

谷氨酸棒杆菌生产异亮氨酸辅因子策略及其基因组整合研究进展

靳鑫, 王苏蒙, 祁庆生, 梁泉峰*

山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

摘要: L-异亮氨酸属于三大支链氨基酸, 是人体8种必需氨基酸之一, 广泛应用于食品、药品、保健品、化妆品等领域。目前, 微生物发酵法是工业生产L-异亮氨酸的主要方法, 其中谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是发酵生产L-异亮氨酸的优势菌株, 然而随机诱变会使产量的提高能力达到饱和, 难以得到更加高产的菌株, 因此针对诱变菌株进行理性改造已成为进一步提高产量的主要方式; 且随着遗传操作技术在谷氨酸棒杆菌中的应用与优化, 代谢工程育种已逐渐取代传统的诱变育种。综述了谷氨酸棒杆菌中L-异亮氨酸的生物合成途径、代谢调控机制和理性改造L-异亮氨酸生产菌株的策略, 并对辅助因子工程应用于理性改造及对谷氨酸棒杆菌基因组整合策略进行了系统阐述, 以期工业水平稳定生产L-异亮氨酸高产菌株的基因组整合策略提供参考依据。

关键词: L-异亮氨酸; 生物合成; 理性改造; 辅助因子工程; 基因组整合

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2021.0050

中图分类号: TQ922, Q784

文献标志码: A

Cofactor Strategy and Genome Integration of L-isoleucine Production by *Corynebacterium glutamicum*

JIN Xin, WANG Sumeng, QI Qingsheng, LIANG Quanfeng*

State Key Laboratory of Microbiology, Shandong University, Shandong Qingdao 266237, China

Abstract: L-isoleucine which belongs to three branched chain amino acids, is one of the eight essential amino acids for human body. It is widely used in food, medicine, health products, cosmetics and other fields. At present, microbial fermentation is the main method of industrial production for L-isoleucine. *Corynebacterium glutamicum* is the dominant strain for fermentation production of L-isoleucine. However, random mutation saturates the ability to increase yield, so it is difficult to obtain more high-yield strains. Therefore, rational transformation of mutant strains has become the main way to further improve yield; with the application and optimization of genetic manipulation technology in *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering breeding has gradually replaced the traditional mutation breeding. In this paper, the biosynthetic pathway, metabolic regulation mechanism of L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* and the strategy of rational transformation of L-isoleucine producing strains were reviewed. The application of cofactor engineering in rational transformation and the strategy of genome integration of *Corynebacterium glutamicum* were systematically described, aiming to provide a reference basis for the genome integration strategy of L-isoleucine producing strains at the industrial level.

Key words: L-isoleucine; biosynthesis; rational modification; cofactor engineering; genome integration

L-异亮氨酸是人体8种必需氨基酸之一, 属于三大支链氨基酸。在人体生命活动中具有重要

作用, 因此广泛用于食品、药品、保健品、化妆品等领域^[1-4]。目前生产L-异亮氨酸方法主要包括蛋白

收稿日期: 2021-04-14; 接受日期: 2021-12-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2103600); 国家自然科学基金项目(31961133014; 31770095; 31971336)。

联系方式: 靳鑫 E-mail: 934183327@qq.com; * 通信作者 梁泉峰 E-mail: liangquanfeng@sdu.edu.cn

提取、化学合成、酶合成和微生物发酵^[5-6]。其中微生物发酵法是工业生产L-异亮氨酸的主流方法,生产菌株主要包括大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、黄色短杆菌和乳酸发酵短杆菌。相比大肠杆菌,谷氨酸棒杆菌属于食品安全级微生物(generally recognized as safe, GRAS)^[7-8],产物只有一种同分异构体,且不含有内毒素,具有非致病性,安全性较高,表明谷氨酸棒杆菌是生产食品药品质级发酵产品的理想菌株^[9]。谷氨酸棒杆菌作为L-异亮氨酸生产菌株,在氨基酸后期提取等方面优势明显。

L-异亮氨酸通过微生物生产过程中,由于L-异亮氨酸较长的代谢合成途径以及复杂的代谢调控网络,使得通过理性的代谢工程手段改造模式菌株,构建L-异亮氨酸优势生产菌较为困难。因此,主流构建高产菌的策略是通过随机诱变野生型菌株,然后筛选具有高产L-异亮氨酸潜力的诱变菌株^[10],再通过理性的代谢工程策略与手段进一步改造,获得能够应用于工业化生产的高经济效益和高产量的L-异亮氨酸生产菌株^[11]。但传统诱变育种存在筛选通量大、周期长和后期提取复杂等问题,并且经过传统诱变后的菌株基因组上很可能引入了有害突变,造成生产菌株遗传背景不清楚^[12],导致菌株在进行下一阶段代谢工程改造过程中遗传操作困难。实验室改造过程中菌株生长缓慢,且复杂有机酸较多,增加了理性改造获得高转化率菌株的难度。谷氨酸棒杆菌生产异亮氨酸的策略主要有过表达生物合成途径的关键基因、胞内外转运、解除异亮氨酸对苏氨酸脱水酶和乙酰羟氨酸合酶的反馈抑制。研究表明,全局调控基因对异亮氨酸合成途径关键基因具有统筹作用,因此全局调控因子的表达调控对异亮氨酸的生产具有重要作用。

相比于大肠杆菌等工业微生物,能够应用于谷氨酸棒杆菌的遗传操作工具,尤其是在基因组水平编辑的工具较少^[13]。因此,从基因组水平上进行单核苷酸突变、基因大片段敲除和插入以及进行基因表达水平调控和外源基因的整合是构建遗传稳定的基础。而外源基因稳定表达工业菌的策略是目前解决这些问题的理想方法,因此许多研究人员致力于开发更高效的基因整合技术^[14]。本文综述了广泛应用于谷氨酸棒杆菌基因组整合使用的遗传操作手段,包括同源重组以及较成熟应用于谷氨酸棒杆菌依赖于重组酶的定点整合系

统,以期工业水平稳定生产L-异亮氨酸高产菌株的基因整合策略提供参考依据。

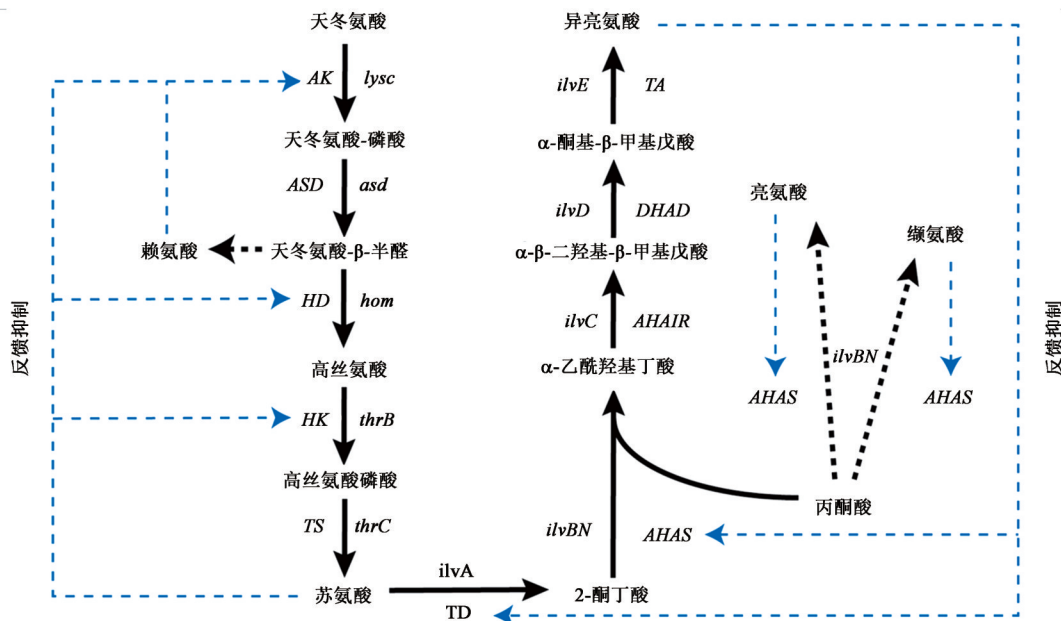
1 L-异亮氨酸的生物合成途径与代谢调控

1.1 L-异亮氨酸的生物合成途径

L-异亮氨酸在谷氨酸棒杆菌的生物合成途径较长,且与其他氨基酸代谢合成途径有重合部分,如苏氨酸、赖氨酸等^[15]。谷氨酸棒杆菌以葡萄糖为底物,经过糖酵解途径(embden-meyerhof-parnas pathway, EMP)、戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, PPP)以及三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)等中心代谢途径一系列酶催化后生成草酰乙酸,随后在转氨酶作用下生成L-天冬氨酸,经过包括5个限速酶在内的10步酶催化反应,具体生物合成途径如图1所示,最后通过*brnFE*编码的支链氨基酸胞外转运蛋白将合成的L-异亮氨酸运出胞外。

1.2 L-异亮氨酸的代谢调控

葡萄糖进入胞内,经过L-异亮氨酸生物合成途径合成L-天冬氨酸。L-天冬氨酸首先经过天冬氨酸激酶(aspartate kinase, AK)、天冬氨酸半醛脱氢酶(aspartyl semialdehyde dehydrogenase, ASD)、高丝氨酸脱氢酶(homoserine dehydrogenase, HD)、高丝氨酸激酶(homoserine kinase, HK)和苏氨酸合酶(threonine synthase, TS)催化,并分别由*lysC*、*asd*、*hom*、*thrB*和*thrC*基因编码生成苏氨酸;然后经过由苏氨酸脱水酶(threonine dehydrogenase, TD)、乙酰羟氨酸合酶(acetohydroxy acid synthase, AHAS)、乙酰羧基合成酶(ketol-acid reductoisomerase, AHAIIR)、二羧酸还原异构酶(dihydroxy-acid dehydratase, DHAD)和支链氨基酸转氨酶(branched-chain-amino-acid aminotransferase, TA)催化合成L-异亮氨酸,并分别由*ilvA*、*ilvBN*、*ilvC*、*ilvD*和*ilvE*编码。L-异亮氨酸的代谢途径有5个关键节点,分别由天冬氨酸激酶、高丝氨酸脱氢酶、高丝氨酸激酶、苏氨酸脱水酶和乙酰羟氨酸合酶5个关键酶催化。其中天冬氨酸激酶、高丝氨酸脱氢酶和高丝氨酸激酶受到苏氨酸反馈抑制;苏氨酸脱水酶和乙酰羟氨酸合酶受到异亮氨酸的反馈抑制。但在L-苏氨酸到L-异



注: AK—天冬氨酸激酶; ASD—天冬氨酸半醛脱氢酶; HD—高丝氨酸脱氢酶; HK—高丝氨酸激酶; TS—苏氨酸合成酶; TD: 苏氨酸脱水酶; AHAS—乙酰羟酸合成酶; AHAS—乙酰羟酸异构还原酶; DHAD—二羧酸还原异构酶; TA—支链氨基酸转氨酶

图1 谷氨酸棒杆菌中L-异亮氨酸的生物合成途径及代谢调控机制

Fig.1 Biosynthetic pathway and metabolic regulation mechanism of L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*

亮氨酸的代谢途径中,酶同样催化L-亮氨酸和L-缬氨酸的生物合成,且乙酰羟酸合成酶也受到L-亮氨酸和L-缬氨酸的反馈抑制,表明L-异亮氨酸合成过程中代谢调控具有复杂性,具体代谢调控机制如图1所示。

草酰乙酸转氨形成L-天冬氨酸后,从L-天冬氨酸合成L-苏氨酸这部分代谢途径中受到3个关键酶的催化,同时也是这部分代谢途径的限速步骤,分别是天冬氨酸激酶、高丝氨酸脱氢酶和高丝氨酸激酶。其中天冬氨酸激酶是L-天冬氨酸到L-异亮氨酸生物合成途径的第一个关键节点,催化天冬氨酸到天冬氨酸半醛,催化过程需要消耗ATP,同时该酶也受到L-赖氨酸的反馈抑制^[6];高丝氨酸脱氢酶以NADPH为还原力将天冬氨酸-β-半醛脱羧催化为L-高丝氨酸,在对苏氨酸的反馈抑制中以变构非竞争性方式被抑制;高丝氨酸激酶与高丝氨酸脱氢酶不同,其通过竞争性抑制机制被抑制^[7],将L-高丝氨酸催化成为高丝氨酸磷酸。

L-苏氨酸到L-异亮氨酸合成代谢途径中受到2个关键酶的催化,分别是苏氨酸脱水酶和乙酰羟酸合成酶,这2个酶催化的反应不但受到L-异亮氨酸的反馈抑制^[18],进而抑制TD和AHAS的活性,且TD催化苏氨酸脱水形成2-酮丁酸,

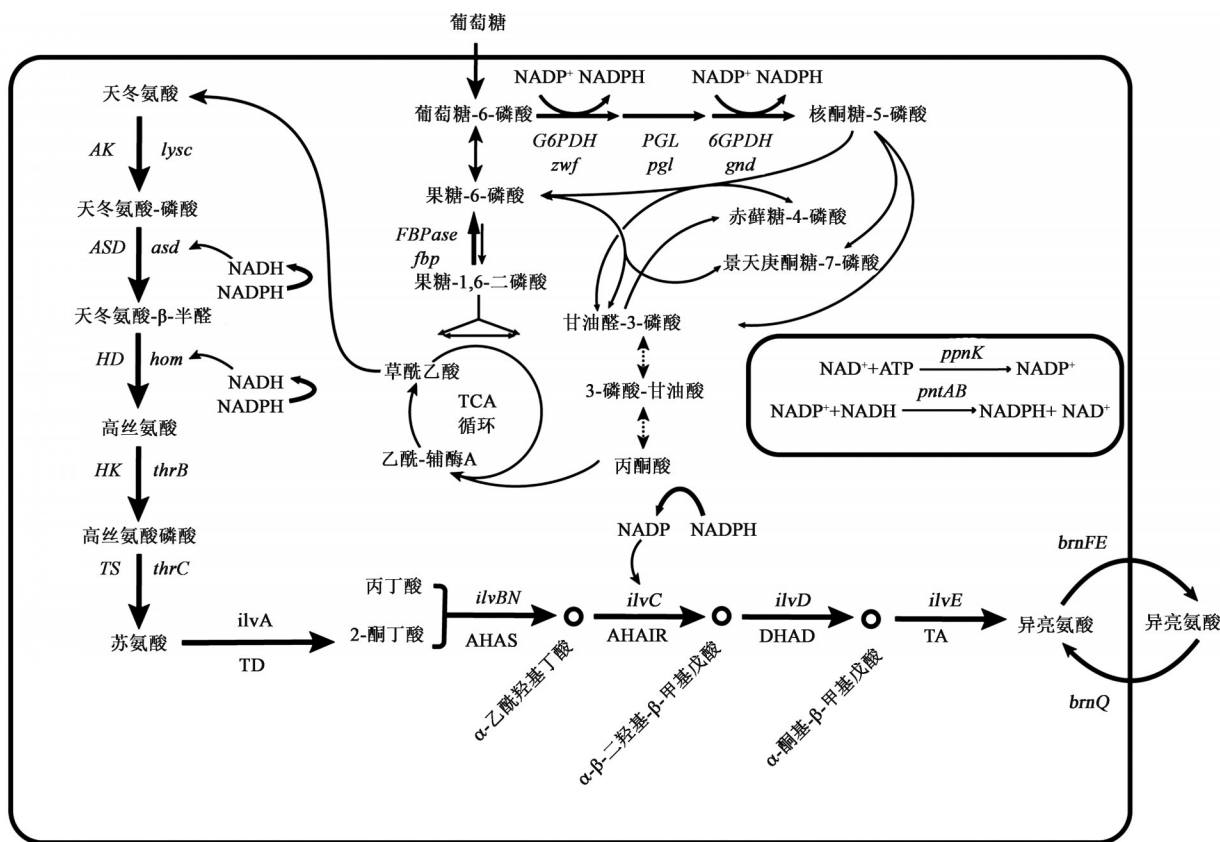
AHAS对2-酮丁酸的亲和力大于丙酮酸,2-酮丁酸存在时倾向于合成L-异亮氨酸^[19],因此苏氨酸脱水酶催化形成的2-酮丁酸是下一步乙酰羟酸合成酶催化形成L-异亮氨酸的重要前体;同时AHAS不但催化1分子丙酮酸和1分子酮酸形成异亮氨酸的前体乙酰羟基丁酸^[20],而且催化2分子丙酮酸脱羧形成L-缬氨酸和L-亮氨酸的前体2-乙酰乳酸。因此苏氨酸脱水酶和乙酰羟酸合成酶在L-异亮氨酸合成过程中不但是限速步骤,而且决定了最终节点处的代谢流向。

2 L-异亮氨酸的生产策略

如图2所示,根据L-异亮氨酸的生物合成途径和代谢调控,生产L-异亮氨酸的策略主要为:①解除反馈抑制;②过表达L-异亮氨酸合成途径关键基因;③修饰转运系统;④辅助因子平衡。

2.1 解除反馈抑制

L-异亮氨酸合成过程中由于受到自身的反馈抑制,不但削弱了L-异亮氨酸代谢途径前体的积累,而且导致仅通过过表达基因等增强L-异亮氨酸代谢流强度这一常规代谢工程手段不适用于L-异亮氨酸这种合成途径较长,同时受到多级调



注:AK—天冬氨酸激酶;ASD—天冬氨酸半醛脱氢酶;HD—高丝氨酸脱氢酶;HK—高丝氨酸激酶;TS—苏氨酸合成酶;TD:苏氨酸脱水酶;AHAS—乙酰羟氨酸合成酶;AHAIR—乙酰羟氨酸异构还原酶;DHAD—二羟酸还原异构酶;TA—支链氨基酸转氨酶。NADH—还原型辅酶 I;NADP⁺—烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;NADPH—还原型辅酶 II;*brnFE*—编码双组分转运系统;*brnQ*—编码 L-异亮氨酸胞内转运;*zwf*—编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH);*pgl*—编码 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(PGL);*gnd*—编码 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6GPDH);*fbp*—编码果糖-1,6-磷酸酶(FBPase);*ppnK*—NAD⁺激酶编码基因;*pntAB*—膜结合转氨酶编码基因。

图2 谷氨酸棒杆菌中L-异亮氨酸的改造策略

Fig.2 Transformation strategy of L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*

控和反馈阻遏的产物。因此通过随机诱变筛选或者定向诱变得到的解除反馈抑制的酶催化作用下能显著提高 L-异亮氨酸的产量,对于随机诱变的菌株,在进行理性代谢工程改造时可以通过引入解除反馈抑制的突变位点,进而解除 L-异亮氨酸对关键节点酶的反馈抑制,最终显著提高了氨基酸产量。

2.1.1 解除L-苏氨酸反馈抑制 L-异亮氨酸生物合成途径

不仅包括L-苏氨酸合成途径,也包括L-苏氨酸对天冬氨酸激酶、高丝氨酸脱氢酶和高丝氨酸激酶的反馈抑制,通过构建这3个关键酶的突变体或者通过对随机诱变得到的高产菌株中编码酶的突变基因进行挖掘,能够得到解除L-苏氨酸反馈抑制的酶突变体,增强L-异亮氨酸合成通路的代谢流。

L-苏氨酸、L-赖氨酸和L-异亮氨酸是天冬氨酸的下游产物,天冬氨酸激酶是天冬氨酸合成L-异亮氨酸的第一个关键酶,L-赖氨酸是天冬氨酸- β -半醛的下游氨基酸,对天冬氨酸激酶有反馈抑制。通过构建天冬氨酸激酶突变体,不仅能不同程度地分别解除L-苏氨酸的反馈抑制,如 *lysC*^{N374T}、*lysC*^{E278V} 和 *lysC*^{D274A} 等^[21-22],如 *lysC*^{S381F} 能够解除L-赖氨酸的反馈抑制^[23],有些突变体如 *lysC*^{T311} 和 *lysC*^{A279T} 能够解除L-苏氨酸和L-赖氨酸的协同反馈抑制^[24-25];高丝氨酸脱氢酶中第378位突变是解除反馈抑制的重要位点,*hom*^{G378E} 和 *hom*^{G378S} 突变体不同程度解除了L-苏氨酸反馈抑制^[25-26];高丝氨酸激酶突变体 *thrB*^{A20G} 不但保留了野生酶活性,同时显著降低了L-苏氨酸对该酶的反馈抑制作用^[27](表1)。

表1 L-异亮氨酸生物合成途径解除反馈抑制位点

Table 1 Feedback inhibition sites of L-isoleucine biosynthesis pathway

受底物反馈抑制的酶	底物	解除反馈抑制位点	参考文献
天冬氨酸激酶	苏氨酸	N374A、D274A、E278V、G277A、A279V	[21-22]
	赖氨酸	T361A、S381F	[22-23]
	苏氨酸、赖氨酸	N299L、T336L、M365A、N372A、I272E、Q298G、I375P、E382A、F283R、R384L、S386A、S301F、T308A、F364A、T311I、A279T	[21, 22, 24, 28]
高丝氨酸脱氢酶	苏氨酸	G378E、G378S	[25-26]
高丝氨酸激酶	苏氨酸	A20G	[27]
苏氨酸脱水酶	异亮氨酸	V323A、H278R-L351S、F383V、F383A、V140M-F383A	[18, 28]
乙酰羟氨酸合成酶	异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸	G20D-I21D-I22F	[29]
	异亮氨酸	P176S-D426E-L57W	[30]

2.1.2 解除L-异亮氨酸反馈抑制 从L-苏氨酸到L-异亮氨酸生物合成过程中,苏氨酸脱水酶和乙酰羟氨酸合成酶不但是L-异亮氨酸合成的限速步骤,而且对L-异亮氨酸前体合成以及代谢流向具有决定作用,通过引入解除L-异亮氨酸反馈抑制的关键酶,能使代谢流更多流向L-异亮氨酸合成。

苏氨酸脱水酶是L-苏氨酸到L-异亮氨酸代谢途径的第一个关键酶,催化L-苏氨酸脱水形成2-酮丁酸,同时乙酰羟氨酸合成酶对2-酮丁酸的亲和力大于丙酮酸,2-酮丁酸存在时倾向于合成L-异亮氨酸^[19],因此苏氨酸脱水酶和乙酰羟氨酸合成酶共同决定了生成的支链氨基酸种类。解除L-异亮氨酸对苏氨酸脱水酶和支链氨基酸对乙酰羟氨酸合成酶的反馈抑制对于L-异亮氨酸的积累具有重要意义,因此通过引入解除反馈抑制的突变位点可提高L-异亮氨酸的产量。苏氨酸脱水酶突变体 *ilvA*^{V323A} 和 *ilvA*^{H278R-L351S} 解除了L-异亮氨酸对苏氨酸脱水酶的反馈抑制^[28]; *ilvA*^{V140M} 相比于野生型,苏氨酸脱水酶活性提高了1.5倍, *ilvA*^{F383A} 完全解除了反馈抑制,双突变体 *ilvA*^{V140M-F383V} 不但酶活提高了1.5倍,并且完全解除了L-异亮氨酸的反馈抑制^[18]。乙酰羟氨酸合成酶调节亚基上G20D-I21D-I22F突变解除了L-缬氨酸、L-异亮氨酸和L-亮氨酸的反馈抑制^[29]; Pro176Ser、Asp426Glu和Leu575Trp突变后不再受L-异亮氨酸的反馈抑制,L-异亮氨酸的产量有所提高。有研究通过将苏氨酸脱水酶突变体 *ilvA*^{F383V} 和乙酰羟氨酸合成酶大亚基突变体 *ilvBN*^{P176S-D426E-L575W} 共表达后摇瓶

发酵,72 h后L-异亮氨酸的产量为30.7 g·L⁻¹,产量提高了131.7%^[30](表1)。

2.2 过表达代谢途径关键基因

通过组合过表达L-异亮氨酸合成途径关键基因,主要包括编码5个重要节点酶、NADPH的供给相关酶和L-异亮氨酸胞外转运蛋白的基因,其中过表达5个重要节点酶最主要的是解除L-苏氨酸和L-异亮氨酸反馈抑制的突变体基因,从而加强L-异亮氨酸主代谢流,提高L-异亮氨酸产量。

有研究将 *ilvBN*、*ppnK*、*lrp* 和 *brnFE* 进行不同组合过表达,其中WM005/pYCW-1-*ilvBN2-ppnKI* 在72 h分批补料发酵后生产32.1 g·L⁻¹的L-异亮氨酸,较对照菌株提高了34.3%^[31]; *fusA* 编码的核糖体延伸因子G促进细菌蛋白质合成的易位步骤, *frr* 编码的核糖体循环因子与延伸因子G共同在翻译终止后将核糖体从信使RNA中解离, *fusA* 和 *frr* 的过表达能够提高谷氨酸棒杆菌IWJ001中L-异亮氨酸产量, *usA* 和 *frr* 以及 *ilvA*、*ilvB*、*ilvN* 和 *ppnK* 基因共同过表达后,L-异亮氨酸产量增加76.5%,并在72 h补料分批发酵中产生了28.5 g·L⁻¹ L-异亮氨酸^[32]。

研究表明,除了对谷氨酸棒杆菌胞内L-异亮氨酸合成途径关键酶的过表达,在谷氨酸棒杆菌中过表达大肠杆菌 *thrABC* 基因(编码双功能的天冬氨酸激酶I-高丝氨酸脱氢酶I、高丝氨酸激酶和苏氨酸合成酶),同时敲除 *alaT*(编码丙氨酸氨基转移酶),经过组合这两种改造策略的菌株

YILW $\Delta alaT$ 比出发菌株L-异亮氨酸产量提高了17.6%,同时减少了其他副产物氨基酸的积累量,使碳代谢流向L-异亮氨酸生物合成^[33]。

2.3 修饰转运系统

由 *brnF* 和 *brnE* 双组分编码的支链氨基酸胞外转运蛋白能够非特异性向胞外转运支链氨基酸(L-亮氨酸、L-异亮氨酸和L-缬氨酸)和蛋氨酸,并且受到全局调控因子 *lrp* 的调节^[34]。*brnFE* 编码的胞外转运能够减轻胞内L-异亮氨酸的浓度,减轻合成途径中关键节点的反馈抑制,从而增加L-异亮氨酸的生物合成^[35]。*brnQ* 编码支链氨基酸向胞内转运的蛋白。支链氨基酸的胞内转运是由 Na^+ 介导^[36-37]、质子驱动的^[38]。*brnFE* 的过表达提高了L-异亮氨酸的胞外转运效率,*brnQ* 的敲除降低了谷氨酸棒杆菌对胞外L-异亮氨酸的摄取,L-异亮氨酸的净排放量是L-异亮氨酸高产量的重要因素^[39]。

谷氨酸棒杆菌中编码支链氨基酸胞外转运蛋白基因 *brnFE* 的上调提高了包括L-异亮氨酸在内的多种氨基酸的高效生物合成^[40-41]。当胞内支链氨基酸和蛋氨酸积累时,*lrp* 能够结合到 *lrp* 与 *brnF* 之间的基因区域,保证LRP在其底物氨基酸积累时才合成^[9],进而激活 *brnFE* 的表达^[42-43]。研究表明 *lrp*、*brnFE* 和 *lrp-brnFE* 分别在谷氨酸棒杆菌L-异亮氨酸生产菌中过表达,过表达 *lrp* 比过表达 *brnFE* 能产生更多的L-异亮氨酸,共同过表达时产量与对照菌相比显著增加,JHI3-156/pDXW-8-*lrp-brnFE* 在摇瓶发酵和分批补料培养条件下L-异亮氨酸产量分别提高了63%和72%^[34]。

敲除 *brnQ* 基因能够阻断谷氨酸棒杆菌对胞外L-异亮氨酸的摄取,提高L-异亮氨酸的产量^[31]。有研究通过降低谷氨酸棒杆菌L-异亮氨酸向胞内摄取和提高L-异亮氨酸向胞外转运,并构建了YILW $\Delta brnQ$ 、YILWpXMJ19*brnFE* 和 YILW $\Delta brnQ$ /pXMJ19*brnFE*,结果表明,与出发菌株相比,L-异亮氨酸外排率均提高,L-异亮氨酸产量分别提高了10.4%、28.2%和43.6%^[39]。以上研究表明将降低摄取提高转运这一策略应用于理性改造工业水平的发酵菌株,可提高产量和经济效益。

2.4 辅助因子平衡

NADPH/NADP⁺影响了细胞内碳流分配和酶催化活性,因此,NADPH的再生能够维持细胞内依赖NADPH的代谢活动与酶催化过程。同时代

谢工程改造氨基酸高产菌株的关键在于改善胞内NADPH的供应。因此,通过选择合适的NADPH再生策略能够使碳代谢流最大化流向目标氨基酸。此外,工业菌株可能在生长、生产等发酵阶段需要不同的辅因子水平。如将来自糖酵解的碳通量引入磷酸戊糖途径以增加NADPH含量有利于目标代谢产物的生成。来自谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的ASD是一种依赖于NADPH的酶,需要大量NADPH才能进行高水平赖氨酸生物合成,NADPH/NADP⁺的不平衡导致菌株生长状况差,目标产物水平降低^[44-45]。

2.4.1 提高NADPH/NADP⁺的比率 提高NADPH/NADP⁺的比率主要通过两种策略实现,一种是通过戊糖磷酸途径中基因编码的酶催化作用下将NADP⁺还原为NADPH;另一种是通过表达编码NAD⁺激酶的 *ppnK* 基因(磷酸化NADH产生NADPH)。谷氨酸棒杆菌中通过过表达与戊糖磷酸途径(PPP途径)相关的基因,包括 *gnd*、*fbp* 和 *pgl*,经过分别过表达和组合表达这3个基因,相比于对照菌株,胞内NADPH/NADH⁺比率提高了3~4倍,并且生物量和转化率均有明显的提高,其中IWJ001/pDXW-8-*gnd-fbp* 和 IWJ001/pDXW-8-*gnd-fbp-pgl* 相比于对照菌株L-异亮氨酸,产量分别提高了38.4%和65.1%。表明将碳通量引向戊糖磷酸途径能够增加NADPH的供应,提高胞内NADPH/NADH⁺比率,进而增加L-异亮氨酸的产量^[46]。研究发现,增强 *zwf*、*gnd*、*ppnK*、*pntAB* 和 *udhA* 基因表达均能提高异亮氨酸的浓度,过表达编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 *zwf* 基因表现最好,NADPH 和 NADPH/NADH⁺ 比率分别提高了61.24%和90.63%^[47]。将谷氨酸棒杆菌编码NAD⁺激酶的 *ppnK* 基因(磷酸化NAD⁺产生NADP⁺)、编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 *zwf* 基因和来自酿酒酵母编码NADH激酶的 *Pos5* 基因分别过表达,以及 *zwf-ppnK* 的共同过表达,均增加了胞内NADPH/NADH⁺比率和最终L-异亮氨酸的产量。其中 *zwf-ppnK* 的共同过表达显著提高了NADPH/NADH⁺比率,并且使L-异亮氨酸的产量提高了85.9%^[48]。

2.4.2 NADPH 再生 构建低成本和高效的NADPH再生系统不但能保持胞内氧化还原平衡,并且可改善依赖NADPH产物的产量。NAD⁺可以通过NAD⁺激酶转换为NADP⁺^[49],膜连接转氢酶(membrane-linked hydrogenase, PntAB)或可溶性

转氢酶(soluble transhydrogenase, UdhA)可以催化NADH向NADPH的转化^[50],增加转氢酶的活性,并将多余的NADH转化为NADPH。通过将来自大肠杆菌JM109菌株中编码*pntAB*基因和谷氨酸棒杆菌编码NAD⁺激酶的*ppnK*基因(催化NADP⁺到NADPH)共同过表达,显著提高了精氨酸的产量;在大肠杆菌生产木糖醇^[51]和3-羟丙酸^[52]的研究中,PntAB增加了两种产物的产量,并且L-异亮氨酸的生产需要更多NADPH^[53]。同时也有研究表明NAD⁺激酶的过表达对异丁醇的生产无显著影响,但NAD⁺激酶和转氢酶PntAB的组合会导致异丁醇产量提高,进一步表明转氢酶和NAD⁺激酶对增加NADPH供应有协同效应^[54]。

2.4.3 引入外源依赖NADH的酶 天冬氨酸脱氢酶和天冬氨酸-β-半醛脱氢酶是L-天冬氨酸通路中利用NADPH的酶,通过在谷氨酸棒杆菌中引入外源依赖NADH的酶,或者通过突变酶结合中心关键残基改变酶的辅因子偏好从而利用NADH,提高了NADPH/NADH比率,缓解了NADPH供应压力。

引入外源依赖NADH的酶可提高谷氨酸棒杆菌L-赖氨酸产量,已知合成1 mol L-赖氨酸需要4 mol的NADPH,因此,在L-赖氨酸合成途径引入中直接利用NADH的酶,有利于L-赖氨酸生产过程中辅助因子平衡。利用酶挖掘技术已经鉴定了

一系列利用脱氢酶的NADH,分别为来自铜绿假单胞菌的天冬氨酸脱氢酶(*Pseudomonas aeruginosa* aspartate dehydrogenase, PaASPDH)、来自运动替斯崔纳菌的天冬氨酸-β-半醛脱氢酶(*Tistrella mobilis* aspartate-β-semialdehyde dehydrogenase, TmASADH)、来自大肠杆菌的二氢二癸酸还原酶(*Escherichia coli* dihydrodipicolinate reductase, EcDHDPR)和来自假热热孢菌的二氨基庚二酸脱氢酶(*Pseudothermotoga thermarum* diaminopimelate dehydrogenase, PtDAPDH)。过表达 PaASPDH、TmASADH、EcDHDPR 和 PtDAPDH 使赖氨酸的产生分别增加了 30.7%、32.4%、17.4% 和 36.8%。PaASPDH、TmASADH 和 EcDHDPR 的组合表达菌株中L-赖氨酸产量最高增加 30.7%,过表达4种NADH利用酶可以提高L-赖氨酸产量,同时不依赖氧化戊糖磷酸途径提供NADPH^[55]。

通过对天冬氨酸-β-半醛脱氢酶结合中心关键残基突变,能够增强辅助因子NAD(H)的利用^[56]。EcASADH-Q350N 和 EcASADH-Q350N/H171A 突变体在NADH存在时可有效合成L-高丝氨酸;相比野生型,EcASADH在NADH作为辅助因子的情况下生产的L-高丝氨酸较少。各策略应用于谷氨酸棒杆菌改造生产L-异亮氨酸的发酵产量见表2。

表2 L-异亮氨酸各改造策略发酵产量

Table 2 Fermentation yield of L-isoleucine by different transformation strategies

改造策略	L-异亮氨酸生产菌株	L-异亮氨酸 产量/(g·L ⁻¹)	转化率 /%	发酵条件	参考文献
过表达关键基因	K2P55(<i>homG378E-ilvAF323A</i>)	14.3	13.7	分批补料,3 L罐,78 h	[15]
(解除反馈抑制)	JHI3-156/pDXW-8- <i>ilvBN1-ilvA1</i>	30.7	12.0	分批补料,3 L罐,72 h	[30]
	YILWΔ <i>brnQ</i> /pXMJ19 <i>brnFE</i>	29.0	24.0	分批补料,5 L罐,60 h	[39]
修饰转运系统	YILWΔ <i>alaT</i>	15.4	—	分批补料,3 L罐,72 h	[33]
	JHI3-156/pDXW-8- <i>lrp-brnFE</i>	26.9	12.2	分批补料,3 L罐,72 h	[34]
	IWJ001/pDXW-8- <i>gnd-flp-pgl</i>	29.0	13.8	分批补料,3 L罐,96 h	[48]
辅因子平衡	IWJ001/pDXW-8- <i>fusA-frr-ilvBN1-ilvA1-ppnK</i>	28.5	13.9	分批补料,3 L罐,72 h	[32]
	WM005/pYCW-1- <i>ilvBN2-ppnK1</i>	32.1	18.1	分批补料,5 L罐,72 h	[31]

3 基因组整合

一般对于基因表达量的提高和外源基因的表

pXMJ19、pECXK99E 和 pDXW-8^[58]等。质粒表达系统对于菌株的实验室改造具有操作成熟、能实现较高表达量等优势,但应用于工业上大规模生产的菌株则表现出显著的缺点。工业化生产过程中,由于质粒的不稳定性,传代过程中可能造成含

质粒菌株表达基因拷贝数的波动和质粒丢失等问题,为了维持质粒稳定性和诱导表达需要添加大量抗生素和诱导剂,这不但降低了工业化发酵生产氨基酸等化学产品的经济效益^[57],而且抗生素的大规模应用会严重污染环境^[59]。

3.1 自杀质粒介导同源重组

传统基因组整合方式主要以同源重组的方式经过2次同源重组和2次筛选验证得到整合目的基因菌株,但是由于载体的转化效率低、第一次同源重组效率低、依赖于抗生素标记基因的使用^[60]和蔗糖筛选效率低等问题,需开发新的基因组整合工具。

一般谷氨酸棒杆菌的无痕敲除和基因组整合以 pK18mobsacB、pK19mobsacB^[61] 和 pK-JL^[62] 等成熟应用于谷氨酸棒杆菌敲除的自杀质粒介导。pK18mobsacB 和 pK19mobsacB 质粒上带有卡那霉素抗性基因 *kan* 和编码果聚糖蔗糖酶的 *sacB* 基因,蔗糖存在时 *sacB* 基因对谷氨酸棒杆菌具有致死作用,因此 *sacB* 基因作为反向筛选标记,经过2次同源重组和2次筛选后得到目的菌株,但主要用于基因的敲除与交换^[63]。随后有研究证明 pK18mobsacB 能够在谷氨酸棒杆菌基因组水平上实现基因的过表达^[57]。pK-JL 质粒是 pK18mobsacB 改良后的自杀质粒,通过替换 *sacB* 基因前的启动子为强启动子 *tacM* 后得到的^[62],因此提高了该质粒应用于基因组敲除和整合的蔗糖筛选效率,但上述载体仍存在转化效率低、整合质粒构建周期长和第一次同源重组效率低等问题。

通过克隆表达载体 pDXW-8 上的 Ptac-iMCS-rrnBT1T2 元件组装到自杀质粒 pK18mobsacB 上,构建了 pK18-MBPMT^[64],该方法避免了表达质粒的构建,不含有遗传标记,可明显缩短构建整合质粒的时间,尤其对于重复整合等基因组水平过表达操作。同时,对谷氨酸棒杆菌基因组进行无标记特异性位点整合和片段缺失后,可提高 L-赖氨酸产量。但该整合质粒仍未解决转化效率低及第一次同源重组效率低的问题。

通过进一步改良谷氨酸棒杆菌中自杀质粒介导的基因编辑系统,将谷氨酸棒杆菌基因组上野生型 *rspL* (编码核糖体小亚基 S12 蛋白) 突变后获得链霉素抗性,用强启动子 *Ptuf* 表达的野生型 *rpsL* 替换 pK18mobsacB 中的 *sacB*, 因此完成第一次同源重组的菌株能够在链霉素抗性平板生长;

随后液体培养,完成第二次同源重组的菌株能够在卡那霉素抗性平板生长,相比 pK18mobsacB 蔗糖筛选的 30% 阳性率, pK18mobsacB 链霉素筛选阳性率提高至 90%, 并且由于链霉素和卡那霉素筛选效率较高,可以减少一步法实验步骤和筛选周期,实现双交换^[13]。

3.2 Cre/loxP 系统

Cre 重组酶 (cyclization recombination enzyme) 是在大肠杆菌噬菌体 P1 中发现的,由 *Cre* 基因编码,并由 343 个氨基酸残基组成的蛋白质,其能够特异性识别 loxP (locus of X-over P1) 位点^[65], loxP 位点长 34 bp, 包括 2 个 13 bp 的反向重复序列和 1 个 8 bp 的间隔区域^[66]。反向重复序列是 Cre 重组酶特异识别位点,间隔区域决定了 loxP 位点的方向。Cre/loxP 系统^[67] 同样利用 *RecA* 基因介导的同源重组,经过 2 次同源重组后将靶基因替换为两端带有特异重组位点 loxP 的 *kanR* 片段,随后通过温敏型质粒表达 Cre 重组酶识别特异性重组位点 loxP 进行重组。2005 年, Suzuki 等^[68] 开发了基于 Cre/loxP 系统对基因组更加精准的敲除方法,删除了谷氨酸棒杆菌基因组上的 11 个片段,共有 250 kb 成功敲除,随后该团队又报道了 1 种新的基于 Cre/突变 loxP 基因组整合系统,其能够将异源基因整合到谷氨酸棒杆菌基因组,但是宿主菌必须含有突变基因,而待整合的外源基因必须包含选择标记,如抗性标记等^[14]。之后通过将自杀质粒介导的同源重组与 Cre/loxP 系统结合用于谷氨酸棒杆菌基因组敲除,提高了敲除筛选效率^[69]。Cre/loxP 系统不仅在原核生物应用广泛,在真核生物中也表现出稳定的基因组修饰。利用 Cre/loxP 系统介导的同源重组技术失活酿酒酵母中编码亚硫酸盐还原酶的基因 *METO* 提高了生产啤酒的抗氧化能力并改善了风味^[70]; 对耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 中编码与 γ -癸内酯合成相关的乙酰辅酶 A 氧化酶 *POX5* 基因用 Cre/loxP 同源重组系统进行敲除,成功获得了 *pox5* 缺陷菌株。此外, Cre/loxP 系统对哺乳动物细胞,如小鼠^[71], 由于其具有组织特异性、位点特异性和高效重组等优势,在转基因动物构建中得到了有效利用,同时也是体内 DNA 重组的优势基因操作手段^[72]。但经过传统诱变得到的谷氨酸棒杆菌生产菌株时, *RecA* 基因可能会引入非同义突变,甚至可能造成 *RecA* 基因表达蛋白的失活,不能介导同源重组。因

此开发不依赖于 *RecA* 基因介导的重组系统具有重要意义,随着 *RecT* 介导的单链重组和人工核酸酶介导的 CRISPR 的发展,Cre/loxP 系统有望更快速、简便、高效地应用于谷氨酸棒杆菌基因组编辑中。

3.3 RecET 重组系统

原核生物同源重组大多依赖于内源性的 *RecA* 蛋白,自杀质粒介导的同源重组一般是基于这种构建环状质粒打靶载体实现基因无痕敲除、替换、插入与整合,但构建所需同源臂较长,且筛选过程繁琐。近年来,通过激活原噬菌体 *Rac* 建立的 RecET 重组系统,成功应用于基因组编辑中,并且不受限制性内切酶切割位点和靶 DNA 大小的限制,因此建立了依赖于 RecET 介导的基因编辑系统^[73]。RecET 系统不仅可以介导双链 DNA 重组,其中 *RecT* 也可以介导单链 DNA 重组,基于 *RecT*/β 蛋白介导单链重组被用来大规模进化细胞^[74],实现了多样自动化的基因组改造技术。

RecET 系统首先在大肠杆菌中应用,通过 PCR 扩增得到的 DNA 同源片段替换大肠杆菌中的靶基因实现了目的基因的敲除^[75]。RecET 通常被构建于质粒上,由于大肠杆菌内源存在 *recBCD*,能够降解外源线性双链 DNA,因此,RecET 系统的优化主要集中于抑制 *recBCD* 基因功能,保证线性 DNA 分子的完整性,从而顺利利用 RecET 系统介导双链 DNA 重组^[76]。随着 RecET 系统重组技术的发展,研究发现 70 bp 长的双链 DNA 和单链 DNA 均可以作为打靶分子对基因组进行点突变和插入修饰^[77]。单链重组的原理是将单链 DNA 转入细胞后,在基因组复制过程中,由于基因的半不连续复制,设计的单链 DNA 以冈崎片段的形式结合于后随链后在基因组稳定遗传。随着单链重组技术在谷氨酸棒杆菌中的应用,对多种 *RecT* 同源蛋白进行比较优化,发现 *RecT* 介导单链 DNA 进行单链重组效果最好^[78]。*RecT* 介导的单链重组也被用以构建基因组多样性文库,并通过构建单链 DNA 文库实现基因组多样性^[74],但得到的突变体也需要与高通量的筛选技术相结合。

随着基因组编辑技术的迅猛发展,各种基因编辑技术结合实现基因组的高效编辑和高效筛选成为一种基因组改造策略。如将 RecET 技术和 Cre/loxP 系统结合,实现了对谷氨酸棒杆菌 ATCC 14067 无标记缺失^[79],这也为谷氨酸棒杆菌基因编

辑提供了一种无标记操作策略。通过优化 CRISPR/Cpf1 和 RecET 系统,实现了对谷氨酸棒杆菌基因组大片段多基因的编辑^[80],利用 crRNA、CRISPR/Cpf1-RecET 一步可以编辑 2~3 个基因,效率分别为 91.6% 和 10%,1、5、20 kb 的编辑效率分别为 79.6%、91.3%、36.4%。

3.4 CRISPR/Cas9

规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)是指含有较多短的不连续的重复序列(24~37 nt),Cas 是指与 CRISPR 相关的蛋白,二者共同作用组成 CRISPR-Cas 系统,用以抵御外来因子 RNA 介导的获得性免疫系统。CRISPR 前导序列(leader sequence)类似于启动子,富含 A/T 低复杂性的非编码区,起始转录重复间隔序列并生成 crRNA(CRISPR RNAs)前体,CRISPR 序列往往邻近 *cas* 基因,随后间隔区(spacers)识别外来遗传因子,crRNA 与 Cas 蛋白共同参与免疫防御过程。来自化脓球杆菌的 Cas 效应蛋白 SpCas9 对谷氨酸棒杆菌存在毒性,通过使用来自链霉菌的 SpCas9 发现其能够在谷氨酸棒杆菌中得到转化子,同时结合单链重组系统删除了谷氨酸棒杆菌基因组 400 bp 左右,但更大片段的删除、插入以及点突变等尚未测试。由于谷氨酸棒杆菌在工业化生产氨基酸等发酵产品有良好性能,被越来越多的进行改造并用于发酵生产^[81],但目前主要对谷氨酸棒杆菌的基因组改造主要依赖于效率极低的同源双交换^[82]。CRISPR/Cas9 具有效率高、价格低廉、操作简单等优势,并广泛应用于哺乳动物、植物和微生物中,谷氨酸棒杆菌也开发了基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑系统^[83],未来有望应用于工业生产。

同时,有研究指出 SpCas9 具有毒性,因此使用来自 *Francisella novicida*(FN)的 Cas9 效应蛋白(FNCpf1)与谷氨酸棒杆菌适配,同时结合单链重组系统,能够对基因组进行删除、插入等精细修改,明显缩短了基因组编辑周期^[84]。有研究在耻垢分枝杆菌中测试了 14 种不同 Cas9 效应蛋白,结果发现 3 个 *Cas9* 基因不影响耻垢分枝杆菌的生长,而且表现出了更高的切割活性^[85]。因此,FNCpf1 相比于 SpCas9 更适合用于对谷氨酸棒杆菌基因组编辑,并且有更广泛的适用空间。

CRISPR/Cas9 除了直接用于基因组编辑,目

前还作为1种如RecT介导的单链重组技术和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的高效筛选策略。RecT介导的单链重组技术通过几十个碱基作为单链DNA即可实现基因组编辑,但重组子阳性率较低。通过在谷氨酸棒杆菌中利用CRISPR-Cas9介导突变后重组子作为辅助筛选策略^[86],显著提高了筛选效率,减轻工作周期,使RecT介导的单链重组技术能更高效地应用于基因组编辑。随着基因组编辑技术深入地发展以及在谷氨酸棒杆菌中的广泛应用,同时,各个编辑技术之间的协同辅助策略也能够为谷氨酸棒杆菌中的基因组编辑操作提供更高效率的工具。

4 展望

L-异亮氨酸作为人体8种必需氨基酸之一,在食品、药品和化妆品等领域应用广泛,且需求量逐年上升。但工业发酵L-异亮氨酸大部分通过随机诱变得得到,菌株稳定性差,目前主流方法为随机诱变后的菌株再进行理性改造。理性改造策略除了针对L-异亮氨酸生物合成途径关键酶的过表达、转运系统、关键酶的催化活性反馈抑制能力外,代谢工程改造氨基酸高产菌株的关键还在于改善胞内NADPH的供应。传统代谢工程对于氨基酸代谢途径关键基因操作的分析改造非常重要,而且酶挖掘和辅助因子工程相结合也是提高氨基酸产量的高效方法。由于质粒的稳定性差,开发更高效的基因组遗传操作工具尤为重要,随着基因组操作工具水平的提高,以谷氨酸棒杆菌为底盘细胞的发酵生产水平也必将大幅提高。

随着全基因组测序、转录组学、代谢组学等现代生物学技术的发展,以及生物信息学与计算机建模技术与生命科学多学科融合,未来对谷氨酸棒杆菌代谢的改造需从菌株整体代谢网络出发,通过全局分析以及代谢流重构,从而进一步提高谷氨酸棒杆菌生产L-异亮氨酸的产量。

参 考 文 献

- [1] ELOVARIS R A, HAJISHAFIEE M, ULLRICH S S, *et al.* Intra-gastric administration of leucine and isoleucine does not reduce the glycaemic response to, or slow gastric emptying of, a carbohydrate-containing drink in type 2 diabetes[J/OL]. *Diabetes Res. Clin. Pr.*, 2021, 171: 108618[2021-12-08]. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108618>.
- [2] ZHAO Y, YAN M Y, JIANG Q, *et al.* Isoleucine improved growth performance, and intestinal immunological and physical barrier function of hybrid catfish *Pelteobagrus vachelli* × *Leiocassis longirostris*[J]. *Fish Shellfish Immun.*, 2021, 109: 20-33.
- [3] GUILLOUET S, RODAL A A, AN G H, *et al.* Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on isoleucine production[J]. *Appl. Environ. Microb.*, 1999, 65(7): 3100-3107.
- [4] D'ESTE M, ALVARADO-MORALES M, ANGELIDAKI I. Amino acids production focusing on fermentation technologies - a review[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2018, 36(1): 14-25.
- [5] LUETKE-EVERSLOH T, SANTOS C N S, STEPHANOPOULOS G. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2007, 77(4): 751-762.
- [6] IVANOV K, STOIMENOVA A, OBRESHKOVA D, *et al.* Biotechnology in the production of pharmaceutical industry ingredients: amino acids[J]. *Biotechnol. Biotech. Eq.*, 2013, 27(2): 3620-3626.
- [7] EGGELE L, BOTT M. A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2015, 99(8): 3387-3394.
- [8] YU X L, JIN H Y, LIU W J, *et al.* Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose[J/OL]. *Microb. Cell Fact.*, 2015, 14: 183[2021-12-08]. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0364-8>.
- [9] WANG X. Strategy for improving L-isoleucine production efficiency in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103(5): 2101-2111.
- [10] LOTHAR E M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*[M]. London: Taylor & Francis, 2005.
- [11] ZHANG C L, DU S S, LIU Y, *et al.* Strategy for enhancing adenosine production under the guidance of transcriptional and metabolite pool analysis[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2015, 37(7): 1361-1369.
- [12] BAILEY J E. Toward a science of metabolic engineering[J]. *Science*, 1991, 252(5013): 1668-1675.
- [13] WANG T, LI Y J, LI J, *et al.* An update of the suicide plasmid-mediated genome editing system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microb. Biotechnol.*, 2019, 12(5): 907-919.
- [14] SUZUKI N, INUI M, YUKAWA H. Site-directed integration system using a combination of mutant lox sites for *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2007, 77(4): 871-878.
- [15] VOGT M, KRUMBACH K, BANG W G, *et al.* The contest for precursors: channelling L-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* without byproduct formation[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99(2): 791-800.
- [16] SHIHO I, MIYAJIMA R. Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *brevibacterium flavum* [J]. *J. Biochem.*, 1969, 65(6): 849-859.
- [17] DONG X Y, QUINN P J, WANG X Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine[J]. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29(1): 11-23.

- [18] GUO Y F, XU J Z, HAN M, *et al.* Generation of mutant threonine dehydratase and its effects on isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. World J. Microb. Biot., 2015, 31(9): 1369-1377.
- [19] CALDER P C. Branched-chain amino acids and immunity[J]. J. Nutr., 2006, 136(1): 288s-293s.
- [20] GUO Y F, HAN M, YAN W L, *et al.* Generation of branched-chain amino acids resistant *Corynebacterium glutamicum* acetohydroxy acid synthase by site-directed mutagenesis [J]. Eotechnol. Bioproc. E, 2014, 19(3): 456-467.
- [21] CHEN Z, MEYER W Q, RAPPERT S, *et al.* Coevolutionary analysis enabled rational deregulation of allosteric enzyme inhibition in *Corynebacterium glutamicum* for lysine production [J]. Appl. Environ. Microb., 2011, 77(13): 4352-4360.
- [22] YOSHIDA A, TOMITA T, KURIHARA T, *et al.* Structural insight into concerted inhibition of $\alpha_2\beta_2$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. J. Mol. Biol., 2007, 368(2): 521-36.
- [23] SINDELAR G, WENDISCH V F. Improving lysine production by *Corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes[J]. Appl. Microbiol. Biot., 2007, 76(3): 677-689.
- [24] OHNISHI J, MITSUHASHI S, HAYASHI M, *et al.* A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant [J]. Appl. Microbiol. Biot., 2002, 58(2): 217-23.
- [25] DONG X Y, ZHAO Y, ZHAO J X, *et al.* Characterization of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* IWJ001 and systematic investigation of L-isoleucine biosynthesis[J]. J. Ind. Microbiol. Biot., 2016, 43(6): 873-885.
- [26] REINSCHIED D J, EIKMANN S B J, SAHM H. Analysis of a *Corynebacterium-glutamicum* *hom* gene coding for a feedback-resistant homoserine dehydrogenase[J]. J. Bacteriol., 1991, 173(10): 3228-3230.
- [27] PETIT C, KIM Y, LEE S K, *et al.* Reduction of feedback inhibition in homoserine kinase (ThrB) of *Corynebacterium glutamicum* enhances l-threonine biosynthesis [J]. Acs. Omega., 2018, 3(1): 1178-1186.
- [28] MOCKEL B, EGDELING L, SAHM H. Threonine dehydratases of *Corynebacterium-glutamicum* with altered allosteric control - their generation and biochemical and structural-analysis [J]. Mol. Microbiol., 1994, 13(5): 833-842.
- [29] YIN L, HU X, XU D, *et al.* Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metab. Eng., 2012, 14(5): 542-550.
- [30] ELISAKOVA V, PATEK M, HOLATKO J, *et al.* Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Appl. Environ. Microb., 2005, 71(1): 207-213.
- [31] ZHANG Y, LIU Y, ZHANG S, *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve l-isoleucine production[J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 2020, 68(3): 568-584.
- [32] ZHAO J X, HU X Q, LI Y, *et al.* Overexpression of ribosome elongation factor G and recycling factor increases l-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Appl. Microbiol. Biot., 2015, 99(11): 4795-4805.
- [33] WANG J, WEN B, WANG J, *et al.* Enhancing L-isoleucine production by thrABC overexpression combined with alaT deletion in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Appl. Biochem. Biotech., 2013, 171(1): 20-30.
- [34] 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 [J]. J. Appl. Microbiol., 2013, 114(5): 1369-1377.
- [35] LI N, XU S, DU G C, *et al.* Efficient production of L-homoserine in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 by redistribution of metabolic flux[J/OL]. Biochem. Eng. J., 2020, 161: 107665[2021-12-08]. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107665>.
- [36] EBBIGHAUSEN H, WEIL B, KRAMER R. Transport of branched-chain amino-acids in *Corynebacterium-glutamicum* [J]. Arch. Microbiol., 1989, 151(3): 238-244.
- [37] TAUCH A, HERMANN T, BURKOVSKI A, *et al.* Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product [J]. Arch. Microbiol., 1998, 169(4): 303-312.
- [38] LU J N, BRIGHAM C J, PLASSMEIER J K, *et al.* Characterization and modification of enzymes in the 2-ketoisovalerate biosynthesis pathway of *Ralstonia eutropha* H16[J]. Appl. Microbiol. Biot., 2015, 99(2): 761-774.
- [39] XIE X, XU L, SHI J, *et al.* Effect of transport proteins on L-isoleucine production with the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012, 39(10): 1549-1556.
- [40] BROER S, EGDELING L, KRAMER R. Strains of *Corynebacterium-Glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems[J]. Appl. Environ. Microb., 1993, 59(1): 316-321.
- [41] DONG X Y, ZHAO Y, HU J Y, *et al.* Attenuating L-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on L-threonine and L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Enzyme Microb. Tech., 2016, 93-94:70-78.
- [42] KENNERKNECHT N, SAHM H, YEN M R, *et al.* Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family[J]. J. Bacteriol., 2002, 184(14): 3947-3956.
- [43] LANGE C, MUSTAFI N, FRUNZKE J, *et al.* Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the brnFE operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids [J]. J. Biotechnol., 2012, 158(4): 231-241.
- [44] TAKENO S, HORI K, OHTANI S, *et al.* L-Lysine production independent of the oxidative pentose phosphate pathway by *Corynebacterium glutamicum* with the *Streptococcus* mutans gapN gene[J]. Metab. Eng., 2016, 37: 1-10.
- [45] TAKENO S, MURATA R, KOBAYASHI R, *et al.* Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production[J]. Appl. Environ. Microb., 2010, 76(21): 7154-7160.

- [46] MA W, WANG J, LI Y, *et al.* Enhancing pentose phosphate pathway in *Corynebacterium glutamicum* to improve L-isoleucine production[J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 2016, 63(6): 877-885.
- [47] ZHU S, CAI D, LIU Z, *et al.* Enhancement of bacitracin production by NADPH generation via overexpressing glucose-6-phosphate dehydrogenase zwf in *Bacillus licheniformis* [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2019, 187(4): 1502-1514.
- [48] 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[J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2013, 171(2): 504-521.
- [49] KAWAI S, MORI S, MUKAI T, *et al.* Molecular characterization of *Escherichia coli* NAD kinase[J]. Eur. J. Biochem., 2001, 268(15): 4359-4365.
- [50] SAUER U, CANONACO F, HERI S, *et al.* The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli* [J]. J. Biol. Chem., 2004, 279(8): 6613-6619.
- [51] AKINTERINWA O, CIRINO P C. Anaerobic obligatory xylitol production in *Escherichia coli* strains devoid of native fermentation pathways[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77(2): 706-709.
- [52] RATHNASINGH C, RAJ S M, LEE Y, *et al.* Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains[J]. J. Biotechnol., 2012, 157(4): 633-640.
- [53] ZHAN M, KAN B, DONG J, *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved L-arginine synthesis by enhancing NADPH supply[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2019, 46(1): 45-54.
- [54] SHI A, ZHU X, LU J, *et al.* Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production[J]. Metab. Eng., 2013, 16: 1-10.
- [55] WU W, ZHANG Y, LIU D, *et al.* Efficient mining of natural NADH-utilizing dehydrogenases enables systematic cofactor engineering of lysine synthesis pathway of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metab. Eng., 2019, 52: 77-86.
- [56] XU X, CHEN J, WANG Q, *et al.* Mutagenesis of key residues in the binding center of L-aspartate-b-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* enhances utilization of the cofactor NAD(H)[J]. ChemBioChem, 2016, 17(1): 56-64.
- [57] XU J Z, XIA X H, ZHANG J L, *et al.* A method for gene amplification and simultaneous deletion in *Corynebacterium glutamicum* genome without any genetic markers[J]. Plasmid, 2014, 72: 9-17.
- [58] XU D, TAN Y, HUAN X, *et al.* Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer [J]. J. Microbiol. Methods, 2010, 80(1): 86-92.
- [59] TAUCH A, GOTKER S, PUHLER A, *et al.* The alanine racemase gene *alr* is an alternative to antibiotic resistance genes in cloning systems for industrial *Corynebacterium glutamicum* strains[J]. J. Biotechnol., 2002, 99(1): 79-91.
- [60] IKEDA M, KATSUMATA R. A novel system with positive selection for the chromosomal integration of replicative plasmid DNA in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 1998, 144: 1863-1868.
- [61] LOBET Y, PEACOCK M G, CIEPLAK W. Frame-shift mutation in the *LacZ* gene of certain commercially available Puc18 plasmids[J/OL]. Nucl. Acids Res., 1989, 17(12): 4897 [2021-12-08]. <https://doi.org/10.1093/nar/17.12.4897>.
- [62] XU D, TAN Y, SHI F, *et al.* An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Plasmid, 2010, 64(2): 85-91.
- [63] VOGT M, HAAS S, KLAFFL S, *et al.* Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction[J]. Metab. Eng., 2014, 22: 40-52.
- [64] XU J, ZHANG J, HAN M, *et al.* A method for simultaneous gene overexpression and inactivation in the *Corynebacterium glutamicum* genome [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2016, 43(10): 1417-1427.
- [65] STERNBERG N, SAUER B, HOESS R, *et al.* Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation[J]. J. Mol. Biol., 1986, 187(2): 197-212.
- [66] GUO F, GOPAUL D N, DUYNE G D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse[J]. Nature, 1997, 389(6646): 40-46.
- [67] HU J, TAN Y, LI Y, *et al.* Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Plasmid, 2013, 70(3): 303-313.
- [68] SUZUKI N, OKAYAMA S, NONAKA H, *et al.* Large-scale engineering of the *Corynebacterium glutamicum* genome[J]. Appl. Environ. Microb., 2005, 71(6): 3369-3372.
- [69] HU J, LI Y, ZHANG H, *et al.* Construction of a novel expression system for use in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Plasmid, 2014, 75: 18-26.
- [70] 赵传仕, 王忠民, 王德良, 等. 利用同源重组技术调节啤酒中 SO₂ 含量研究[J]. 酿酒, 2006(06): 62-64.
- [71] KOS C H. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models[J]. Nutr. Rev., 2004, 62(6 Pt 1): 243-246.
- [72] KIM H, KIM M, IM S K, *et al.* Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes [J]. Lab. Anim. Res., 2018, 34(4): 147-159.
- [73] ZHANG Y M, BUCHHOLZ F, MUYRERS J P P, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. Nat. Genet., 1998, 20(2): 123-128.
- [74] WANG H H, ISAACS F J, CARR P A, *et al.* Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-898.
- [75] MUYRERS J P, ZHANG Y, BENES V, *et al.* Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination[J]. EMBO Rep., 2000, 1(3): 239-243.
- [76] NARAYANAN K, WILLIAMSON R, ZHANG Y, *et al.* Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/ bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system[J]. Gene Ther., 1999, 6(3): 442-447.

- [77] ELLIS H M, YU D, DITIZIO T, *et al.*. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(12): 6742-6726.
- [78] ZHANG Y, MUYRERS J P, RIENTJES J, *et al.*. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells[J/OL]. *BMC Mol. Biol.*, 2003, 4(1): 1[2021-12-08]. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-4-1>.
- [79] HUANG Y Y, LI L, XIE S, *et al.*. Recombineering using RecET in *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067 via a self-excisable cassette[J/OL]. *BMC Mol. Biol.*, 2017, 7: 7916 [2021-12-08]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08352-9>.
- [80] ZHAO N N, LI L, LUO G J, *et al.*. Multiplex gene editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR/Cpf1-RecE/T system in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2020, 47(8): 599-608.
- [81] HEIDER S A E, WENDISCH V F. Engineering microbial cell factories: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* with a focus on non-natural products [J]. *Biotechnol. J.*, 2015, 10(8): 1170-1184.
- [82] PARK S H, KIM H U, KIM T Y, *et al.*. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2014, 5: 4618[2021-12-08]. <https://doi.org/10.1038/ncomms5618>.
- [83] CHO J S, CHOI K R, PRABOWO C P S, *et al.*. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Metab. Eng.*, 2017, 42: 157-167.
- [84] JIANG Y, QIAN F H, YANG J J, *et al.*. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2017, 8: 15179[2021-12-08]. <https://doi.org/10.1038/ncomms15179>.
- [85] SUN B B, YANG J J, YANG S, *et al.*. A CRISPR-Cpf1-assisted non-homologous end joining genome editing system of *Mycobacterium smegmatis*[J/OL]. *Biotechnol. J.*, 2018, 13(9): e1700588 [2021-12-08]. <https://doi.org/10.1002/biot.201700588>.
- [86] 靳海迎. 基于 CRISPR-Cas9 系统的谷氨酸棒状杆菌基因组编辑技术的研究[D]. 济南:山东大学,2017.