance energy transfer, FRET)开关, 可以实时检测胞内代谢物, 但由于其产生的绝对信号较弱而难以用于高通量筛选; (ii) RNA开关, RNA适配体通过调控报告基因的表达来响应与待分析物的结合, 但是RNA开关改造的复杂性限制了其应用; (iii) 基于转录调控因子(transcription factor, TR)的生物传感器系统, 也是近年应用最多的一种生物传感器. 目前, 已有多种TR生物感应器成功地应用于谷氨酸棒杆菌的氨基酸生产. 已知谷氨酸棒杆菌内源的转录调控因子LysG,

图 4 典型的合成生物学开关

Figure 4 Typical synthetic biology switches

表 2 谷氨酸棒杆菌中氨基酸biosensor及核糖开关

Table 2 Amino acid biosensor and riboswitches in *Corynebacterium glutamicum*

Riboswitch/Sensor	Ligand/Analyte	参考文献
Glutamine riboswitch	L-谷氨酰胺	[24]
SAM riboswitch	S-腺苷甲硫氨酸	[25]
Glycine riboswitch	L-甘氨酸	[26]
Lysine riboswitch	L-赖氨酸	[27]
LAO-BP biosensor	L-赖氨酸	[29]
LysG biosensor	L-赖氨酸	[30]
	L-精氨酸	[31]
O17-EC biosensor	L-天冬氨酸	[32]
	L-缬氨酸	[33]
Lrp biosensor	L-缬氨酸	[34]
	L-缬氨酸	[35]

NCgl0581, CysR以及Lrp能分别识别 $lysE$, NCgl0580, $cysI$ 以及 $brnF$ 的启动子并影响四者的表达, 结合荧光蛋白等报告基因后, 利用流式细胞仪即可快速筛选高产突变株. 如LysG可以感知胞内碱性氨基酸如L-赖氨酸的浓度升高并驱动 $lysE$ 的转录, 若在 $lysE$ 的后面融合

gfp 基因, 则可利用通过报告基因荧光强度强弱评估单细胞胞内L-赖氨酸浓度的高低, 从而筛选高产菌株. LysG还能识别L-精氨酸及L-组氨酸等碱性氨基酸, L-精氨酸对限速基因 $argB$ 具有反馈抑制作用, 将 $argB$ 的突变文库导入含LysG传感器系统的谷氨酸棒杆菌中, 通过流式细胞仪筛选则可以筛选出解除反馈抑制的ArgB突变体. 其他氨基酸生物感应器(表2)^[29-35]如O17-EC biosensor也可以用于精氨酸的检测.

2.4 基因组代谢网络模型

细胞生理的核心就是代谢. 代谢是一系列酶在一定条件下催化的有序生化反应, 包括全部物质和能量交换的总和. 酶与特定的基因信息是一一对应的, 通过“基因-酶-反应”的相互关系网络, 即组成了基因组代谢网络模型(genome-scale metabolic model, GEM), 其是人们了解细胞代谢、表征细胞表型、设计具有特殊性状的突变菌株以及评估遗传干预和环境扰动对细胞代谢的影响的重要工具. 最早的谷氨酸棒杆菌ATCC13032基因组代谢模型, 包含247个基因、446个反应以及411个代谢物^[36], 而后被Shinfuku等人^[37]更

新. Mei等人^[38]根据谷氨酸棒杆菌S9114基因组信息构建了iJM658模型, 其能够很好地指导L-谷氨酸的生产. Zhang等人^[39]后来又在前人的基础上构建了iCW773模型, 根据模型指导的实验代谢改造的谷氨酸棒杆菌, 其生产L-脯氨酸的产量为66 g/L, 是目前所报道的L-脯氨酸生产的最高产量.

3 谷氨酸棒杆菌系统代谢工程生产氨基酸

虽然谷氨酸棒杆菌能生产的氨基酸种类已超过50种, 但是暂无法全部实现工业化生产, 以下介绍几种用于谷氨酸棒杆菌工业化生产的典型氨基酸, 包括谷氨酸和天冬氨酸家族氨基酸等蛋白质组成氨基酸以及由其衍生的非天然氨基酸, 为其他种类的化合物的工业生产提供借鉴.

3.1 蛋白质组成氨基酸

谷氨酸棒杆菌具有较强的L-谷氨酸生产能力, 而L-精氨酸、L-脯氨酸的合成都是以L-谷氨酸作为前体. 以碱性氨基酸L-精氨酸和L-赖氨酸为例, 其发展历程见图5.

早期L-精氨酸生产菌均是通过L-精氨酸结构类似物诱变育种获得, 常见的类似物有精氨酸异羟肟酸和2-噻唑丙氨酸等. 20世纪80年代, 通过诱变育种获得谷氨酸棒杆菌突变株的L-精氨酸产量为20~30 g/L. 随着L-精氨酸生物合成基因簇*argCJBDFRGH*的解析, Ikeda等人^[40]发现*argB*和*argR*的突变可以提高L-精氨酸产量. 此外, 过表达*arg*基因簇、单过表达鸟氨酸乙酰转移酶(ornithine acetyltransferase, OAT)或*argB_{mut}*也都能有效提高精氨酸合成^[41~43]. Man等人^[44]根据谷氨酸棒杆菌ATCC13032中*cg1150*和*cg3223*的基因序列在谷氨酸棒杆菌中定位到两个H₂O₂依赖型黄素还原酶Frd181和Frd182, 敲除二者后改善了胞内微环境, 降低了NAD(P)H的无效氧化, 有效提高了L-精氨酸的产量. Park等人^[45]通过敲除*argR*与*farR*解除精氨酸代谢调控, 将*pgi*基因起始密码子ATG改成GTG降低EMP途径流量, 进而增加磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)流量促进NADPH再生, 增加谷氨酸前体和辅前体鸟氨酸的供应, 提高精氨酸合成限速步骤反应速率等一系列系统代谢工程手段得到L-精氨酸产量为92.5 g/L的高产菌株.

图5 微生物发酵法生产L-精氨酸和L-赖氨酸的发展历程
Figure 5 Development of microbial fermentation for production of L-arginine and L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*

另一重要氨基酸L-赖氨酸随着其生产规模的不断扩大, 现已成为谷氨酸棒杆菌生产的第二大氨基酸. Ohnishi等人^[46]的研究发现, 将*lysC*基因进行定点突变能解除L-赖氨酸和苏氨酸的反馈抑制作用; 过表达*lysC*, *dapA*, *dapF*, *dapC*以及*lysE*能够增加代谢通量, 提高L-赖氨酸的产量; 增加前体草酰乙酸的补给和胞内NADPH水平也有利于L-天冬氨酸族氨基酸的生物合成. Becker等人^[47]通过过表达*dapB*, *lysC*, *pyc*等基因, 调整*icd*, *fbp*, *tkl*基因的表达水平, 敲除*pck*等12步改造获得的谷氨酸棒杆菌LYS-12生产赖氨酸产量最高为120 g/L.

3.2 非蛋白质组成氨基酸

L-谷氨酸合成L-精氨酸途径中存在一种重要的非蛋白质氨基酸L-鸟氨酸, 在食品和医药等领域有重要作用. 基于谷氨酸棒杆菌生产谷氨酸链氨基酸得天独厚的优势, 谷氨酸棒杆菌生产L-鸟氨酸也成为研究热点. 谷氨酸棒杆菌在敲除鸟氨酸氨甲酰基转移酶基因*argF*后变成精氨酸营养缺陷型, 菌体生长受到一定影响. Jiang等人^[48]将谷氨酸棒杆菌中*argF*与*proB*敲除后, 利用自适应进化筛选生长良好的菌株, 继续敲除*argR*后L-鸟氨酸产量最高为24.1 g/L. Kim等人^[49]在敲除*argF*与*proB*的基础上结合改造谷氨酸棒杆菌生产L-精氨酸的成功经验, 通过系统代谢工程改造谷氨酸棒杆菌后L-鸟氨酸产量最高达51.5 g/L. 最近的研究表明,

为解决敲除 *argF* 不利于菌体生长这一难题, 在 *argCJBD* 和 *argF* 中间插入一个终止子是一种有效的解决方法, 该方法既能降低 *argF* 表达又不影响菌体生长^[50].

γ -氨基丁酸也是一种广泛使用的非蛋白质组成氨基酸, 可应用于医药、食品和生物降解材料等. 其可由 *Lactobacillus brevis* 或 *E. coli* 来源的谷氨酸脱羧酶 *gabB* 一步催化得到, 且增加其前体 *L*-谷氨酸供应是提高 γ -氨基丁酸产量的有效方法. 除了谷氨酸到 γ -氨基丁酸的催化途径, Jorge 等人^[51] 在含鸟氨酸脱羧酶基因 *speC* 的产腐胺谷氨酸棒杆菌中引入了 *E. coli* 来源的腐胺氨基转移酶基因 *patA* 和 γ -氨基丁醛脱氢酶基因 *patB*, 构建了从谷氨酸-鸟氨酸-腐胺- γ -氨基丁酸催化途径. 经过进一步消除副产物及增加前体谷氨酸供应, γ -氨基丁酸产量已达 63 g/L^[52].

4 展望

经过数十年的不懈努力, 谷氨酸棒杆菌生产氨基酸的种类及产量均发生了质的飞跃, 新型的代谢及合

成生物学相关技术的大力发展将继续突破谷氨酸棒杆菌生产化合物提供强有力的保证. 未来谷氨酸棒杆菌的改造有两大主流方向: (i) 理性设计, 设计通用的方案控制生物的易变性, 如结合计算机设计大量的启动子、RBS 等部件文库, 并将这些部件进行模块化设计, 打造标准的“细胞工厂”, 使其朝着更加精细化、系统化、标准化的方向发展; (ii) 定向进化, 通过构建突变文库, 利用生物传感器、高通量筛选等方法筛选具有特定生理特性的菌株, 借助进化的力量, 使其朝着规模化、多元化的方向发展. 二者相互联系又高度互补, 定向进化离不开合理设计, 进化结果又反过来效力于理性设计. 最终的趋势是向生物-多学科 (Bio-X) 发展, 利用多学科交叉手段操作生物大分子和复杂的生物网络, 改造核酸分子、蛋白质、代谢路径、系统网络, 如利用计算机建立基因组代谢模型指导氨基酸生产; 利用定向进化进行非天然蛋白质分子的精准改造; 利用细胞条形码技术进行谱系追踪和高通量筛选等. 总之, 合成生物学时代的到来使得谷氨酸棒杆菌有望实现更多氨基酸及其他大宗化合物的工业化生产.

参考文献

- 1 Becker J, Buschke N, Bückner R, et al. Systems level engineering of *Corynebacterium glutamicum*-reprogramming translational efficiency for superior production. *Eng Life Sci*, 2010, 10: 430–438
- 2 Li Z, Shen Y P, Jiang X L, et al. Metabolic evolution and a comparative omics analysis of *Corynebacterium glutamicum* for putrescine production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45: 123–139
- 3 Fu C, Kobayashi T, Wang N, et al. Genetically encoding quinoline reverses chromophore charge and enables fluorescent protein brightening in acidic vesicles. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 11058–11066
- 4 Baritugo K A, Kim H T, David Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 3915–3937
- 5 Albersmeier A, Pfeifer-Sancar K, Rückert C, et al. Genome-wide determination of transcription start sites reveals new insights into promoter structures in the actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotech*, 2017, 257: 99–109
- 6 Yim SS, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 2959–2969
- 7 Mutalik V K, Guimaraes J C, Cambray G, et al. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat Methods*, 2013, 10: 354–360
- 8 Liu X, Zhao Z, Zhang W, et al. Bicistronic expression strategy for high-level expression of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*. *Eng Life Sci*, 2017, 17: 1118–1125
- 9 Oide S, Gunji W, Moteki Y, et al. Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81: 2284–2298
- 10 Pfeifer E, Gätgens C, Polen T, et al. Adaptive laboratory evolution of *Corynebacterium glutamicum* towards higher growth rates on glucose minimal medium. *Sci Rep*, 2017, 7: 16780

- 11 Badran A H, Liu D R. Development of potent *in vivo* mutagenesis plasmids with broad mutational spectra. *Nat Commun*, 2015, 6: 8425
- 12 Fujio T. Minimum genome factory: innovation in bioprocesses through genome science. *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 46: 145–146
- 13 Choi JW, Yim SS, Min JK, et al. Enhanced production of recombinant proteins with *Corynebacterium glutamicum* by deletion of insertion sequences (IS elements). *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 1–12
- 14 Huber I, Palmer D J, Ludwig K N, et al. Construction of recombinant Pdu metabolosome shells for small molecule production in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 2145–2156
- 15 Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15179
- 16 Liu J, Wang Y, Lu Y, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 205
- 17 Peng F, Wang X, Sun Y, et al. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 201
- 18 Cho J S, Choi K R, Prabowo C P S, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2017, 42: 157–167
- 19 Cleto S, Jensen J V, Wendisch V F, et al. *Corynebacterium glutamicum* Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 375–385
- 20 Zeng H, Wen S, Xu W, et al. Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 10575–10585
- 21 Lian J, Hamedirad M, Hu S, et al. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system. *Nat Commun*, 2017, 8: 1688
- 22 Binder D, Frohwitter J, Mahr R, et al. Light-controlled cell factories: employing photocaged isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside for light-mediated optimization of *lac* promoter-based gene expression and (+)-valencene biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82: 6141–6149
- 23 Gupta A, Reizman I M B, Reisch C R, et al. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 273–279
- 24 Ren A, Xue Y, Peselis A, et al. Structural and dynamic basis for low-affinity, high-selectivity binding of L-glutamine by the glutamine riboswitch. *Cell Rep*, 2015, 13: 1800–1813
- 25 Esquiaqui J M, Sherman E M, Ye J D, et al. Conformational flexibility and dynamics of the internal loop and helical regions of the kink-turn motif in the glycine riboswitch by site-directed spin-labeling. *Biochemistry*, 2015, 55: 4295–4305
- 26 Wang J, Gao D, Yu X, et al. Evolution of a chimeric aspartate kinase for L-lysine production using a synthetic RNA device. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 8527–8536
- 27 Suresh G, Srinivasan H, Nanda S, et al. Ligand-induced stabilization of a duplex-like architecture is crucial for the switching mechanism of the SAM-III riboswitch. *Biochemistry*, 2015, 55: 3349–3360
- 28 Zhou L B, Zeng A P. Exploring lysine riboswitch for metabolic flux control and improvement of L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 729–734
- 29 Steffen V, Otten J, Engelmann S, et al. A toolbox of genetically encoded fret-based biosensors for rapid L-lysine analysis. *Sensors*, 2016, 16: 1604
- 30 Binder S, Schendzielorz G, Stabler N, et al. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome Biol*, 2012, 13: R40
- 31 Schendzielorz G, Dippong M, Grunberger A, et al. Taking control over control: use of product sensing in single cells to remove flux control at key enzymes in biosynthesis pathways. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 21–29
- 32 An K, Duong H D, Rhee J I. Ratiometric fluorescent L-arginine and L-asparagine biosensors based on the oxazine 170 perchlorate-ethyl cellulose membrane. *Eng Life Sci*, 2017, 17: 847–856
- 33 Mustafi N, Grunberger A, Kohlheyer D, et al. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metab Eng*, 2012, 14: 449–457
- 34 Mahr R, Gatgens C, Gatgens J, et al. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2015, 32: 184–194

- 35 Mustafi N, Grünberger A, Mahr R, et al. Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging of *L*-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. *PLoS ONE*, 2014, 9: e85731
- 36 Kjeldsen KR, Nielsen J. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 102: 583–597
- 37 Shinfuku Y, Sorpitorn N, Sono M, et al. Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 43
- 38 Mei J, Xu N, Ye C, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* S9114. *Gene*, 2016, 575: 615–622
- 39 Zhang Y, Cai J, Shang X, et al. A new genome-scale metabolic model of *Corynebacterium glutamicum* and its application. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 169
- 40 Ikeda M, Mitsunashi S, Tanaka K, et al. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* *L*-arginine and *L*-citrulline producer. *App Environ Microbiol*, 2009, 75: 1635–1641
- 41 Xu M, Rao Z, Xu H, et al. Enhanced production of *L*-arginine by expression of *Vitreoscilla* hemoglobin using a novel expression system in *Corynebacterium crenatum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 163: 707–719
- 42 Dou W, Xu M, Cai D, et al. Improvement of *L*-arginine production by overexpression of a bifunctional ornithine acetyltransferase in *Corynebacterium crenatum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165: 845–855
- 43 Xu M, Rao Z, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC-H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of *L*-arginine production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39: 495–502
- 44 Man Z, Rao Z, Xu M, et al. Improvement of the intracellular environment for enhancing *L*-arginine production of *Corynebacterium glutamicum* by inactivation of H₂O₂-forming flavin reductases and optimization of ATP supply. *Metab Eng*, 2016, 38: 310–321
- 45 Park S H, Kim H U, Kim T Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for *L*-arginine production. *Nat Commun*, 2014, 5: 4618
- 46 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, 58: 217–223
- 47 Becker J, Zelder O, Häfner S, et al. From zero to hero—design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for *L*-lysine production. *Metab Eng*, 2011, 13: 159–168
- 48 Jiang L Y, Chen S G, Zhang Y Y, et al. Metabolic evolution of *Corynebacterium glutamicum* for increased production of *L*-ornithine. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 47
- 49 Kim SY, Lee J, Lee SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of *L*-ornithine. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112: 416–421
- 50 Zhang B, Yu M, Zhou Y, et al. Improvement of *L*-ornithine production by attenuation of argF in engineered *Corynebacterium glutamicum* S9114. *AMB Expr*, 2018, 8: 26
- 51 Jorge J M P, Leggewie C, Wendisch V F. A new metabolic route for the production of gamma-aminobutyric acid by *Corynebacterium glutamicum* from glucose. *Amino Acids*, 2016, 48: 2519–2531
- 52 Jorge JM, Nguyen AQ, Pă Rez-Garcă A F, et al. Improved fermentative production of gamma-aminobutyric acid via the putrescine route: systems metabolic engineering for production from glucose, amino sugars, and xylose. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114: 862–873

Synthetic biology and metabolic engineering for amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*

LONG MengFei, XU MeiJuan, ZHANG Xian, YANG TaoWei, SHAO MingLong, XU ZhengHong
& RAO ZhiMing

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214000, China

Amino acids are important compounds and have a wide range of applications in the food, medicine, and chemical industries. A majority of the amino acids can be produced by proteolytic extraction, chemical synthesis, and/or certain microbial processes. Among these processes, microbial fermentation has been employed to produce some of the most commonly used amino acids on an industrial scale. *Corynebacterium glutamicum* has been proceeding as a forerunner in the field of industrial microbiology over the past several decades because it is used to produce millions of tons of various amino acids each year. With the use of synthetic biology and emergence of the next-generation of genome editing tools, this particularly useful strain of bacteria can produce practically all sorts of amino acids as well as their derivatives. This work reviews the state-of-art use of metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* and presents typical examples of amino acid production using *Corynebacterium glutamicum* based on synthetic biology strategies, which represent potentially promising methods of removing a number of complex bottlenecks from industrial production of amino acids.

***Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering, synthetic biology, amino acid**

doi: [10.1360/N052018-00248](https://doi.org/10.1360/N052018-00248)