

谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌生物合成L-甲硫氨酸的代谢工程改造研究进展

柳羽哲, 江泽沅, 高欣, 曾琦, 王钰盛, 刘晓婷, 闵伟红*
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 小麦和玉米深加工国家工程实验室, 吉林 长春 130118)

摘要: L-甲硫氨酸是生命体必需的唯一含硫氨基酸, 其作为前体参与合成多种生物活性物质, 并参与机体多种代谢, 被广泛应用于食品、动物饲料、药品、化妆品等领域。由于L-甲硫氨酸是唯一无法用微生物发酵法工业化生产的必需氨基酸, 近年来, 利用代谢工程提升L-甲硫氨酸产量受到国内外研究人员的普遍重视。本文主要分析并比较在谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌中L-甲硫氨酸的生物合成途径及代谢调控网络机制; 分别从解除代谢途径对关键酶的反馈作用、阻断或削弱支路代谢途径、中心代谢调控网络的优化、增强辅助因子的供应以及转运系统的优化这5个方面综述L-甲硫氨酸代谢工程改造策略, 总结L-甲硫氨酸的生物合成研究进展并作展望, 旨在为L-甲硫氨酸高产发酵菌株的选择提供依据。

关键词: L-甲硫氨酸; 代谢工程; 生物合成; 谷氨酸棒杆菌; 大肠杆菌

Recent Advances in L-Methionine Biosynthesis in Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*

LIU Yuzhe, JIANG Zeyuan, GAO Xin, ZENG Qi, WANG Yusheng, LIU Xiaoting, MIN Weihong*
(National Engineering Laboratory on Wheat and Corn Further Processing, College of Food Science and Engineering,
Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: L-Methionine is the only sulfur-containing essential amino acid. It acts as a precursor in the synthesis of various biologically active substances and participates in various metabolic pathways in the body. It is widely used in food, animal feed, medicine, cosmetics, and other fields. In recent years, since L-methionine is the only essential amino acid that cannot be industrially produced by microbial fermentation, the potential of metabolic engineering to improve L-methionine production has received widespread attention from researchers around the world. In this paper, the biosynthesis pathways and metabolic regulation mechanisms of L-methionine in *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* are analyzed and compared. The metabolic engineering strategies to produce L-methionine are reviewed from five aspects: the removal of feedback inhibition of key enzymes, the cut-off or weakening of branch metabolic pathways, the optimization of the central metabolic regulatory network, the enhancement of cofactor supply, and the optimization of transport systems, and recent progress in research on the biosynthesis of L-methionine is summarized. Finally, future prospects are also discussed. It is hoped that this review will provide a basis for the breeding of high-yield L-methionine-producing strains.

Keywords: L-methionine; metabolic engineering; biosynthesis; *Corynebacterium glutamicum*; *Escherichia coli*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220805-070

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)13-0226-09

引文格式:

柳羽哲, 江泽沅, 高欣, 等. 谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌生物合成L-甲硫氨酸的代谢工程改造研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(13): 226-234. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220805-070. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-08-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31771957); 长春市科技计划项目(17SS030);

“十四五”国家重点研发计划项目(2021YFD2101000; 2021YFD2101002)

第一作者简介: 柳羽哲(1999—)(ORCID: 0000-0003-4783-8604), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵微生物选育与代谢调控。

E-mail: bass808lyz@163.com

*通信作者简介: 闵伟红(1971—)(ORCID: 0000-0002-6093-2104), 女, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程、粮油科学与深加工技术。E-mail: minwh2000@vip.163.com

LIU Yuzhe, JIANG Zeyuan, GAO Xin, et al. Recent advances in *L*-methionine biosynthesis in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2023, 44(13): 226-234. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20220805-070. <http://www.spkx.net.cn>

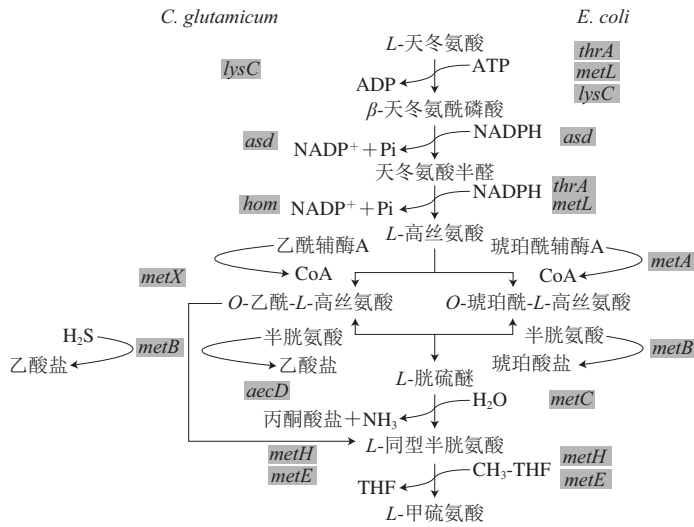
L-甲硫氨酸又称*L*-蛋氨酸, 于1923年被Mueller在分离酪蛋白过程中发现^[1], 与*L*-赖氨酸、*L*-苏氨酸及*L*-异亮氨酸同属天冬氨酸族氨基酸是生命体必需的唯一含硫氨基酸^[2]。在生物体内*L*-甲硫氨酸具备重要生理生化功能, 在DNA、蛋白质合成、催化功能调节和蛋白质翻译后修饰等过程中发挥着不可或缺的作用^[3]; 作为合成前体和体内代谢中间体发挥重要作用, 参与乙烯和多胺类物质合成, 并参与细胞生长发育过程^[4]; 还可以经过其代谢物*S*-腺苷甲硫氨酸 (*S*-adenosyl methionine, SAM) 间接调节多种代谢过程, 如作为甲基供体参与核酸、磷脂、蛋白质、肾上腺素、褪黑素、肌酸和其他化合物的代谢合成^[5]。*L*-甲硫氨酸的生产方法主要包括化学合成法、生物酶拆分法、微生物发酵法^[6-7]。目前, 工业化生产*L*-甲硫氨酸的主要方式为化学合成法——丙烯醛法^[8], 但该方法产物为*DL*-混合型甲硫氨酸, 存在分离困难、生产成本低、反应复杂、副产物多以及工业污染较严重的问题。酶拆分法生产*L*-甲硫氨酸所需底物较为昂贵, 产生污染排放较大, 不适合商业化生产。利用微生物发酵生产*L*-甲硫氨酸具有原料来源广、环境友好且生产成本低等优点^[9], 目前随着代谢工程策略及合成生物学工具的开发, 微生物发酵法生产*L*-甲硫氨酸外的其他天冬氨酸族氨基酸已实现工业化^[2,10]。由于*L*-甲硫氨酸合成途径存在复杂的反应及多级调控机制, *L*-甲硫氨酸尚未实现大规模的发酵生产。研究人员及生产商将研究目标投向探究微生物发酵法替代化学合成法工业生产*L*-甲硫氨酸的可能性。获得*L*-甲硫氨酸菌株的传统方式是利用诱变筛选或基于代谢控制发酵原理构建, 但通过诱变获得的菌株在工业化发酵生产过程中容易出现发酵状态不稳定、菌体营养缺陷、生产水平低等问题^[11]。近年来, 随着代谢工程研究的深入, 通过代谢工程优化通量并最终优化生物过程, 在选育氨基酸生产菌株方面应用愈发丰富, 代谢工程育种已成为诱变育种的有效替代策略。在氨基酸生产代谢工程改造过程中谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等模式微生物已成为主要宿主^[12-13]。本文对*L*-甲硫氨酸在*C. glutamicum*和*E. coli*中的生物代谢合成途径及调控网络机制、*L*-甲硫氨酸代谢工程改造策略的研究进展进行综述, 旨在为*L*-甲硫氨酸代谢工程的进一步探究提供理论依据。

1 *L*-甲硫氨酸的生物合成途径及代谢网络调控机制

1.1 *L*-甲硫氨酸生物合成途径

L-甲硫氨酸的生物合成途径包括两个部分: 中心代谢途径和天冬氨酸族氨基酸共同途径^[14]。在中心代谢过程中, 葡萄糖首先经糖酵解途径和戊糖磷酸途径生成磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸, 随后在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphopyruvate carboxylase, PEPC) 和丙酮酸羧化酶作用下羧化生成草酰乙酸, 在天冬氨酸氨基转移酶作用下生成*L*-天冬氨酸。随后*L*-天冬氨酸进入天冬氨酸族氨基酸共同途径, 在天冬氨酸激酶 (aspartokinase, AK) 作用下*L*-天冬氨酸生成磷酸天冬酰胺, 磷酸天冬酰胺在天冬氨酸半醛脱氢酶 (aspartate semialdehyde dehydrogenase, ASD) 催化下生成天冬氨酸半醛, 天冬氨酸半醛随后进入两个途径——*L*-赖氨酸合成途径以及*L*-甲硫氨酸及*L*-苏氨酸合成途径。在高丝氨酸脱氢酶 (homoserine dehydrogenase, HSD) 催化下天冬氨酸半醛生成*L*-高丝氨酸, 进入*L*-甲硫氨酸的分支代谢途径。在*L*-甲硫氨酸生物合成的第一个特异性反应中, 首先*L*-高丝氨酸的 γ -羟基被激活, 在*C. glutamicum*和*E. coli*中分别以乙酰辅酶A和琥珀酰辅酶A作为酰基底物用于这一激活步骤。*C. glutamicum*中通过高丝氨酸乙酰转移酶 (homoserine acetyltransferase, HAT) 完成高丝氨酸的酰基化, 生成的中间代谢产物为*O*-乙酰-*L*-高丝氨酸, 对于硫的同化有两条途径可供选择, 可以半胱氨酸作为硫的供体, 或以硫化氢为硫的供体, 前者在胱硫醚 γ 合成酶和胱硫醚 β 裂解酶催化下生成胱硫醚和高半胱氨酸, 后者在*O*-乙酰-*L*-高丝氨酸硫化酶作用下直接合成高半胱氨酸^[15]。*E. coli*中高丝氨酸琥珀酰转移酶 (homoserine transsuccinylase, HTS) 催化琥珀酰辅酶A和高丝氨酸缩合反应合成*O*-琥珀酰高丝氨酸。*E. coli*中只有一条硫化途径, 是以半胱氨酸为硫源, 琥珀酰高丝氨酸和半胱氨酸在琥珀酰高丝氨酸裂解酶 (succinyl homoserine lyase, SHL) 的作用下生成胱硫醚, 胱硫醚在胱硫醚裂解酶作用下生成高半胱氨酸。*L*-甲硫氨酸生物合成的最后一步是分别由VB₁₂依赖型甲硫氨酸合成酶 (methionine synthase, MS) 和VB₁₂非依赖型MS催化完成, 前者以叶酸循环途径产生的5-甲基-四氢叶酸为甲基供体, 后者以丝氨酸分解代谢产生的5-甲基-四氢咪喃为甲基供体,

为高半胱氨酸提供甲基从而合成L-甲硫氨酸，具体合成途径如图1所示。



NADPH.还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ; NADP⁺.氧化型NADP。

图1 L-甲硫氨酸生物合成途径

Fig. 1 L-Methionine biosynthesis pathway

1.2 L-甲硫氨酸代谢网络调控机制

L-甲硫氨酸生物合成途径在*C. glutamicum*和*E. coli*中生物合成中间体和调节机制存在异同。在*E. coli*中，PEPC受到更复杂的激活和抑制作用，包括苹果酸和天冬氨酸的反馈抑制作用。相比而言，*C. glutamicum*中PEPC在磷酸烯醇式丙酮酸到草酰乙酸的回补反应中发挥作用，但天冬氨酸对该酶并无调控作用^[16]。

在天冬氨酸族氨基酸共同途径中，AK作为关键限速酶，在*E. coli*中包含同工酶AKI、AKII和AKIII 3种，分别由lysC、thrA和metL基因编码，受L-赖氨酸、L-苏氨酸及产物L-甲硫氨酸的反馈调节^[9]，3个基因均在转录水平上受到调控，但只有lysC和thrA相关酶受其代谢途径L-赖氨酸和L-苏氨酸的反馈控制。在*C. glutamicum*中，仅含有1种AK，由lysC基因编码，受到分支途径L-赖氨酸和L-苏氨酸的协同反馈抑制^[17]。ASD由asd基因编码，在*E. coli*中其受到L-赖氨酸、L-苏氨酸及L-甲硫氨酸的反馈阻遏，但在*C. glutamicum*中该酶不受终产物的抑制。HSD是天冬氨酸族氨基酸共同途径的第二个关键酶，在*E. coli*中含有两个同型多功能酶AKI-HSDI和AKII-HSDII，分别由thrA和metL基因编码，其活性受苏氨酸的抑制^[18]。在*C. glutamicum*中HSD是一种单功能酶，由hom基因编码，其表达受到产物L-甲硫氨酸反馈阻遏，由于其结构C-末端ACT结构域的存在，对L-苏氨酸的反馈抑制较为敏感^[19]。在*E. coli*中HTS由metA基因编码，在*C. glutamicum*中HAT由metX基因编码，表达及活性均受产物L-甲硫氨酸和代谢物SAM所抑制。VB₁₂依赖型MS和VB₁₂非依赖型MS

分别由metH基因编码和metE基因编码^[20]。SAM是在S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase, SAMS)催化下由L-甲硫氨酸和ATP反应生成，在*C. glutamicum*和*E. coli*中SAMS由metK基因编码，其合成受L-甲硫氨酸反馈抑制^[21]。*C. glutamicum*和*E. coli*中L-甲硫氨酸合成途径的具体反馈调节信息如图2、3所示。

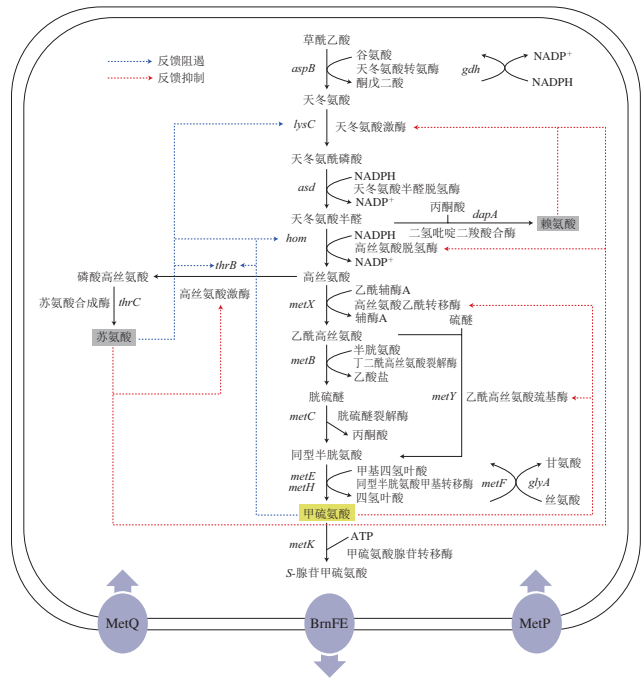


图2 C. glutamicum中L-甲硫氨酸反馈调节

Fig. 2 Feedback regulation of L-methionine in *C. glutamicum*

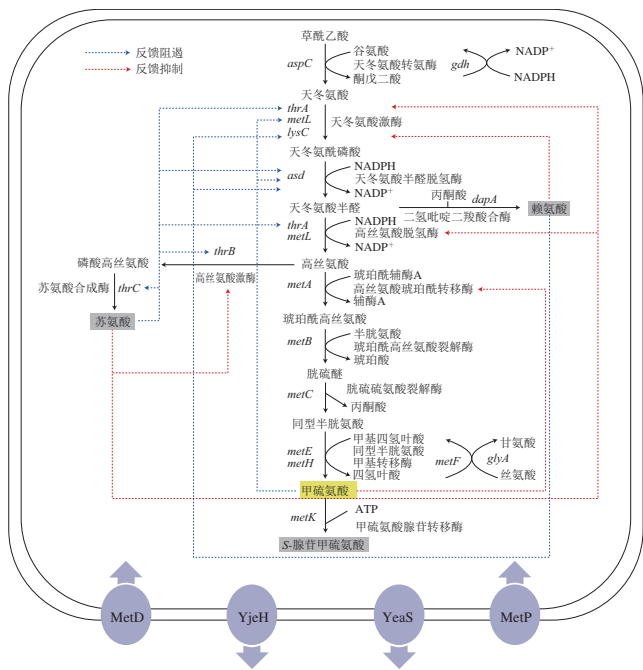


图3 E. coli中L-甲硫氨酸反馈调节

Fig. 3 Feedback regulation of L-methionine in *E. coli*

L-甲硫氨酸生产菌经代谢工程生物合成途径改造后,胞内氨基酸过量积累会使其代谢途径中一些关键酶的催化活性受到抑制,降解途径中的前体利用率增加,导致菌株生长受影响^[22]。通过随机突变或基因组DNA文库的表型筛选、转录组学分析和序列相似性搜索技术可以确认*L*-甲硫氨酸的转运蛋白,对其合理利用可调节*L*-甲硫氨酸的摄入和输出^[23]。在*E. coli*中,存在MetD和MetP两条专一性*L*-甲硫氨酸的胞内运输系统。MetD操纵子包含*metN*、*metI*、*metQ*,分别编码腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ABC转运蛋白元件)——ATP酶、*L*-甲硫氨酸渗透酶和*L*-甲硫氨酸结合蛋白, MetD能够运输甲硫氨酸及其结构类似物^[24]。*E. coli*中向胞外运输甲硫氨酸存在YeaS和YjeH两个系统。YeaS属于RhtB运输蛋白家族,其表达受亮氨酸调控蛋白Lrps的调节。YjeH属氨基酸-多胺-胆碱运输蛋白家族,类似于YeaS转运系统的作用机制,通过增强*E. coli*对*L*-甲硫氨酸及其结构类似物的抵抗能力,促进菌体内多余*L*-甲硫氨酸的主动排出,从而降低胞内*L*-甲硫氨酸的浓度^[25]。*E. coli*中MetJ是*L*-甲硫氨酸合成的重要阻遏蛋白,可抑制*metL*、*metA*、*metB*、*metC*和*metE*基因的表达。与MetJ不同, MetR是一类转录激活因子,过表达后可有效促进*L*-甲硫氨酸的合成。在*C. glutamicum*中BrnFE系统可催化*L*-甲硫氨酸的主动输出^[26]。*C. glutamicum*对*L*-甲硫氨酸的吸收包括两个转运蛋白复合体MetD和MetP,调控*L*-甲硫氨酸由胞内向胞外的转运,其中MetD由*metN*、*metI*和*metQ*组成的基因簇编码,属于ABC转运蛋白超家族MUT亚家族,其表达受转录因子*mcbR*调控; MetP由*metP*和*metS*基因编码,属于钠离子能量偶联转运体家族,其表达形式为组成型表达^[27]。

2 *L*-甲硫氨酸合成途径代谢工程改造

根据代谢工程改造菌株提高目标氨基酸产量的“进、通、截、堵、出”五字策略^[10],依据目标氨基酸代谢合成途径及网络调控机制,代谢工程*L*-甲硫氨酸改造策略主要包括以下5个方面:1)解除代谢途径对关键酶的反馈作用;2)阻断或削弱支路代谢途径;3)中心代谢调控网络的优化;4)增强辅助因子的供应;5)转运系统的优化。

2.1 解除代谢途径对关键酶的反馈作用

如前所述, *C. glutamicum*和*E. coli*中*L*-甲硫氨酸合成途径存在多分支、多水平的反馈调节,许多关键酶受相应代谢物的反馈抑制或(和)反馈阻遏。反馈抑制指在生物合成过程中代谢途径终产物对相关酶引起的活性

抑制调节^[28]。生物合成途径的终产物达到一定水平时对代谢途径关键酶表达量的调节会引起反馈阻遏^[29]。在菌株发酵产氨基酸的正向代谢工程中,解除代谢途径关键酶受到的反馈调节可有效促进目标产物*L*-甲硫氨酸的合成,代谢流的疏通可作为一种策略提高*L*-甲硫氨酸产量^[30]。

L-赖氨酸和*L*-苏氨酸合成途径作为*L*-甲硫氨酸合成的分支代谢途径,分别通过天冬氨酸-4-半醛和*L*-高丝氨酸实现代谢流的竞争^[31]。除来自于末端代谢产物的反馈抑制, *L*-甲硫氨酸合成途径中还有一些关键酶受胞内中间代谢产物的抑制作用。在*E. coli*中AK的表达分别受*L*-苏氨酸、*L*-赖氨酸和*L*-甲硫氨酸的反馈调节^[9],其中*lysC*和*thrA*及其编码的AK分别受到*L*-赖氨酸和*L*-苏氨酸的反馈阻遏和反馈抑制, *metL*受到*L*-甲硫氨酸反馈阻遏。在*C. glutamicum*中由*lysC*编码的AK表达受*L*-苏氨酸和*L*-赖氨酸的协同反馈阻遏^[32],在酶活力水平上受*L*-赖氨酸和*L*-苏氨酸的反馈抑制。*C. glutamicum*中构建AK定点突变体A279T和G359D,其中A279T突变体氨基酸由疏水性变为亲水性致使AK分子构象改变,与配体间的非共价键作用被打破, G359D的突变使Arg¹⁵¹与底物结合位点Glu⁷⁴之间无法形成离子键,可在一定程度上解除*L*-苏氨酸和*L*-赖氨酸对AK的反馈阻遏^[33-34]。在*E. coli*中HSD作为双功能酶由*thrA*和*metL*编码,其中基因*thrA*在转录水平上受*L*-苏氨酸抑制。在*C. glutamicum*中, HSD活性受*L*-苏氨酸的反馈抑制,其表达受到产物*L*-甲硫氨酸反馈阻遏,在构建*C. glutamicum*产*L*-甲硫氨酸菌株中,将HSD第377位的甘氨酸突变为谷氨酸,可消除*L*-苏氨酸对HSD的反馈抑制^[35]。*E. coli*中HTS由*metA*基因编码,除受*L*-甲硫氨酸抑制外,其表达还受下游代谢产物SAM抑制,将HTS的第896位碱基由A突变为G或第71位碱基由C突变为A,能够解除末端产物*L*-甲硫氨酸和SAM的反馈抑制^[36]。

2.2 阻断或削弱支路代谢途径

在天冬氨酸族氨基酸共同途径中,碳流通过天冬氨酸-β半醛和*L*-高丝氨酸后流向分支代谢途径,阻断或削弱分支代谢途径可有效调节碳源更多流向目标氨基酸*L*-甲硫氨酸代谢途径,实现*L*-甲硫氨酸产量的提升。主要方法包括:*L*-苏氨酸和*L*-赖氨酸营养缺陷型的筛选,弱化*L*-苏氨酸和*L*-赖氨酸的合成;敲除*dapA*和*thrB*基因阻断*L*-苏氨酸和*L*-赖氨酸的合成。*C. glutamicum*中,敲除基因*thrB*可以获得*L*-苏氨酸营养缺陷型菌株,在阻断碳流流向*L*-苏氨酸途径的同时解除*L*-苏氨酸对AK和HSD的协同反馈抑制作用^[35,37-38]。在*C. glutamicum* ATCC13032中通过对基因*thrB*敲除阻断*L*-苏氨酸合成途径,对*dapA*中起始密码子ATG用GTG代替,弱化*L*-赖氨酸合成途径,与野生型对比, *C. glutamicum*工程菌*L*-甲硫氨酸产量增加3倍,最终达到2.99 g/L^[38]。在*E. coli* W3110中,通过敲除*thrBC*基因构建*L*-苏氨酸营养缺陷型菌株, *L*-甲硫氨酸产量由不可检测

提升至0.008 g/L^[39]。 *E. coli* K-12/pKD46菌株中, *dapA*基因缺失后代物L-甲硫氨酸产量提高2.61倍^[40]。

2.3 中心代谢调控网络的优化

一直以来, L-甲硫氨酸中心代谢途径碳分布不平衡是迫切需要解决的问题, 其阻碍了代谢物生物合成产量和产率的进一步提高。中心代谢调控网络的优化主要包括碳源利用途径的优化、副产物合成途径的敲除、模块化代谢工程和全局转录机器工程等^[41]。通过细菌的转录、代谢组学分析可以了解菌株代谢并为后期改造提供重要线索。通量平衡分析(flux balance analysis, FBA)的使用能够精确地计算和分析比对代谢网络内产物的理论得率和最佳代谢途径^[42]。通过系统分析策略对中心代谢和选定的L-甲硫氨酸生物合成途径中的80个基因表达进行抑制或上调, 利用代谢组学数据进一步揭示了中心代谢通量分布更均匀的最优菌株L-甲硫氨酸生物合成途径, 将L-甲硫氨酸生物合成途径模块化, 同时进行迭代遗传修饰以揭示多层限制并逐步提高L-甲硫氨酸产量, 最终达到16.86 g/L^[43]。L-甲硫氨酸工程菌培养发酵过程中, 在发酵培养基中添加Ca²⁺, FBA结果表明添加CaCO₃加强了三羧酸循环, 使细胞内ATP浓度增加了39.28%, 柠檬酸合成酶和氧化磷酸化途径的调节是L-甲硫氨酸过量生产的重要原因, 碳、ATP和辅因子通量的重新分布与*E. coli* W3110-BL协同改善L-甲硫氨酸生物合成效率, 产量达到1.48 g/L, 比未添加Ca²⁺的对照组高57.45%^[44]。

2.4 增强辅助因子的供应

辅助因子的供给和平衡能够避免阻碍代谢途径, 对目标氨基酸的合成效率也发挥重要作用, 是氨基酸代谢工程的一个重要影响因素。相比于其他氨基酸, 合成L-甲硫氨酸需要更多的辅助因子NADPH, 是合成L-赖氨酸的2倍, 合成L-谷氨酸的8倍^[38]。NADPH在*C. glutamicum*和*E. coli*中以不同的方式提供。*C. glutamicum*中NADPH主要通过磷酸戊糖途径中由*zwf*编码的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以及由*gnd*编码的6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶协同催化合成。在*E. coli*中主要通过利用膜结合的转氢酶完成从NADH到NADPH的转化。增强NADPH的供应最常用的策略是重新分配糖酵解和磷酸戊糖途径之间的代谢流量比。在*C. glutamicum*中将*zwf*基因727位点的G突变为A, *gnd*基因1083位点的T突变为C, 解除葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的反馈抑制, 并异源过表达*E. coli*中基因*gapC*, 细胞内NADPH水平增加448.2%, L-甲硫氨酸产量增加64.1%^[45]。第二种策略是通过糖酵解产生NADPH, 通过改变天然NAD依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶编码基因*gapA*对NADP的辅酶特异性^[46]。第三种策略是过量表达来自*E. coli*的整合烟酰胺核苷酸转氢酶, 膜结合转氢酶编码基因*PntAB*可促进NADP⁺向NADPH的转化^[47]。过量的NADPH会被用于代谢途径中其他代谢物的

合成, 仅通过NADPH的供应促进L-甲硫氨酸的生产是有限的, 利用系统代谢工程进一步提高L-甲硫氨酸产量非常必要^[45]。

2.5 转运系统的优化

用于分子转运的载体蛋白在氨基酸代谢生物合成途径中发挥着重要作用。L-甲硫氨酸在胞内合成后, 需要尽快将合成的多余甲硫氨酸运输到胞外, 避免在胞内过量积累产生一定毒性使细胞死亡, 防止L-甲硫氨酸过量引起的反馈抑制和反馈阻遏, 同时有利于L-甲硫氨酸后续提取工艺的进行^[48]。对L-甲硫氨酸分泌和吸收运输协同的改造可以促进L-甲硫氨酸的胞内合成, 有利于胞外积累。研究发现可通过在*E. coli*中敲除*metN*、*metI*、*metQ*基因弱化L-甲硫氨酸胞内MetD运输系统的转运, 过表达YjeH转运蛋白编码基因*yjeH*能够加强胞外转运能力, 但会影响菌株生长^[49]。在*E. coli*中YeaS运输系统的编码基因*yeaS*过表达, 可提升L-甲硫氨酸胞外运输的能力^[24]。对*E. coli*中异源引入基因*cysB*^{T149P}替换*E. coli*内源*cysB*从而构建突变菌株能够有效地解除CysB激活蛋白调控*cys*操纵子的调控, 促进L-甲硫氨酸生物合成途径中硫代谢相关基因的表达, 提高代谢物的产量^[25]。对*C. glutamicum*中硫代谢途径调控因子*mcbR*基因进行敲除或修饰, 可解除其对菌株生产能力的阻遏, 使L-甲硫氨酸产量提升^[37]。MetD运输系统的表达也受转录因子*mcbR*的调控, 敲除基因簇中任意基因均能够使MetD运输系统丧失活性^[38]。*C. glutamicum*中过表达L-甲硫氨酸分泌系统BrnFE能使L-甲硫氨酸产量提高^[37]。*C. glutamicum*中*Lrp*作为一种转录调控因子可影响L-甲硫氨酸的合成, 通过对胞内L-甲硫氨酸浓度的响应, 激活转运蛋白BrnFE表达从而稳定胞内L-甲硫氨酸浓度^[50]。在未来, 结合可见光荧光响应官能团与目的转运蛋白融合进一步改进生物传感器的方法, 可更好地用于了解细胞内L-甲硫氨酸代谢通量^[23,51]。

3 L-甲硫氨酸生物合成进展

在过去的20年里, L-甲硫氨酸在*C. glutamicum*和*E. coli*中代谢途径和调控机制得到深入研究, 人们在改进L-甲硫氨酸发酵方面不断做出努力和贡献。

随着L-甲硫氨酸代谢途径的确认, 研究人员首先集中于利用基因表达调控及突变株的选育以提高L-甲硫氨酸产量。Moeckel等^[52]对一株已改造的赖氨酸生产菌株中*metX*和*metY*基因过表达, 弱化产物对HAT及乙酰高丝氨酸硫基酶的反馈抑制, 强化L-甲硫氨酸合成途径, 最终积累量达到16 g/L。Maier等^[53]在一株抗反馈抑制*E. coli*中敲除编码阻遏蛋白基因*metJ*, 并过量表达运输蛋白编码基因*yjeH*, 强化合成途径及运输基因的表达, L-甲硫氨酸产量达到4.8 g/L。Krömer等^[54]通过代谢途径分析预测*C. glutamicum*和*E. coli*在L-甲硫氨酸的生产上有巨大潜力。

随后该团队对*C. glutamicum*代谢途径中调节L-甲硫氨酸生物合成和硫同化的重要基因*mcbR*进行敲除,使L-甲硫氨酸积累量达到3.4 g/L^[55]。Park等^[35]对一株已解除赖氨酸反馈抑制的*C. glutamicum*进行改造,通过敲除苏氨酸途径关键酶编码基因*thrB*以弱化支路途径,并提高HSD的表观量削弱反应中间代谢物带来的反馈抑制,在摇瓶发酵后测定胞外L-甲硫氨酸积累量为2.9 g/L。

酶的定向进化、基因敲除、基因过表达等方法在L-甲硫氨酸发酵生产过程中得到广泛应用后,研究人员渐渐投身于合成途径的完善与整合。Qin Tianyu等^[37]敲除*C. glutamicum*中*mcbR*基因释放合成途径相关基因的转录抑制,上调*metX*转录水平,过表达*hom^{Fbr}*、*lysC^{Fbr}*及运输蛋白编码基因*brnFE*,增加前体供应并增加L-甲硫氨酸胞外浓度,最终L-甲硫氨酸产量达到6.3 g/L。李莹^[56]以*C. glutamicum* ATCC13032为出发菌株,敲除编码产物主要吸收系统基因*metD*,通过诱变解除末端代谢产物对甲硫氨酸合成途径的反馈抑制作用,敲除*thrB*基因以阻断L-苏氨酸合成,对*dapA*、*lysC*、*pyc*基因进行定点突变以削弱分支代谢途径并解除相关酶的反馈抑制,过表达来自丙酮丁醇梭菌的外源基因*gapC*,从而增强胞内NADPH供应,最终L-甲硫氨酸产量达到9.88 g/L。Huang Jianfeng等^[57]以*E. coli* W3110为出发菌株,敲除阻遏蛋白基因*MetJ*、向胞内运输L-甲硫氨酸的运输蛋白基因*MetI*、过量表达*metA^{Fbr}*和运输蛋白基因*yjeH*以提高碳流流向目标产物,加强胞外运输能力,并用Na₂S₂O₃为硫源,5 L发酵罐补料发酵48 h, L-甲硫氨酸终产量达到9.75 g/L。

由于L-甲硫氨酸代谢途径存在复杂的基因表达与调控,通常只能进行局部代谢调控而较难实现对全局代谢的调控。近几年随着代谢工程策略与合成生物学工具的发展,以系统和全局的方式促进L-甲硫氨酸生产的相关研究逐渐显现。Huang Jianfeng等^[43]以*E. coli* W3110 IJ/pA*H为研究对象,基于CRISPR-Cas9技术对中心代谢途径和氨基酸生物合成途径进行系统分析,进一步揭示包括转录调节、变构调节、同型半胱氨酸甲基化、甲基四氢叶酸(tetrahydrogen folic acid, CH₃-THF)供应、*o*-琥珀酰-L-高丝氨酸供应和L-丝氨酸在内的限制L-甲硫氨酸生物合成的6层瓶颈,代谢组学分析结果表明,多个基因修饰能有效地重新分配代谢通量,促进L-甲硫氨酸的生物合成。魏磊^[58]利用CRISPR-Cas9技术对L-甲硫氨酸合成过程的阻遏因子*metJ*及其竞争途径——赖氨酸和苏氨酸合成途径的*lysA*和*thrC*以及*sucCD*进行敲除,同时定点改造AK编码基因为产物反馈抑制不敏感型的*lysC^{mut}*和*thrA^{mut}*,将植物中的胱硫醚-γ-合成酶基因*cgs*和高半胱氨酸甲基转移酶基因*hmt*和甲硫氨酸甲基转移酶基因*mmt*组合在已改造后的菌株中进行过表达, L-甲硫氨酸产量最终达804 mg/L,是野生型的12倍。Niu等^[59]用FBA对重组*E. coli* W3110分批发酵L-甲硫氨酸的代谢通量进行分析,

估算不同溶氧条件下细胞内的通量分布,发现在30%溶解氧水平下获得的L-甲硫氨酸生产通量高于其他溶解氧水平。Zhu Wenyuan等^[60]利用发酵与生物催化相结合的方法生产L-甲硫氨酸,将经系统分析优化构建的*o*-琥珀酰基-L-高丝氨酸生产菌*E. coli* W3110(DE3)Δ*IJB***TrcmetL/pTrc-metA^{Fbr}-Trc-thrA^{Fbr}-yjeH*经发酵提取上清液,在*o*-琥珀酰基-L-高丝氨酸巯基酶和甲硫醇钠存在的情况下转化为L-甲硫氨酸,降低菌株修饰难度,使L-甲硫氨酸产量达21.1 g/L。研究人员不断利用*C. glutamicum*和*E. coli*进行L-甲硫氨酸代谢途径的改造,然而合成L-甲硫氨酸的多层次调控和复杂性尚未得到解决,对L-甲硫氨酸的大规模生产之间仍然存在一些差距。随着科学技术的不断发展,现有研究很大程度扩展了对L-甲硫氨酸生物合成多层次多级调控的认识,并为工业化生产L-甲硫氨酸奠定基础。表1汇总了部分L-甲硫氨酸代谢途径改造策略。

表1 L-甲硫氨酸代谢途径改造策略部分汇总
Table 1 Summary of L-isoleucine metabolic pathway modification strategies

菌株	方法	质量浓度/ (g/L)	参考文献
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Δ <i>thrB</i> , Δ <i>mcbR</i> (pJYW4- <i>hom^{mut}</i> - <i>lysC^{mut}</i> - <i>brnFE</i>)	6.30	[37]
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Δ <i>metD</i> , Δ <i>thrB</i> , <i>dap^{mut}</i> , <i>lysC^{mut}</i> , <i>pyc^{mut}</i> , <i>zvf^{mut}</i> , <i>gnd^{mut}</i>	6.85	[38]
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	LY-6ipXMI19-tacM-gapC	7.23	[61]
<i>E. coli</i> W3110	Δ <i>metJ</i> , Δ <i>thrC</i> , Δ <i>lysA</i> , <i>metK^{mut}</i> , <i>metA^{Fbr}</i> , <i>metB^F</i> , <i>malY^F</i> , <i>metH^F</i>	5.62	[62]
<i>E. coli</i> W3110	Δ <i>metJ</i> , Δ <i>metI</i> , Δ <i>lysA</i> /pTrc- <i>metA</i> - <i>yjeH</i>	9.75	[57]
<i>E. coli</i> MG1655	Δ <i>metJ</i> , <i>metL^F</i> , <i>metK^{mut}</i> , <i>HIS^{his}</i>	14.10	[63]
<i>E. coli</i> W3110	Δ <i>metJ</i> , Δ <i>metJ</i> , Δ <i>lysA</i> , <i>metH^F</i> <i>MetI^F</i> , <i>cysE^F</i> , <i>serB^F</i> , <i>serC^F</i> , <i>metA^{Fbr}</i> , <i>yjeH^F</i> , <i>serA^{Fbr}</i>	16.86	[43]
<i>E. coli</i> W3110	pTrcF-cysPUWAM, pTrcF-cysJH, Δ <i>pykF</i> , Δ <i>pykA</i> , pCCIBAC- <i>serB</i> - <i>glyA</i> - <i>serA</i> - <i>serC</i>	30.00	[64]

吉林农业大学食品科学与工程学院酶分子改造及食品营养分子调控团队通过定向进化酶分子改造强化关键酶的表达,解除或削弱代谢途径相关酶反馈抑制,并通过代谢工程构建高产L-甲硫氨酸工程菌,致力于利用微生物发酵法提高L-甲硫氨酸产量的研究^[65-69]。团队首次发现与*C. glutamicum*同源相似性达99%的北京棒杆菌(*C. pekinense*) AK单体别构酶,揭示了单体AK别构调控机制,至今已构建了140余株突变菌株,其中酶活力最大提高99.43倍,异源表达AK优化后构建*C. glutamicum*工程菌PEC-*lysC^m*-*hom^m*-*metX*的L-甲硫氨酸最高产量达6.85 g/L,较原菌提高274.32%,具体AK改造后酶活力提升情况如表2所示,为系统阐明关键酶与蛋氨酸生物合成代谢网络相互作用关系,为棒杆菌L-甲硫氨酸合成代谢的调节和氨基酸菌种选育提供了良好借鉴。未来,团队将集中在现有研究成果基础上结合CRISPR技术,深入研究多分支、多水平调控氨基酸合成途径方法,微生物发酵方法的研究以及溶氧、pH值等发酵参数的优化,以求高效改造L-甲硫氨酸生物合成途径,推进玉米淀粉高效生物转化L-甲硫氨酸工业化进程。

表2 AK高酶活力突变株构建情况

AK突变株名称	调控区域	酶活力提高倍数	参考文献
AK ^{V378N}	Lys	20.19	[70]
AK ^{T379N/A380C}	Thr	22.79	[71]
AK ^{T379N/A380C/S59F}	Lys+Asp	39.65	[69]
AK ^{T379N/A380C/T65I}	Lys+Asp	58.36	
AK ^{T379N/A380C/G171I/Y198N}	Lys+Asp+ATP	75.64	[72]
AK ^{T379N/A380C/G171I/S227D}	Lys+Asp+ATP	80.41	
AK ^{T379N/A380C/G171I/S227D/S172P}	Lys+Asp+ATP+Thr	83.71	[73]
AK ^{T379N/A380C/G171I/S227D/I173G}	Lys+Asp+ATP+Thr	86.33	
AK ^{T379N/A380C/G171I/Y198N/G295L}	Lys+Asp+ATP+Thr	87.20	
AK ^{T379N/A380C/G171I/Y198N/A297K}	Lys+Asp+ATP+Thr	95.37	[74]
AK ^{T379N/A380C/G171I/Y198E/296Q}	Lys+Asp+ATP+Thr	97.67	
AK ^{T379N/A380C/G171I/Y198N/Q316P}	Lys+Asp+ATP+Thr	99.43	

4 结 语

L-甲硫氨酸作为生命体不能自主合成的必需独特含硫氨基酸,在食品、医药、动物饲料、化妆品等方面应用广泛^[75-76],具有重要的工业经济价值。近几年,随着代谢工程技术与合成生物学的迅速发展,适应性进化、基因组编辑、基因表达调控等广泛开发,研究人员已将这方法应用于*L*-甲硫氨酸的生产研究中。虽然已经阐明了*L*-甲硫氨酸合成途径中的代谢调控机制,但通过微生物发酵生产*L*-甲硫氨酸尚未实现工业化。

在目前的研究报道中,提高*L*-甲硫氨酸产量具体策略主要包括:优良出发菌种的选择、高产菌株的高通量筛选、合成途径的合理选择以及发酵条件的优化。过表达、弱化表达、定向进化和目标基因的缺失与替换等方法已被广泛应用于优化*L*-甲硫氨酸生物合成途径。以往对于生物合成*L*-甲硫氨酸相关的改造研究普遍集中于对天冬氨酸族氨基酸共同途径的代谢调控,但中心代谢途径中碳流量和辅助因子通量变化也会直接影响*L*-甲硫氨酸的合成能力,后续的研究可主要着重于:1)对中心代谢调控展开更细化的讨论,并在产量最大化的基础上尽量精简调控路线,节约实验成本;2)目前动态调控、精确调控已成为代谢工程研究的主要策略,合理利用动态调控、精细调控代谢过程以平衡菌株生长发育过程与*L*-甲硫氨酸合成的关系,能够有效调节菌株生产效率并提高*L*-甲硫氨酸的转化率;3)以合理设计为前提、正向代谢工程为基础的系统代谢工程进行综合应用,深入应用组学数据分析方法,建立计算机高级代谢网络模型,并加强进化、反向代谢工程在高产*L*-甲硫氨酸代谢工程中的研究利用以提高氨基酸菌株育种效率;4)利用多学科领域交叉联合手段综合运用*L*-甲硫氨酸代谢设计,利用计算机分析建立基因组精细代谢表达调控模型指导*L*-甲硫氨酸生产,结合生物传感器、新型功能元件挖掘、CRISPR基因编辑和全基因组池CRISPR干扰等技术进行

L-甲硫氨酸代谢途径改造。随着生物信息学与合成生物学的发展与应用,未来利用代谢工程技术生产*L*-甲硫氨酸将有望实现工业化,*L*-甲硫氨酸产业将会为人们带来更高的经济效益。

参考文献:

- MUELLER J H. A new sulfur-containing amino-acid isolated from the hydrolytic products of protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1923, 56(1): 157-169. DOI:10.1016/s0021-9258(18)85612-5.
- PARK J H, LEE S Y. Metabolic pathways and fermentative production of *L*-aspartate family amino acids[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(6): 560-77. DOI:10.1002/biot.201000032.
- SAVINO R J, KEMPISTY B, MOZDZIAK P. The potential of a protein model synthesized absent of methionine[J]. Molecules, 2022, 27(12): 20. DOI:10.3390/molecules27123679.
- SANDERSON S M, GAO X, DAI Z, et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine[J]. Nature Reviews Cancer, 2019, 19(11): 625-637. DOI:10.1038/s41568-019-0187-8.
- SAUTER M, MOFFATT B, SAECHAO M C, et al. Methionine salvage and *S*-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis[J]. The Biochemical Journal, 2013, 451(2): 145-1454. DOI:10.1042/BJ20121744.
- 卿周君. 蛋氨酸生产工艺及核心制备技术研究进展[J]. 化工管理, 2015(36): 174. DOI:10.3969/j.issn.1008-4800.2015.36.145.
- GOMES J, KUMAR D. Production of *L*-methionine by submerged fermentation: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(1): 3-18. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.02.008.
- 高海军, 杨一飞, 孟青. 重组大肠杆菌合成蛋氨酸的代谢途径优化[J]. 高校化学工程学报, 2017, 31(4): 884-891. DOI:10.3969/j.issn.1003-9015.2017.04.018.
- SHIM J, SHIN Y, LEE I, et al. *L*-Methionine production[J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 2017, 159: 153-177. DOI:10.1007/10_2016_30.
- LI Y, WEI H, WANG T, et al. Current status on metabolic engineering for the production of *L*-aspartate family amino acids and derivatives[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1588-1602. DOI:10.1016/j.biortech.2017.05.145.
- 马倩, 夏利, 谭森, 等. 氨基酸生产的代谢工程研究进展与发展趋势[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1677-1696. DOI:10.13345/j.cjb.200588.
- BECKER J, GIESSELMANN G, HOFFMANN S L, et al. *Corynebacterium glutamicum* for sustainable bioproduction: from metabolic physiology to systems metabolic engineering[J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 2018, 162: 217-263. DOI:10.1007/10_2016_21.
- CHOI K R, SHIN J H, CHO J S, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli*[J]. EcoSal Plus, 2016, 7(1): 1-56. DOI:10.1128/ecosalplus.esp-0010-2015.
- 吴瑶瑶, 裘娟萍. 天冬氨酸家族主要氨基酸高产菌株的选育策略[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(1): 35-41. DOI:10.14188/j.ajsh.2012.01.006.
- LEE H S, HWANG B J. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulphydrylation[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2003, 62(5/6): 459-467. DOI:10.1007/s00253-003-1306-7.
- XIANG S, TONG L. Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2008, 15(3): 295-302. DOI:10.1038/nsmb.1393.

- [17] DONG X, ZHAO Y, ZHAO J, et al. Characterization of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* IWJ001 and systematic investigation of *L*-isoleucine biosynthesis[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, 43(6): 873-885. DOI:10.1007/s10295-016-1763-5.
- [18] ZAKIN M M, DUCHANGE N, FERRARA P, et al. Nucleotide sequence of the *metL* gene of *Escherichia coli*. Its product, the bifunctional aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II, and the bifunctional product of the *thrA* gene, aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I, derive from a common ancestor[J]. Journal of Biological Chemistry, 1983, 258(5): 3028-3031. DOI:10.1016/s0021-9258(18)32824-2.
- [19] FOLLETTIE M T, SHIN H K, SINSKEY A J. Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* hom-thrB and thrC loci[J]. Molecular Microbiology, 1988, 2(1): 53-62. DOI:10.1111/j.1365-2958.1988.tb00006.x.
- [20] 陈小龙. 生物合成法生产腺苷蛋氨酸[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2002: 7-8.
- [21] HAN G, HU X, QIN T, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 to produce *S*-adenosyl-*L*-methionine[J]. Enzyme and microbial technology, 2016, 83: 14-21. DOI:10.1016/j.enzmictec.2015.11.001.
- [22] LIU J, LIU M, SHI T, et al. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an *L*-proline exporter for *L*-proline hyperproduction[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 891. DOI:10.1038/s41467-022-28501-7.
- [23] MOHANY N A M, TOTTI A, NAYLOR K R, et al. Microbial methionine transporters and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2021, 105(10): 3919-3929. DOI:10.1007/s00253-021-11307-w.
- [24] MERLIN C, GARDINER G, DURAND S, et al. The *Escherichia coli metD* locus encodes an ABC transporter which includes *Abc* (*MetN*), *YaeE* (*MetI*), and *YaeC* (*MetQ*)[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(19): 5513-5517. DOI:10.1128/JB.184.19.5513-5517.2002.
- [25] 董伟. 转运系统集成改造提升大肠杆菌胞外L-蛋氨酸积累[D]. 无锡: 江南大学, 2018: 8.
- [26] TROTSCHER C, DEUTENBERG D, BATHE B, et al. Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(11): 3786-3794. DOI:10.1128/JB.187.11.3786-3794.2005.
- [27] TROTSCHER C, FOLLMANN M, NETTEKOVEN J A, et al. Methionine uptake in *Corynebacterium glutamicum* by MetQNI and by MetPS, a novel methionine and alanine importer of the NSS neurotransmitter transporter family[J]. Biochemistry, 2008, 47(48): 12698-12709. DOI:10.1021/bi801206t.
- [28] LIU S, XU J Z, ZHANG W G. Advances and prospects in metabolic engineering of *Escherichia coli* for *L*-tryptophan production[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(2): 16. DOI:10.1007/s11274-021-03212-1.
- [29] WANG X Y. Strategy for improving *L*-isoleucine production efficiency in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(5): 2101-2111. DOI:10.1007/s00253-019-09632-2.
- [30] CHEN L, ZENG A P. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of *L*-tryptophan at high concentration[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101(2): 559-568. DOI:10.1007/s00253-016-7772-5.
- [31] 赵嫚, 彭莉, 成浩, 等. 微生物甲硫氨酸合成调控的综合研究进展与展望[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 257-264. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024785.
- [32] GANGULY S, SATAPATHY K B. Statistical optimization of culture conditions for *L*-methionine production by *Corynebacterium glutamicum* X300[J]. Journal of Theoretical and Computational Science, 2017, 4(1):1-7. DOI:10.4172/2376-130x.1000150.
- [33] 黄勤勤, 王慧梅, 梁玲, 等. *lysC*定点突变及*lysC*、*asdA*串联表达对谷氨酸棒杆菌L-苏氨酸积累的影响[J]. 生物技术通报, 2019, 35(2): 93-100. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0624.
- [34] 徐德雨, 郑小梅, 赵晶, 等. 谷氨酸棒杆菌天冬氨酸激酶G359D突变解除赖氨酸与苏氨酸协同抑制的研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 143-152. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0387.
- [35] PARK S D, LEE J Y, SIM S Y, et al. Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. Metabolic Engineering, 2007, 9(4): 327-336. DOI:10.1016/j.ymben.2007.05.001.
- [36] 段昭炜. 大肠杆菌发酵生产蛋氨酸关键酶metA突变位点筛选[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 36-38.
- [37] QIN Tianyu, HU Xiaoping, HU Jinyu, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC13032 to produce *L*-methionine[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(4): 563-573. DOI:10.1002/bab.1290.
- [38] LI Y, CONG H, LIU B, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for methionine production by removing feedback inhibition and increasing NADPH level[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2016, 109(9): 1185-1197. DOI:10.1007/s10482-016-0719-0.
- [39] USUDA Y, KURAHASHI O. Effects of deregulation of methionine biosynthesis on methionine excretion in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3228-3234. DOI:10.1128/AEM.71.6.3228-3234.2005.
- [40] 吴婷婷. 大肠杆菌*dapA*基因的敲除及其对蛋氨酸产量影响的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008: 61.
- [41] 徐显皓. 枯草芽孢杆菌中心代谢级联调控回路的设计、构建与应用[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 4.
- [42] ORTH J D, THIELE I, PALSSON B O. What is flux balance analysis?[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(3): 245-248. DOI:10.1038/nbt.1614.
- [43] HUANG Jianfeng, SHEN Zhenyang, MAO Qiaoli, et al. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of *L*-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(11): 2577-2589. DOI:10.1021/acssynbio.8b00249.
- [44] ZHOU H Y, WU W J, XU Y Y, et al. Calcium carbonate addition improves *L*-methionine biosynthesis by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110-BL[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 300. DOI:10.3389/fbioe.2020.00300.
- [45] LIU B, SUN X, LIU Y, et al. Increased NADPH supply enhances glycolysis metabolic flux and *L*-methionine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Foods, 2022, 11(7): 31. DOI:10.3390/foods11071031.
- [46] BOMMAREDDY R 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[J]. Metabolic Engineering, 2014, 25: 30-37. DOI:10.1016/j.ymben.2014.06.005.
- [47] ZHAN M, KAN B, DONG J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved *L*-arginine synthesis by enhancing NADPH supply[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(1): 45-54. DOI:10.1007/s10295-018-2103-8.

- [48] 郭谦. 代谢工程改造大肠杆菌生产L-蛋氨酸[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 7.
- [49] 李华. 系统代谢工程改造大肠杆菌生产L-蛋氨酸[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 12-13.
- [50] 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]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 158(4): 231-241. DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.06.003.
- [51] KELL D B, SWAINSTON N, PIR P, et al. Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(4): 237-246. DOI:10.1016/j.tibtech.2015.02.001.
- [52] MOECKEL B, PFEFFERLE W, HUTHMACHER K, et al. Nucleotide sequences which code for the *metY* gene: EP1313871B1[P]. (2009-07-08) [2022-08-05].
- [53] MAIER D B, PFEIFFER K. Verfahren zur fermentativen herstellung von L-methionin. A process for the fermentative preparation of L-methionine: DE10305774A1[P]. 2004-8-26.
- [54] KRÖMER J O, WITTMANN C, SCHRODER H, et al. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(4): 353-369. DOI:10.1016/j.ymben.2006.02.001.
- [55] KRÖMER J O, HEINZLE E, SCHRODER H, et al. Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(2): 609-618. DOI:10.1128/JB.188.2.609-618.2006.
- [56] 李莹. 基于代谢工程选育谷氨酸棒杆菌L-蛋氨酸高产菌[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016: 87-88.
- [57] HUANG Jianfeng, LIU Zhiqiang, JIN Liqun, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 843-851. DOI:10.1002/bit.26198.
- [58] 魏磊. 代谢工程策略合成甲硫氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2020: 52-53.
- [59] NIU Kun, XU Yueying, WU Wangjie, et al. Effect of dissolved oxygen on L-methionine production from glycerol by *Escherichia coli* W3110BL using metabolic flux analysis method[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47(3): 287-297. DOI:10.1007/s10295-020-02264-w.
- [60] ZHU Wenyuan, NIU Kun, LIU Peng, et al. Combining fermentation to produce O-succinyl-L-homoserine and enzyme catalysis for the synthesis of L-methionine in one pot[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 132(5): 451-459. DOI:10.1016/j.jbiosc.2021.07.002.
- [61] LI Y, AI Y, ZHANG J, et al. A novel expression vector for *Corynebacterium glutamicum* with an auxotrophy complementation system[J]. *Plasmid*, 2020, 107: 102476. DOI:10.1016/j.plasmid.2019.102476.
- [62] LI H, WANG B S, LI Y R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, 44(1): 75-88. DOI:10.1007/s10295-016-1870-3.
- [63] BESTEL-CORRE G, MICHEL C, MARTIN F R, et al. Recombinant enzyme with altered feedback sensitivity: US8795990 B2[P]. (2015-03-25)[2022-08-05].
- [64] WANDA D, RAINER F. Recombinant microorganism for the fermentative production of methionine: WO2012090021A1[P]. (2017-05-31)[2022-08-05].
- [65] 王亚南, 刘晓婷, 樊占青, 等. 北京棒杆菌单体天冬氨酸激酶T379N/A380C/T651/D173G突变体酶学性质表征及工程菌构建[J]. *食品科学*, 2022, 43(2): 100-107. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201110-103.
- [66] 赵兰, 刘诗梦, 秦汉雄, 等. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产甲硫氨酸[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 98-104. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190712-173.
- [67] HAN C J, LIU S M, LIU C L, et al. The mutant T379L of novel aspartokinase from *Corynebacterium pekinense*: a combined experimental and molecular dynamics simulation study[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 83: 7785. DOI:10.1016/j.procbio.2019.04.022.
- [68] FAN Z Q, FANG L, WU L M, et al. Improved catalytic activity of a novel aspartate kinase by site-directed saturation mutagenesis[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(3): 541-551. DOI:10.1007/s00449-021-02677-6.
- [69] 刘诗梦. 谷氨酸棒杆菌中蛋氨酸生物合成途径过表达及其竞争支路关键酶钝化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020: 44.
- [70] 朱运明. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶定点突变及功能分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015: 32-33.
- [71] LIU X T, HAN C J, FANG L, et al. Mechanism of the feedback-inhibition resistance in aspartate kinase of *Corynebacterium pekinense*: from experiment to MD simulations[J]. *RSC Advances*, 2021, 1(11): 30-38. DOI:10.1039/D0RA09153G.
- [72] 魏贞. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶ATP结合位点空间改造及酶学性质表征[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020: 41-42.
- [73] 樊占青. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶催化位点空间改造及别构调控机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021: 42.
- [74] 王哲人, 刘晓婷, 樊占青, 等. 北京棒杆菌天冬氨酸激酶五突变体的构建及酶学性质表征[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(16): 112-118. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021010071.
- [75] XUE J J, XIE M, TANG J, et al. Effects of excess DL- and L-methionine on growth performance of starter Pekin ducks[J]. *Poultry Science*, 2018, 97(3): 946-950. DOI:10.3382/ps/pex380.
- [76] YANG Y H, QIAN J, LI B W, et al. Metabolomics based on ¹H-NMR reveal the regulatory mechanisms of dietary methionine restriction on splenic metabolic dysfunction in obese mice[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 20. DOI:10.3390/foods10102439.