微生物发酵法生产 L-亮氨酸的研究进展

张伟国，　程　功
（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：微生物发酵法是目前生产 L-亮氨酸最主要的方法。选育 L-亮氨酸高产菌株，有利于缩短国内亮氨酸生产与国外生产之间的差距，提高我国 L-亮氨酸市场与国际的竞争力。作者概述了 L-亮氨酸的生产方法、生物合成过程中酶的调节作用以及转运蛋白和亮氨酸响应蛋白对 L-亮氨酸的调控作用，同时概述了国内外 L-亮氨酸产生菌育种方法的研究进展。

关键词：L-亮氨酸；生物合成；转运蛋白；Lrp
中图分类号：Q 591.2　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)02—0113—08

Progress on Microbial Fermentation Production of L-Leucine

ZHANG Weiguo，　*CHENG Gong*
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Microbial fermentation was the mainly method to product L-leucine presently. Improving the strain production of L-leucine by breeding high-yielding strains is helpful for shortening of the gap with foreign production and improving our international competitiveness with foreign. This paper stated the methods of L-leucine production, regulation of biosynthesis enzymes, transporter and leucine responsive protein, and the research evolution of the breeding of L-leucine hyper-producter were summarized at home and abroad.

Keywords: L-leucine, biosynthesis, transporter, Lrp

L-亮氨酸，又称白氨酸，即：α-氨基-γ-甲基戊酸、α-氨基异己酸，与缬氨酸、异亮氨酸同属于支链氨基酸。L-亮氨酸是 1819 年 Proust 首次从奶酪中分离出来，后来 Braconnot 从肌肉与羊毛的酸水解物中得到其结晶，并定名为亮氨酸[1]。L-亮氨酸是人与动物自身不能合成而必需依赖外源供给的 8 大必需氨基酸之一。L-亮氨酸具有多种生理功能，是临床选用的复合氨基酸静脉注射液不可缺少的原料，对维持危重病人的营养需要、抢救患者生命起着积极作用[2]，如 L-亮氨酸 Schiff 碱 Cu（Ⅱ）、Ni（Ⅱ）、Zn（Ⅱ）金属配合物具有抗癌、抗病毒、抑制细菌生长等生物活性功能[3-5]；以 L-亮氨酸为前体物合成的乙酰-L-亮氨酸和乙醇酯可作为头晕治疗及营养滋补类药物。另外，L-亮氨酸在食品、化妆品、农业上也具有广泛的应用，如选用 L-亮氨酸作为氨基酸部分的 N-稀有脂肪酸基-L-亮氨酸具有较高的

收稿日期：2014-03-20
基金项目：国家 863 计划项目(2008AA02Z212)。
作者简介：张伟国(1963—)，男，江苏张家港人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事工业微生物菌种选育、生物能源和生物新材料等方面的研究。E-mail：zhangwg168@126.com

抗菌活性，可用作食品添加剂;L-亮氨酸与稀土配合物是氨基酸肥料和农药的一种[6],不仅能增产、防止农作物病虫害，并且能被日光和微生物降解,是目前深受人们喜爱的“绿色农药”。这种农药的降解产物还可促进农作物对微量元素的吸收利用,增加产量,改善作物的品质[7]。

国内对 L-亮氨酸的需求拉动了 L-亮氨酸的生产。但目前国内大多采用毛发水解来生产 L-亮氨酸,环境污染严重。国内发酵法生产 L-亮氨酸研究起步较晚,技术落后,与日本等发达国家相比亮氨酸发酵的整体水平相比尚有一定的差距。因此,迫切要求选育 L-亮氨酸高产菌株，提高发酵产酸水平、糖酸转化率和提取收率,降低生产成本,提高与国际市场的竞争力。

作者围绕 L-亮氨酸的生产方法、亮氨酸的生物合成途径及调控机制以及 L-亮氨酸产生菌的育种研究等 3 个方面综述了微生物法生产 L-亮氨酸的研究现状及应用前景。

1 亮氨酸的生产方法

L-亮氨酸的生产方法有提取法、化学合成法、酶法、微生物发酵法等。

1.1 提取法

L-亮氨酸在蛋白质中的含量相对较多,比如干酪素、人发、角蛋白、血色素等。在酸性条件下将蛋白质水解,用碱中和使亮氨酸沉淀,然后用 β-萘矾酸使沉淀结晶。最后用离子交换法、层析法分离亮氨酸[8]。国内仍有一些工厂利用水解天然蛋白质分离提取亮氨酸,是因为提取法生产亮氨酸对设备和技术要求不高,但是利用这种方法得到的亮氨酸产品纯度不高,不能用于药品,同时还费时、污染严重、收率低、不适合大规模工业化生产。

1.2 化学合成法

化学合成法又分 Storeker 法、α-卤代酸法、相转移催化法等。Storeker 法是将异戊醛制成氰醇再制成氨基睛后水解,或将异戊醛先制成乙内酞尿衍生物后加压加热水解;α-卤代酸法是将异己酸在三氯化磷存在的情况下加入溴生成 α-溴异己酸,再与氨作用生成亮氨酸[9-10]。相转移催化法是利用活化氨基酸酯在 TEBA 和 50% NaOH 的二氯甲烷水浓液中与卤代烷反应合成亮氨酸[11]。

1.3 酶法

酶法是以异戊醛与乙酰胺为原料,借助于有机合成和生物化学工程相结合的合成方法合成 L-亮氨酸。利用异戊醛与乙酰胺为原料，在 $PdCl_2/PPh_3/LiBr/H_2SO_4$ 催化下，合成消旋的 N-乙酰基亮氨酸,然后经酰基转移酶(曲霉酰基转移酶和猪肾酰基转移酶）对应地水解得到 L-亮氨酸和 N-乙酰-D-亮氨酸[12-13]。此方法中酶的稳定性较差,易发生水解作用,产生许多不必要的副产物,导致 L-亮氨酸的产率低。

1.4 微生物发酵法

1967 年 Calvo [14] 经诱变鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*）得到一株抗 3-氟亮氨酸突变株,开始了微生物发酵法生产 L-亮氨酸。微生物发酵法是利用微生物菌体的生物合成和代谢作用,过量积累中间代谢产物的过程。包括微生物转化法和微生物直接发酵法。

1) 微生物转化法:又称添加前体发酵法。利用葡萄糖为发酵碳源、能源,再添加目的氨基酸的前体物,经特定微生物的代谢转化作用将该前体物有效地转化为目的氨基酸。如:1987 年德国学者 Groeger[15]采用分批流亮氨酸的前体物质 α-酮基异己酸 32 g/L，经谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 发酵 23 h,L-亮氨酸的产量达到 24 g/L,从 α-酮基异己酸到 L-亮氨酸的转化是经过转氨酶的催化生成的。

2) 微生物直接发酵法:利用微生物能自身合成 L-亮氨酸的能力,通过对原始菌株(通常用谷氨酸产生菌如黄色短杆菌、谷氨酸棒杆菌等)的诱变处理,选育出营养缺陷型及氨基酸结构类似物抗性突变株，以解除代谢调节中的反馈抑制或阻遏作用,达到过量积累 L-亮氨酸的目的。以微生物直接发酵法生产 L-亮氨酸,在国外(如日本)已形成一定规模的工业生产能力。主要的生产菌株有:粘质赛氏杆菌 (*Serratea marcesoens*)、乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)、天津短杆菌(*Brevibacterium tianjinese*)、黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)等。

2 L-亮氨酸的生物合成途径及调控机制

图 1 描述了大肠杆菌中 L-亮氨酸的生物合成

途径、代谢调控及运输机制。在大肠杆菌中亮氨酸的生物合成过程中的酶系受到两个主要的操纵子调控,分别为 *ilv* 操纵子和 *leu* 操纵子,*ilv* 操纵子中的 DACB 基因编码合成三种支链氨基酸共用的 3 个多功能酶。从 α-酮基异戊酸合成亮氨酸的酶是由 *leu* 操纵子中的 DCBA 基因编码:*leuA* 基因编码 α-异丙基苹果酸合成酶,*leuB* 基因编码 β-异丙基苹果酸脱氢酶,*leuCD* 基因编码 α-异丙基苹果酸异构酶。

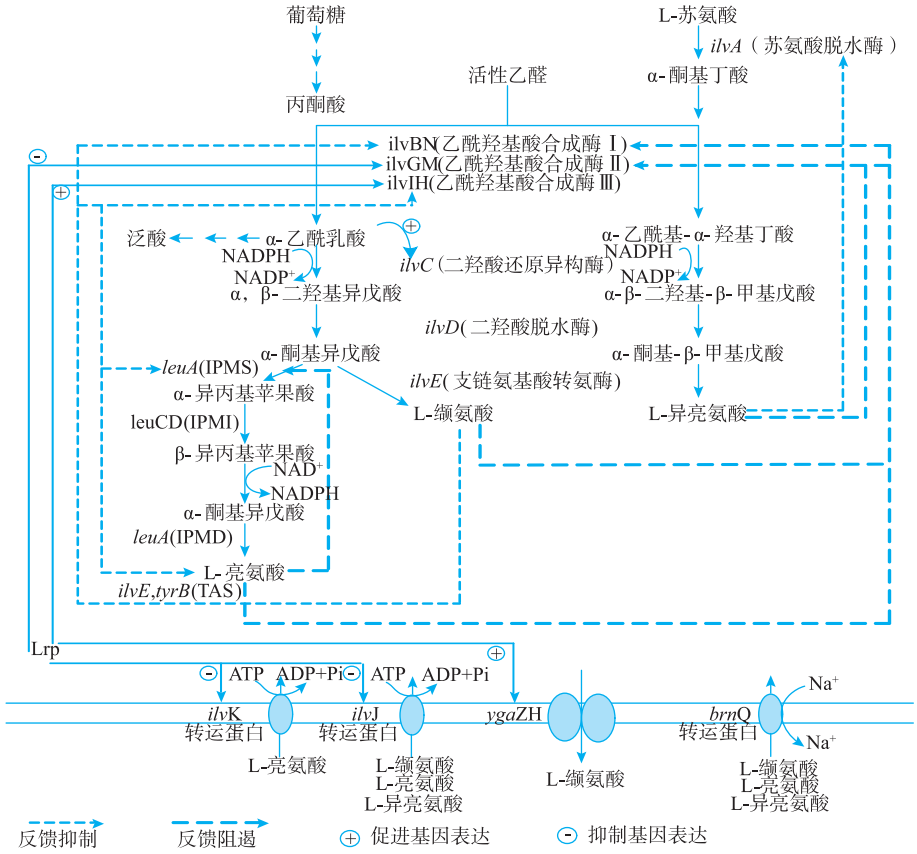


图 1　大肠杆菌中 L-亮氨酸的生物合成途径及其调控机制

Fig. 1　L-leucine biosynthesis pathways and regulatory mechanisms in *Escherichia coli*

2.1　L-亮氨酸生物合成过程中的酶

2.1.1　乙酰羟基酸合成酶(AHAS)　葡萄糖经糖酵解途径形成丙酮酸，丙酮酸在乙酰羟基酸合成酶(Acetohydroxy acid synthase,AHAS)的催化下与来源于丙酮酸的活性乙醛缩合形成 α-乙酰乳酸，AHAS 是亮氨酸生物合成中第一个酶，也是由丙酮酸合成 α-酮基异戊酸的限速酶。在大肠杆菌中乙酰羟基酸合成酶由三个酶组成,即 AHAS Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ，分别由基因 *ilvBN*、*ilvGM*、*ilvIH* 编码合成[16];但是在谷氨酸棒杆菌中乙酰羟基酸合成酶只有 AHAS Ⅰ一种，由基因 *ilvBN* 编码合成，在谷氨酸棒杆菌中 AHAS 为四聚体，由相同的两个大亚基和小亚基构成。除了大肠杆菌,大部分的原核生物的胞内只有一种 AHAS。AHAS 主要受 L-缬氨酸的反馈抑制和反馈阻遏，同时也受到 L-亮氨酸及 L-异亮氨酸的反馈抑制。要想获得亮氨酸高产菌株就要解除或弱化末端代谢产物对 AHAS 的抑制和阻遏。Hou[17]等人将 AHAS 小亚基别构中心的 3 个氨基酸 Gly-Ile-Ile(20-22 位)定点突变成相应的 Asp-Asp-Phe,能够完全解除三种支链氨基酸对 AHAS 的反馈抑制作用。Chen[18]等通过过量表达黄色短杆菌 *ilvBN* 基因,将 L-缬氨酸的产量提高了 9.85%,而丙氨酸和乙酸的产量分别降低了 30.49% 和 20.89%。Takayasut [19] 等通过选育乙酰羟基酸合成酶对亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸都脱敏的突变株将 L-亮氨酸的产量提高到 34 g/L。

2.1.2　二羟酸还原异构酶(AHAIR)　二羟酸还原异构酶(Acetohydroxy acid isomeroreductase,

AHAIR)是亮氨酸生物合成途径中第二个酶,也叫乙酰羟酸还原异构酶,由 *ilvC* 基因编码,催化 α-乙酰乳酸的甲基自动移位形成 α,β-二羟基异戊酸。AHAIR 是由两个单体组成的同源二聚体,每个单体分子含有一个 NADPH 的结合位点,由大小为 53 000 的同种亚基组成,与支链氨基酸生物合成途径中的其它酶一样,也存在多种形式。AHAIR 催化的反应中,需要 NADPH 和二价金属离子作辅助因子。AHAIR 要求底物有特定的立体异构构象,如 2S 构型的 α-乙酰乳酸和 α-乙酰-α-羟基丁酸,它们的双元醇产物分别是 2R 和 2R、3R 构象,还原反应中 NADPH 的原子发生了转移[20-22]。Primareno[23]等研究发现,在支链氨基酸生物合成过程中两个乙酰羟酸底物 α-乙酰乳酸和 α-乙酰-α-羟基丁酸,竞争酶的同一位点。在二价金属辅因子和 NADPH 同时存在的时候,AHAIR 也可有效地催化酮泛解酸的还原反应。

2.1.3 二羟酸脱水酶(DHAD) 二羟酸脱水酶(Dlhydroxy acid dehydratase,DHAD),也叫乙酰羟酸脱水酶,由基因 *ilvD* 编码,是由两个亚基组成的二聚体酶,是亮氨酸生物合成第三个酶,催化 α,β-二羟基异戊酸脱水形成 L-缬氨酸相应酮酸-α-酮基异戊酸,α-酮基异戊酸是亮氨酸生物合成的关键的间接前体物,又是缬氨酸合成的直接的前体物。在谷氨酸棒状杆菌中,DHAD 会受到 L-缬氨酸和 L-亮氨酸抑制,当亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸都存在的情况下,不会对 DHAD 存在协同反馈抑制[24]。DHAD 在宿主中表达需要 Fe-S 簇,Fe-S 簇以 [4Fe-4S]或[2Fe-2S]的形式存在,细菌的 DHAD 大都以[4Fe-4S]的形式存在,迄今惟一报道以[2Fe-2S]的形式存在的 DHAD 是一种菠菜酶[25]。

2.1.4 α-异丙基苹果酸合成酶(IPMS) α-异丙基苹果酸合成酶(2-isopropylmalate synthase,IPMS)是亮氨酸生物合成过程中真正意义上的限速酶,由基因 *leuA* 编码。IPMS 是微生物亮氨酸和缬氨酸合成途径中起催化作用的关键酶,同时 IPMS 不仅催化 α-酮异戊酸接受乙酰-CoA 的乙酰基形成 α-异丙基苹果酸,并且 α-酮基丁酸也是它的催化底物。在亮氨酸生物合成过程中,IPMS 受到亮氨酸的反馈抑制和阻遏,因此设法解除或者弱化亮氨酸对 IPMS 的抑制作用,提高 IPMS 的产量和活力,是提高亮氨酸产量的关键性因素。α-异丙基苹果酸合成酶对 α-酮基异戊酸的亲和力比支链氨基酸转氨酶对 α-酮基异戊酸的亲和力高约 10 倍,因此亮氨酸的合成优于缬氨酸。

2.1.5 α-异丙基苹果酸异构酶(IPMI)和 α-异丙基苹果酸脱氢酶(IPMD) α-异丙基苹果酸异构酶(Isopropylmalate isomerase,IPMI)催化 α-异丙基苹果酸合成 β-异丙基苹果酸,IPMI 由基因 *leuCD* 编码合成。α-异丙基苹果酸脱氢酶(3-isopropylmalate dehydrogenase,IPMD)是由基因 *leuB* 编码合成的,β-异丙基苹果酸在 IPMD 催化作用下形成 α-酮基异戊酸,在大肠杆菌中 IPMD 的催化需要辅因子 NAD^+的参与。

2.1.6 支链氨基酸转氨酶(TAS) 支链氨基酸转氨酶(Branched chain amino acid aminotransferase,TAS)是催化 L-亮氨酸生物合成中的最后一个酶,催化 α-酮基异戊酸最终合成 L-亮氨酸,而且 TAS 对 L-亮氨酸的合成以及亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸之间的相互转化起关键性作用。在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中支链氨基酸转氨酶可以由基因 *ilvE* 和 *tyrB* 分别编码转氨酶 B、芳香族氨基酸转氨酶。但是,在大肠杆菌中 L-亮氨酸的生物合成主要由基因 *ilvE* 编码的转氨酶 B 催化;芳香族氨基酸转氨酶可以有效地催化 L-亮氨酸的合成,但其主要催化芳香族氨基酸间的转氨作用[26]。Marienhagen[27]等发现谷氨酸棒杆菌中转氨酶 *alaT* 和转氨酶 *avtA* 分别催化不同的专一性底物。支链氨基酸转氨酶系受到亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸三种支链氨基酸的协同阻遏作用。

2.1.7 苏氨酸脱水酶(TD) 苏氨酸脱水酶(Threonlne dehydratase,TD)由基因 *ilvA* 编码合成,受到异亮氨酸的反馈抑制。乙酰羟基酸合成酶受到亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸协同反馈抑制,想要解除抑制就要构建异亮氨酸和(或)缬氨酸营养缺陷型菌株。欲构建缬氨酸营养缺陷型菌株,切断 α-酮基异戊酸合成 L-缬氨酸的代谢途径是不可能的,因为催化合成三种支链氨基酸的的转氨酶是同一个酶。所以只能构建 L-异亮氨酸缺陷型菌株。然而,乙酰羟基酸合成酶对 α-酮基丁酸的亲和力比对丙酮酸的高,所以只能在合成 α-酮基丁酸之前切断代谢途径[1]。这就要敲除编码苏氨酸脱水酶的基因,阻止代谢流向 α-酮基丁酸。谢希贤[29]等通过敲除谷氨酸棒杆菌中编码苏氨酸脱水酶的基因 *ilvA* 将 L-亮氨

酸的产量提高了 8.4%。同时有必要切断高丝氨酸向 L-蛋氨酸合成的方向，选育蛋氨酸营养缺陷型菌株进一步提高亮氨酸的产量。

2.2 L-亮氨酸运输机制的调控

氨基酸的运输机制也是限制 L-亮氨酸产量提高的重要因素。Kennerknecht[29]等人报道在谷氨酸棒杆菌中，brnFE 基因可以编码双组分透性酶将支链氨基酸运输到胞外。Tabolina[30]等在大肠杆菌中发现相同功能的基因 *ygaZH* 编码酶来运输支链氨基酸。为了进一步提高 L-亮氨酸的产量，过量表达运输 L-亮氨酸的基因和敲除吸收 L-亮氨酸的基因，成为构建亮氨酸高产菌株另一种重要的方法。如：Park[31] 等人报道，通过在大肠杆菌中过量表达 *ygaZH* 基因将 L-缬氨酸的产量提高了 47.1%。最近，Kutukova [32] 等人已证实，在大肠杆菌中 *yeaS*（*leuE*）基因和 L-亮氨酸的运输有关。通过过量表达 *yeaS*（*leuE*）基因可以提高胞外 L-亮氨酸的产量。在谷氨酸棒杆菌中过量表达 *brnFE* 基因也可能提高 L-亮氨酸的产量。基因 *livK*（*E.coli*）和基因 *brnQ* 和 L-亮氨酸的吸收有关，通过敲除或者弱化这些基因减少菌株对亮氨酸的吸收来提高亮氨酸的产量。然而，基因 *livK*（*E.coli*）还与编码 L-亮氨酸特定的转运子有关，基因 *brnQ* 同样与异亮氨酸和缬氨酸消耗有关。如果完全敲除基因 *brnQ* 后，生产菌株的生长可能会受到限制，生长缓慢。因此，可以通过过量表达 *yeaS*（*leuE*）基因促进胞内亮氨酸分泌到胞外，弱化基因 *brnQ* 来减少菌株对亮氨酸的吸收，从而达到提高亮氨酸产量的目的。

2.3 Lrp 的调控

在大肠杆菌中亮氨酸响应蛋白（Leucine responsive protein，Lrp）参与调控亮氨酸的生物合成。Lrp 可以促进基因 *ilvIH* 编码乙酰羟基酸合成酶Ⅲ的表达[33-34]，并且抑制 *ilvGMEDA* 操纵子调控乙酰羟基酸合成酶Ⅱ的表达[35]。此外，外源的亮氨酸会抑制 Lrp 促进 *ilvIH* 操纵子和某些亮氨酸调控基因的表达。Haney[36]发现，Lrp 会抑制编码亮基酸转运蛋白的基因 *livK* 和编码缬氨酸转运蛋白的基因 *livK* 的表达。Kutukova [32] 等发现 Lrp 会抑制基因 *leuE*（*yeaS*）编码亮氨酸转运蛋白，但亮氨酸可以通过解除的 Lrp 抑制作用来激活基因 *leuE*（*yeaS*）的表达。Hung[37]等发现在敲除 *lrp* 基因的 *E. coli* K-12 中基因 *ilvG* 和 *ilvM* 的表达量分别增加了 2.17 和 3.07 倍，并且基因 *livJ* 增加至 2.32 倍。Kennerknecht[29]等发现在谷氨酸棒杆菌中 Lrp 能促进基因 *brnFE* 的表达，基因 *brnFE* 与编码亮氨酸转运蛋白有关。因此，在大肠杆菌中我们可以敲除 *lrp* 基因，解除亮氨酸响应蛋白对基因 *ilvGM* 和 *ilvK* 的抑制作用，促进乙酰羟基酸合成酶Ⅱ和亮氨酸转运子的合成；在谷氨酸棒杆菌中可以过量表达 *lrp* 基因，促进基因 *brnFE* 编码亮氨酸转运子，提高胞外亮氨酸的浓度。所以可以通过调控 *lrp* 基因来构建 L-亮氨酸高产菌株。

3 国内外 L-亮氨酸菌种选育发展的现状

目前国内外选育 L-亮氨酸高产菌株的方法包括传统诱变、代谢工程调控，基因工程技术以及细胞重组技术等。L-亮氨酸菌种选育的思路[38]主要有：1）解除三种支链氨基酸对生物合成途径上的乙酰羟基酸合成酶等 3 个共用酶的协同反馈阻遏作用；2）解除 L-缬氨酸对乙酰羟基酸合成酶的反馈抑制作用；3）解除 L-亮氨酸对 α-异丙基苹果酸合成酶的反馈抑制和阻遏作用。如通过使菌体带上 L-亮氨酸和 L-缬氨酸结构类似物抗性标记（如：2-AT^{r}α-AB^{r}β-HL^{r}LeuHx^r 等遗传标记）来实现。4）改变菌体的正常代谢，使像氨基酸这类的代谢产物大量的积累。这可通过使菌体带上某些药物类（如：SG^r 等遗传标记）或抗生素类抗性标记（如：Rif^r 等遗传标记）来实现。

3.1 利用物理、化学诱变技术传统育种的研究现状

自 1967 年 Calvo [14] 经诱变鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）得到一株抗 3-氟亮氨酸突变株以来，通过物理、化学诱变技术选育亮氨酸高产菌株取得快速的发展。相比基因工程和代谢工程育种技术，传统的诱变技术作简单，技术要求低，选育的菌种稳定性好、不会出现基因组丢失的现象，所以仍有部分菌种选育工作者仍偏爱传统的诱变技术。

Ksiumi[39]等由粘质赛氏杆菌异亮氨酸缺陷型菌株选育 α-氨基丁酸（α-AB^r）抗性时，意外获得异亮氨酸缺陷的回复突变株，可发酵积累 L-亮氨酸 10~13.5 g/L。Tsuchida[40]等以乳糖发酵短杆菌 2256 为出发菌株，经 NTG 诱变处理，选育出 β-羟基亮氨酸抗性菌株，解除了亮氨酸对乙酰羟基酸合成酶的反馈抑制，在 130 g/L 葡萄糖的培养基中发酵 72 h 后，亮氨酸产量可达 34 g/L。刘党生[41]等以天津短杆菌

(*Brevibacterium tianjinese*)T6-13 为出发菌株,采用紫外线进行诱变处理, 筛选 α-氨基 β-羟基戊酸和利福平抗性突变株,获得一株 L-亮氨酸产生菌 No.143,L-亮氨酸摇瓶产量可达 32.1 g/L。在 16 L 发酵罐中培养 60 h,L-亮氨酸产量可以达 21.8 g/L。Gusyatiner[42]等以亮氨酸产生菌 *E. coli* K12 为出发菌株,经 NTG 诱变处理,获得 DL-氮亮氨酸抗性突变株,分析发现是 *leuA* 基因第 1435 位点发生 G→T 转换,60 g/L 葡萄糖摇瓶发酵 48 h 亮氨酸产量可达 5.2 g/L。马春玲[43]以 *Brevibacterium flavum* SFL-8 为出发菌株,通过紫外线、盐酸羟胺、DES 和 LiCl 进行多次单独和复合诱变处理,采用利福平抗性平板筛选和摇瓶发酵筛选相结合的方法,获得一株蛋氨酸和异亮氨酸双缺陷型菌株 *B.Flavum*DL-2(Met$^-$Ile$^-$),摇瓶发酵 L-亮氨酸产量为 18.5 g/L。陈宁[2]等以黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)HL41 (CICC 10135)为出发菌株,通过 DES 和紫外诱变处理,经摇管初筛、摇瓶复筛、遗传标记验证、单菌落分离和连续传代,筛选出一株亮氨酸生产菌株 TK0303,发酵 60 h 可产亮氨酸 36 g/L。

3.2 利用基因工程技术育种的现状

利用基因工程手段育种,主要是通过基因工程技术过量表达亮氨酸生物合成过程中关键的限速酶,解除或者弱化末端代谢产物对合成过程中酶的反馈抑制或阻遏;通过敲除支路代谢合成中酶的基因,切断支路代谢,改变代谢流向,提高目的产物的产量。

Gusyatiner [44] 等以 *E.coli* K12 为出发菌株,经 NTG 诱变处理后获得异亮氨酸和缬氨酸双重缺陷型菌株 *E. coli* K12 505, 然后把重组质粒 pACYC-*tyrB* 通过转化导入到 *E.coli* K12 505 中, 使编码支链氨基酸转氨酶的 *ilvE* 基因失活,增强编码芳香族氨基酸转氨酶 *tyrB* 基因的能力, 亮氨酸的产量为 2.7 g/L。Katashkina [45] 等将 *E.coli* 21 人工弱化的 *sucAB* 基因 (编码 α-酮戊二酸脱氢酶) 的启动子 Ptac-21 转导至 L-亮氨酸生产菌 *E.coli* 57 中,减弱 α-酮戊二酸脱氢酶的酶活力, 减少了 TCA 循环中乙酰辅酶 A 的消耗,乙酰辅酶 A 是亮氨酸合成的间接前体物;然后通过转导将 *E. coli* C600 的 *leu*$^-$基因转导至 *E.coli* 57 的染色体中获得亮氨酸营养缺陷型菌株 *E. coli* 57 *leu*$^-$, 接着将 *E. coli* 55 的 *leuA*BCD* 基因转导至 *E.coli* 57 *leu*$^-$获得 *E. coli* 57*leuA**, 解除了亮氨酸对 α-异丙基苹果酸合酶反馈抑制作用; 最后通过转化将重组质粒 pACYC-*tyrB* 导入 *E. coli* 57 *leuA** 细胞中,最后得到 *E. coli* 57 *sucleuA*ilvE*/pACYC-*tyrB*,亮氨酸的产量从原先的 1.5~1.7 g/L 提升到 11.4 g/L。谢希贤[28]等通过敲除谷氨酸棒杆菌 GTL8207 中编码苏氨酸脱氢酶的基因 *ilvA*,通过补料分批发酵将 L-亮氨酸的产量从 43.8 g/L 提高到 47.5 g/L。张跃[46]等将黄色短杆菌 ATCC14067 的 *ilvBNC* 基因和 *leuA* 基因导入到模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 中, 构建基因工程菌 *C. glutamicum* ATCC13032/pDXW-8-*leuA*-*ilvBNC*,摇瓶发酵 72 h 后亮氨酸产量为 4.75 g/L。

4 展 望

随着畜牧业、食品和医药工业的快速发展,我国对亮氨酸的需求也会越来越大。因此,不断选育和改造现有菌种,通过代谢工程、基因组改组、系统代谢工程、全局转录机器工程等新型的技术加速选育亮氨酸高产菌株,同时优化发酵工艺,扩大亮氨酸生产规模, 加快下游 L-亮氨酸的分离技术的更新,提高亮氨酸纯度,提高经济效益,扩大市场空间和提高国际市场竞争力。

参考文献:

[1] 邵继智. 支链氨基酸的生化与营养[J]. 氨基酸杂志,1990,2:23-35.
SHAO Jizhi. Branched-chain amino acid biochemistry and nutrition [J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,1990,2:23-35.(in Chinese)

[2] 陈宁,江浩,寇广会,等. 氨基酸工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:353-354.

[3] 刘兴荣,刘培漫,郭秀英,等. L-亮氨酸 Schiff 碱 Cu(Ⅱ)、Ni(Ⅱ)配合物的合成及抑菌活性[J]. 氨基酸和生物资源,1995,5(1):l-2.
LIU Xingrong,LIU Peiman,GUO Xiuying,et a1. The synthesis,characterization and antibacterial activity of the complexes of Cu(Ⅱ),Ni(Ⅱ) and schiff base L-leucin[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,1995,17(1):l-2.(in Chinese)

[4] 刘兴荣,赵莉,刘培漫,等. L-亮氨酸 Shciff 碱 Zn(Ⅱ)配合物的合成及抑菌活性[J]. 氨基酸杂志,1994,2:9-11.
LIU Xingrong,ZHAO Li,LIU Peiman,et a1. Study on the synthsis,characterization and antibacterial activity of the complexes of Zn(Ⅱ) and schiff base L-leucin[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,1994,2:9-11.(in Chinese)
[5] 王光斌. L-亮氨酸 Shciff 碱铜(Ⅱ)固体配合物的合成及抑菌活性研究[J]. 氨基酸和生物资源,1992,4:23-26.
WANG Guangbin. Study on the synthsis,characterization and antibacterial activity of the complexes of Cu (Ⅱ) and schiff base L-leucin[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,1992,4:23-26.(in Chinese)
[6] 黎植昌,刘炽清. 混合氨基酸稀土配合物的研究[J]. 稀土,1988,4:64-65.
LI Zhichang,LIU Zhiqing. Study on mixed rare earth complexes of amino acids[J]. **Rare Earth**,1988,4:64-65.(in Chinese)
[7] 刘建军,赵祥颖,田延军,等. L-亮氨酸的性质、生产及应用[J]. 山东食品发酵,2005,1:3-6.
LIU Jiangjun,ZHAO Xiangying,TIAN Yanjun,et a1. The properties,production and application of L-leucine [J]. **Shangdong Food Fermentation**,2005,1:3-6.(in Chinese)
[8] 俞长銮,莫尔品. 发展中的氨基酸工业[J]. 氨基酸杂志,1984(4):43-55.
YU Changluan,MO Erpin. The development of amino acid industry[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,1984(4):43-55.(in Chinese)
[9] 徐琪寿. 氨基酸的化学合成[J]. 氨基酸杂志,1983,4:17-24.
XU Qishou. The chemical synthesis of amino acids[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**,1983,4:17-24.(in Chinese)
[10] 罗国添,谭永忠. 氨基酸的化学合成[J]. 赣南师范学院学报,1995,1:95-102.
LUO Guotian,TAN Yongzhong. The chemical synthesis of amino acids [J]. **Journal of Gannan Teachers College**,1995,1:95-102.(in Chinese)
[11] 俞凌翀,梁惠标. 利用相转移催化烷基化合成 α-氨基酸[J]. 北京师范大学学报,1983,1:94-96.
YU Lingchong,LIANG Huibiao. Synthesis of α-amino acids by the alkylation of ethyl formylaminomalonate under two phase condions[J]. **Journal of Beijing Normal University**,1983,1:94-96.(in Chinese)
[12] 朱炜,杨可武,姜玄珍. 化学酶法合成光学纯亮氨酸[J]. 分子催化,2005,19(5):399-402.
ZHU Wei,YANG Kewu,JIANG Xuanzhen. Chemoenzymatic synthesis of enantian erically pure leucine [J]. **Journal of Molecular Catalysis**,2005,19(5):399-402.(in Chinese)
[13] Beller M,Eckert M,Geissler H,et al. Palladium-catalyzed reactions for fine chemical synthesis,part 6-efficient chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure alpha-amino acids[J]. **Chemistry-A European Journal**,1998,4(5):935-941.
[14] Calvo R A,Calvo J M. Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of *Salmonella typhimurium* [J]. **Science**,1967,156(3778):1107-1116.
[15] Groeger U,Sahm H. Microbial production of L-Ieucine from α-ketoisocaproate by *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,1987,25:352-356.
[16] Umbarger H E. Biosynthesis of the branched-chain amino acids[M]. Washington:ASM,1996:442-457.
[17] Hou X H,Ge X Y,Wu D,et a1.Improvement of L-valine production at high temperature in *Brevibacterium flavum* by overexpressing *ilvEBNC* genes[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**,2012,39(1):63-72.
[18] Chen N,Qin Y F,Xu Q Y,et a1. Effect of *ilvBN* overexpression on the metabolic flux distributions in *Brevibacterium flavum* XV0505[J]. **Advanced Materials Research**,2012,365(1):160-165.
[19] Takayasu Tsuchida,Haruo Momose. Improvement of an L-Leucine-producing mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256 by genetically desensitizing it to α-acetohydroxy acid synthetase[J]. **Applied and Enviromengtal Micronbiology**,1986,51:1024-1027.
[20] 胡廷章. 生物体中的乙酰羟酸还原异构酶[J]. 重庆三峡学院学报,2002,1(19):121-124.
HU Tingzhang. Acetohydroxy acid isomeroreductase in living body [J]. **Journal of Chongqing Three-Gorges University**,2002,1(19):121-124.(in Chinese)
[21] Dumas R. Isolation and kinetic properties of acetohydroxy acid isomeroreductase from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts overexpressed in *Escherichia*[J]. **Biochem J**,1992,288:865-874.
[22] Hawkes R R,Edwards L S. Biosynthesis of Branch Chain Amino Acids[M]. New York:VCH Publishers,1990:413-424.
[23] Primareno D A,Burns R O. Role of acetohydroxy acid isomeroreductase in biosynthesis of pantothenic acid in *Salmonella*

typhimurium[J]. **J Bacteriol**,1993,153:259-269.

[24] Leyval D,Uy D,Delaunay S,et al. Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of Biotechnology**,2003,104(1):41-252.

[25] 布特马斯先进生物燃料有限责任公司. 细菌的[2Fe-2S]二羟酸脱水酶的鉴定和用途[P]. 中国专利:CN102186973,2011-09-14.

[26] Powell J T,Morrison J F. Role of the *Escherichi coli* aromatic amino acid aminotranserase in leucine biosynthesis [J]. **J Bacteriol**,1978,136(1):1-4.

[27] Marienhagen J,Eggeling L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases *AlaT* and *AvtA* and impact on L-Valine production[J]. **Appl Environ Microbiol**,2008,74(24):7457-7462.

[28] 谢希贤,杜军,徐庆阳,等. 谷氨酸棒杆菌苏氨酸脱氨酶基因敲除及对 L-亮氨酸发酵的影响[J]. 中国食品学报,2010,10(2):40-45.
XIE Xixian,DU Jun,XU Qingyang. Knockout of threoine dehydratase gene in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on L-leucine fermentation[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2010,10(2):40-45.(in Chinese)

[29] 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**,2002,184:3947-3956.

[30] Tabolina E A,Rybak K V,Khourges E M,et al. Methods for producing L-amino acids using bacteria belonging to the genus *Escherichia*[P]. US Patent:2005/0239175,2010-04-25.

[31] Park J H,Lee K H,Kim T Y,et a1. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,2007,104:7797-7802.

[32] Kutukova E A,Livshits V A,Altman I P,et al. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine,and the Lrp protein regulates its expression[J]. **FEBS Lett**,2005,579:4629-4634.

[33] Platko J V,Willins D A,Calvo J M. The ilvIH operon *Escherichia coliis* positively regulated [J]. **J Bacteriol**,1990,172:4563-4570.

[34] Wang Q,Calvo J M. Lrp,a global regulatory protein of *Escherichia coli*,binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*[J]. **J Mol Biol**,1993,229:306-318.

[35] Rhee K Y,Parekh B S,Hatfield G W. Leucine-responsive regulatory protein-DNA interactions in the leader region of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*[J]. **J Biol Chem**,1993,271:26499-26507

[36] Haney S A,Plakto J V,Oxender D L,et al. Lrp,a leucine responsive protein,regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*[J]. **J Bacteriol**,1992,174:108-115.

[37] Hung S P,Baldi P,Hatfield G W. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of leucine responsive regulatory protein[J]. **J Biol Chem**,2002,277:40309-40323.

[40] 伍时华,方杰,陈宁. L-亮氨酸高产菌的代谢控制育种[J]. 生物技术通讯,2001,12(3):27-30.
WU Shihua,FANG Jie,CHEN Ning. Metabolic control breeding of L-leucine high-producing strain [J]. **Letters in Biotechnology**,2001,12(3):27-30.(in Chinese)

[41] 刘党生,来彩霞,李福德. 一株 L-亮氨酸产生菌的研究[J]. 沈阳药学院学报,1994,11(2):119-123.
LIU Dangsheng,LAI Caixia,LI Fude. A study on L-leucine fermentation [J]. **Journal of Shenyang College of Pharmacy**,1994,11(2):119-123.(in Chinese)

[42] Gusyatiner M M,Lunts M G. DNA coding for mutant isopropylmalate synthase L-leucine-producing microorganism and method for producing L-leucine[P]. US Patent:2002/6403342 B1,2002-06-11.

[43] 马春玲. 黄色短杆菌发酵生产 L-亮氨酸的研究[D]. 济南:山东轻工业学院,2004.

[44] Gusyatiner M M,Voroshilova E B. Method for producing L-leucine[P]. US Patent:2004/0091980 A1,2007-05-22.

[45] Katashkina J Y,Lunts M G. Method for producing an L-amino acid using a bacterium with an optimized level of gene expression [P]. US Patent:2006/0063240 A1,2009-10-20.

[46] 张跃,张伟国. L-亮氨酸生物合成关键酶基因的克隆和表达[J]. 食品工业科技,2013,34(11):170-173.
ZHANG Yue,ZHANG Weiguo. Cloning and expression of key enzymes genes in biosynthesisof L-leucine [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2013,34(11):170-173.(in Chinese)