

氨基酸高产菌株的选育及其 机理研究的新进展

张 星 元

(发 酵 工 程 系)

氨基酸生产的突出进步主要依靠氨基酸菌种的开发^[1-5]。氨基酸菌种选育工作的实践证明:基本弄清实验菌株代谢调节机制,有的放矢地采取遗传学上的手段,就比较容易接近预期的选育目标。

一、细菌的代谢调节和氨基酸菌种的改造

天然存在的原养型细菌往往是自然选择的幸存者,因此其新陈代谢必定是协调的、有节制的过程。作为初级代谢产物,任何一种氨基酸都不可能在天然存在的原养型细菌细胞内过量合成。为了使某种氨基酸过量合成,必须对它们进行改造,一般采取以下措施

1) 促进细胞对碳源等营养物质的吸收。Tosaka^[6](户坂)等人去年已作报道(详见第六部分)

2) 阻塞代谢支流,使碳架物质集中流向目的氨基酸。棒状杆菌属和短杆菌属细菌的高丝氨酸(Hse)缺陷型菌株能过量合成Lys。

3) 解除对用于目的氨基酸自身或其前体合成酶的阻遏或抑制(或诱导或激活这些酶)。在乳糖发酵短杆菌中,Asp族氨基酸合成途径上Lys支路的第一个酶,二氢吡啶二羧酸(DDP)合成酶的形成受细胞中Leu的阻遏,因此该菌的产Lys株若加上Leu缺陷的遗传标记,则可解除Leu对DDP合成酶的阻遏,提高Lys产率^[7,8]。

4) 消除或削弱目的氨基酸合成途径中关键中间产物的降解酶,以增加该氨基酸的前体。这个问题在本文第五部分将加以说明。

5) 抑制或削弱催化目的氨基酸进一步反应的酶。Thr产生菌衍生出的异亮氨酸需求型菌株,如果这种需求是因为Thr脱氢酶的缺损或削弱而引起的话,将有利于Thr的过量合成。

6) 促进目的氨基酸向胞外空间分泌。生物素水平对以葡萄糖为碳源的Glu发酵生产是关键性的。当生物素处于亚适量水平时,生成的谷氨酸易于排出细胞。

二、两用代谢途径的网络与氨基酸的合成代谢

近年来,氨基酸合成代谢的研究已向代谢流上游发展,进入了两用代谢途径的研究领域。事实证明,各种氨基酸的合成代谢及过量合成不但与各氨基酸自身合成代谢支流及调节有关,而且与两用途途的一些酶有密切关系。

本文1987年3月30日收到

在好气情况下,EMP和HMP途径与TCA环相通。图1给出了与氨基酸合成代谢有关的两用代谢途径的主要网络。

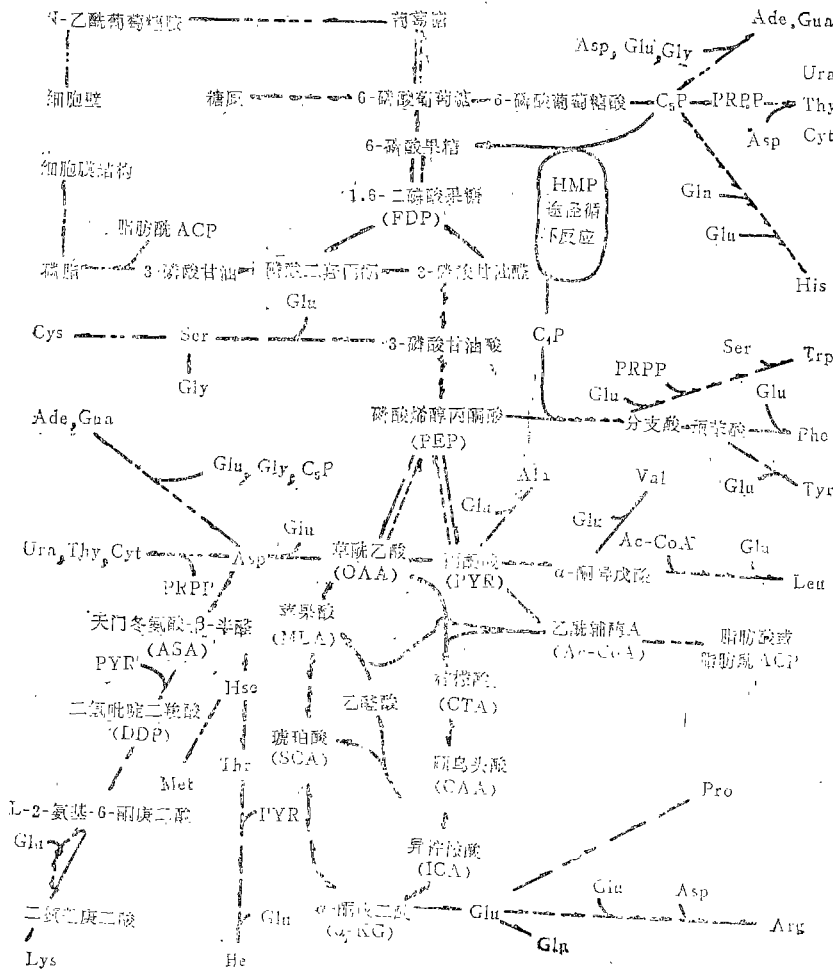


图1 两用代谢网络与氨基酸合成代谢示意图

注: (1)图中氨基酸名称按国际纯粹与应用化学协会统一规定缩写。此外: Ade,腺嘌呤; Gua,鸟嘌呤; Ura,尿嘧啶; Thy,胸腺嘧啶; Cyt,胞嘧啶; C₄P,4-磷酸赤藓糖; C₅P-磷酸核糖; PRPP,磷酸核糖基焦磷酸

(2)在两用途径中 $\rightleftharpoons$ 表示正逆反应用同一个酶, $\rightleftharpoons$ 表示正逆反应酶不同, $\rightarrow$ 表示一个单向反应, $\rightarrow\cdots\rightarrow$ 表示其中还有几个反应。

根据对大肠杆菌的研究,可以把酵解和TCA环所组成的网络想象成由几个反应序列的片段连接而成。每个片段由一个生理学上不可逆的反应以及接在它后面发生的一个或数个反应组成。每个催化该不可逆反应的酶一般都受所在“片段”的反应产物的负反馈调节。已记录在案的例子是(见图2): 磷酸果糖激酶(PFK)受磷酸烯醇丙酮酸(PEP)抑制,磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(PEPC)受Asp和其它二羧酸的抑制,丙酮酸(PYR)脱羧酶(PYR脱氢酶多酶复合体,即PD复合体的成分酶之一)受到乙酰辅酶A(Ac-CoA)的抑制,柠檬酸合成酶(CS)受 α -酮戊二酸(α -KG)抑制。这种控制类似于经典的终产物负反馈控制,但这里“片段”的产物要被

进一步降解或用于合成代谢。

从图2中还可以看到,在大肠杆菌中,PEPC和PYR激酶(PK)除了分别受到各自的终产物抑制外,还受其所在“片段”的上一个“片段”的前期产物1,6-二磷酸果糖(FDP)的激活。

除了终端反馈和前体控制以外,在两用途途径中催化不可逆反应的变构酶还会受到用来指示细胞能量水平的化合物的控制。如PFK受ADP和GDP激活,大肠杆菌中的两个PK之一受AMP激活,PYR脱氢酶复合物中的PYR脱羧酶成分受AMP和GDP激活。此外,反馈和前馈交互作用着的网络还受到附加的变构控制的调节。比如,已证明PEPC既受FDP又受Ac-CoA的激活,TCA环中的酶受到还原型NAD的负变构控制(控制主要施加在CS上)。

以上互相之间的调节控制把两用途途径的每个片段和种种分解代谢和合成代谢途径集成一个整体,它们可以防止任何一种代谢中间产物的过量合成,同时又保证能满足细胞生命活动对这些中间代谢产物的需要,并且在生理学条件有很大变化的情况下自动维持动态平衡。

从图1可知,TCA环的中间产物草酰乙酸(OAA)和 α -KG分别是Asp族氨基酸和Glu族氨基酸的前体。如果这两族氨基酸中一种或几种氨基酸过量合成的话,势必要从TCA环中连续地转移出中间产物,从而削弱或中止TCA环。若要循环继续运行,就必须补充碳架物质。这种补充可通过PEPC(如在大肠杆菌和黄色短杆菌中)或PYR羧化酶(PC)(如在假单孢菌和乳糖发酵短杆菌中)把PEP或PYR羧化成OAA而实现。

乙醛酸循环的存在也可以弥补TCA环因转移出中间产物所造成的四碳化合物 C_4 的亏空。乙醛酸循环的运行需要细胞具备两个额外的酶即异柠檬裂合酶(IL)和苹果酸合成酶,这两个酶可因醋酸的诱导而合成。

同时存在TCA环和乙醛酸循环的细菌在葡萄糖中生长时,流经这个环的碳架物质的数量关系似乎受到异柠檬脱氢酶(ID)和IL的调节。在大肠杆菌中,IL受PEP的强烈抑制,还发现IL在其它细菌中也受琥珀酸(SCA)、羟基乙酸和PYR等化合物的抑制^[9]。Krebe^[13]曾指出,ATP和还原型NAD可看作是TCA环的两个末端产物,当末端产物ATP过量产生时,D被抑制,机体因此可功能性地利用乙醛酸循环,避开产能步骤而保持 C_4 化合物的供应。

从图1可以看到,从葡萄糖开始的代谢流在进入TCA以前,有四处可以发生碳架物质转向而合成氨基酸。图中:①6-磷酸葡萄糖可依HMP途径,经5-磷酸核糖然后合成核糖族

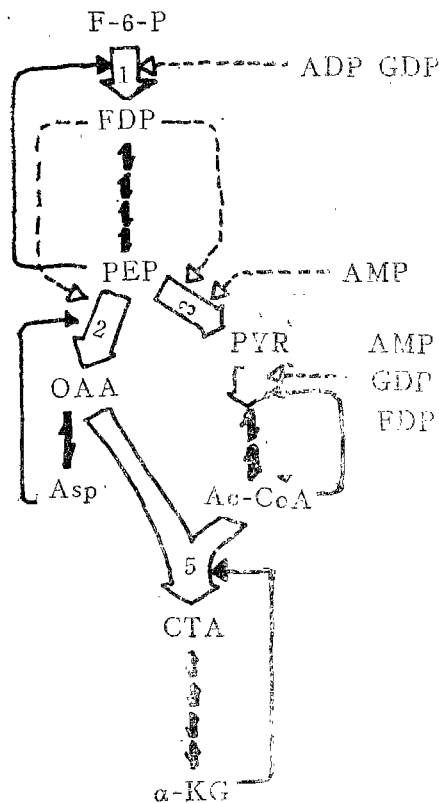


图2 EMP途径与三羧酸循环的部分反应序列 $\rightarrow$ 在生理学条件下不可逆的反应, $\rightleftharpoons$ 可逆反应, $\triangleleft$ —抑制, $\triangleleft \cdots$ 激活
①PFK, ②PEPC, ③PK,
④丙酮酸脱羧酶(丙酮酸脱氢酶多酶体系中三组分之一) ⑤CS

氨基酸 His 途中用到 Asn、Glu, 起氨基转移作用, 用到 ATP 参与合成)。② 3-磷酸甘油酸转向合成丙糖族氨基酸 Ser、Gly 和 Cys (途中 Glu 参与了氨基酸转移作用)。③ PEP 与 HMP 途径中生成的 4-磷酸赤藓糖一起合成芳香族氨基酸 Phe、Trp 和 Tyr (途中 Glu 参与了氨基转移作用)。④ PYR 转向合成 PRY 族氨基酸 Ala、Leu 和 Val (途中用到 Glu 转氨基, 用到 Ac-CoA 参与合成)。碳架物质转向使用势必减少其进入 TCA 环的量, 因而从大局上减少进入 Glu 族氨基酸和 Asp 族氨基酸合成代谢流中碳架物质的量。

值得注意的是芳香族氨基酸的合成还与 HMP 途径有密切的关系; 反过来经 HMP 途径合成的核糖族氨基酸的合成也与经 EMP 途径、TCA 环合成的 Glu 有密切关系。因此, 氨基酸的合成与碳架物质在 EMP 和 HMP 途径之间的分配有关, 这个分配情况不但与细菌的种类密切相关, 而且与细菌所处的条件也有一定关系。如果能有目的地去研究有关氨基酸育种出发菌的 EMP 途径及 HMP 途径之间碳架物质的分配关系 (特别是几个变构酶的调节情况), 或许可以促进氨基酸、特别是芳香族氨基酸的菌种选育及发酵法生产。

三、营养物质的进入细胞及目的氨基酸在培养基中的累积

以糖质原料发酵生产氨基酸的过程至少包括糖质进入细胞、新陈代谢在胞内累积目的氨基酸和目的氨基酸被分泌至培养基等三个阶段。此外, 氨基酸的生产过程还包括细菌细胞的适度生长和生命活动的维持。

单考虑细胞内的碳架物质等的代谢是不够的, 还必须考虑营养物质进入细胞及目的产物排出细胞的问题, 也就是营养物质通过细胞膜的运输过程。

关于细菌的运输已有专著^[14], 但该书内容偏重于细胞的吸收, 下面的叙述着眼于进与出两个方面。营养物质种类繁多, 与氨基酸产量直接有关的是糖。Doelle^[9]指出, 现在确信, 关于糖穿过细胞进入细胞的最合理的机制是基团转移。基团转移必须借助依赖于 PEP 的磷酸转移酶系统 (PTS)。用这个系统, 每输送一个葡萄糖分子就需要消耗一分子 PEP (PEP 同时转化成 PYR)。Romano^[15]等人曾研究了 PTS 的生物分布问题。PTS 主要存在于具有 EMP 途径降解葡萄糖的兼性厌氧菌中, 而不存在于只靠 ED 途径或磷酸酮缩酶途径降解葡萄糖的细菌中。推测可能是因为 EMP 途径从一个分子葡萄糖可得到两个分子 PEP, 其中一个分子 PEP 可用于 PTS。两 ED 途径或磷酸酮缩酶途径中每分子葡萄糖只能得一个分子 PEP, 若用于 PTS, 途径将没有任何能量盈余^[14]。在大肠杆菌中存在透性酶和 PTS 两个运输系统。氨基酸生产上常用的棒杆菌、短杆菌属的细菌是兼性厌氧或需氧菌, 推测起来具有 PTS。PTS 消耗 PEP, 是否会影响到经 PEPC 催化的从 PEP 到 OAA 的羧化过程, 从而影响到 Asp 族氨基酸和 Glu 族氨基酸对葡萄糖的转化率, 是否会影响到芳香族氨基酸的产率和转化率, 这还有待于研究。

Glu 能在细胞内连续合成主要是因为特定的条件下 Glu 能连续地排出细胞。一般认为 Glu 的排出是顺 Glu 浓度梯度的扩散现象^[16]。

Glu 生产菌的生理特征之一是对生物素的需求, 而培养基中的生物素的含量又与 Glu 排出细胞发生关系。能引起最大生长的亚适量的生物素的存在能导致 Glu 的过量合成并在培养基中累积, 但当存在过量生物素时 Glu 生成能力下降, 并有乳酸、琥珀酸等等其它化合物合成^[17]。油酸能替代生物素, 不但对产 Glu 菌的生长, 而且对 Glu 在培养基中的累积起作用^[18]。在有限制地提供油酸的情况下, 产疏短杆菌的油酸需求型突变株也能在生物素丰富的培养基

中累积Glu^[19]。利用 β -内酰胺类抗菌素(如青霉素和头孢霉素C^[20])和C₁₆—C₁₈饱和脂肪酸成分的表面活性剂^[21]也能使Glu生产菌在生物素丰富的培养基(如含甘蔗或甜菜糖蜜)的培养基中大量累积谷氨酸。

生物素、油酸或C₁₆—C₁₈饱和脂肪酸会使细胞膜的脂肪酸含量,特别是油酸和软脂酸含量发生变化,从而导致细胞膜渗透屏障对Glu的透性的改变^[22]。在油酸和其它脂肪酸的合成中,其第一步即从Ac-CoA到丙二酸单酰辅酶A需要Ac-CoA羧化酶催化。而这个酶需要生物素作为它的辅基,并受C₁₆—C₁₈饱和脂肪酸的抑制^[23]。青霉素的作用被认为是引起细胞壁的不完全合成,从而导致谷氨酸分泌^[24,25,26]。抗生素中还有D-环丝氨酸、邻甲氨酰-D-丝氨酸,因为它们的结构与D-Ala类似而抑制细胞壁肽聚糖的合成。

另一方面,对于以正烷烃为碳源的细菌而言,不能利用生物素或油酸缺陷型来生产Glu^[27],这是因为在那些细菌中,脂肪酸来源于烷烃降解而不是来源于前述的Ac-CoA开始的脂肪酸合成。曾从同化正烷烃的棒杆菌中分离出一株3-磷酸甘油:NADP氧化还原酶缺损的甘油缺陷株^[28,29],该菌株在无青霉素的情况下,靠加入0.01%甘油能从正烷烃生产Glu,这时Glu在胞外累积取决于磷脂分子的必要成分甘油,在低水平的细胞磷脂情况下谷氨酸产量最高。曾获得一甘油缺陷型突变株,不论是用正烷烃还是糖质原料,只要甘油在亚适量水平,都能高产Glu(与生物素、油酸、饱和脂肪酸等无关)。

生物素过量将使膜对Asp和Glu透性变小(难以排出),由于Glu对自身合成的反馈调节,将有利于胞内合成Asp,进而合成在这样的环境条件下易排出细胞的Lys、Thr。

用黄色短杆菌进行的研究表明^[30,31]:①该菌对Glu的吸收是一种主动吸收,而且这种吸收随培养基中葡萄糖和NH₄⁺浓度的减少而增加,随培养基中Glu浓度的增加而增加;因而在Glu发酵中随培养基中Glu浓度的上升和残糖的下降,Glu在培养基中的累积将受到细胞对它的吸收的逆向干扰。使用丧失这种主动吸收能力的突变株进行Glu发酵可以获得Glu高产;②该菌对Glu的吸收受Asp的专一地、完全地竞争性的抑制,而Asp的吸收同样地被Glu抑制,因此Glu和Asp似乎靠共同的系统送入细胞,而且这个系统对Glu和Asp两者是高度专一的。椎尾^[32]等的研究表明黄色短杆菌对Thr的吸收依赖于Na⁺的浓度梯度,因而不是主动吸收,户坂^[33]等研究了乳糖发酵短杆菌的具硫代赖氨酸(AEC)抗性的Lys高产突变株,发现其Lys的排出是由主动运输体系进行的,并且能抵抗相当于菌体内Lys浓度五倍的培养基中的Lys浓度进行逆向运输。还有报道,对谷氨酸棒杆菌阻止供氧,其Lys生产会明显地受到不可逆的抑制,这种抑制会随着菌体Lys含量的显著增加以及磷酸含量的增加而加强。供氧的减少会引起细胞膜结构的变化,从而减少Lys的排出^[34,35]。

四、谷氨酸合成代谢调节

许多氨基酸的合成过程中都有Glu参与反应。从图1中可看到嘌呤、嘧啶的合成亦都有Glu及Asp参与反应,而且不论是对Asp还是对Glu,从葡萄糖到PEP这一段代谢流是公共的,因而在讨论时可以假设这一段代谢流对Glu或Asp族氨基酸合成的影响大致是一样的。当然从葡萄糖到PEP可以沿不同的降解途径降解,碳架物质在不同途径中的分配比例将不同程度地影响各族氨基酸的合成代谢,同样将影响Glu和Asp族氨基酸的合成代谢。

关于Glu的发酵机制国内已有详细的论述^[36],这里作一些补充说明。在Glu产生菌中,葡萄糖经EMP途径和TCA环到 α -KG,再从 α -KG通过还原性氨基化作用生成Glu。以前

累积的,因此它们若同时存在,即使浓度很低也会强烈地抑制黄色短杆菌中的这个酶^[48]。第七个酶KD和个酶复合体,它包括三个酶成分(即 α -KG脱氢酶、硫辛酸琥珀酰基转移酶和硫辛酰胺脱氢酶)。因为TCA环的这个酶与Glu合成途径的GD竞争共同底物 α -KG,因而这个酶是决定Glu产率的主要因素之一。黄色短杆菌的这个酶复合物的活性对NAD和 α -KG绝对专一。琥珀酰辅酶A、CAA、OAA强烈抑制其活力。PYR、还原型NAD也抑制其活力,ATP对它的抑制较轻。CTA和它的代谢产物阻遏这个酶的形成^[38]。第八个酶Asp氨基转移酶(TA)催化由Glu供氨基的从OAA合成Asp的反应,但它不受Asp专一途径的反馈调节。应该注意到在CAA水合酶的催化下,CTA、CAA和ICA处于平衡之中,Glu对GD的抑制, α -KG对ID的抑制以及CAA对CS的抑制可能代表Glu合成的一个顺序控制机制。

从图3还可看到在Glu合成途径中,包含了TCA环的前半部, α -KG是处于Glu合成和TCA环后半部分两者分岔处的中间产物;同样,与CAA处于平衡状态的ICA是TCA环与乙醛酸循环的分岔处的中间产物。被分岔处分出的途径“片段”分别受其对应的终产物的调节。这样,当Glu过量时,将通过调节GD来防止其自身的过量合成,而又不打乱TCA环。同样,过量的 α -KG(可能是由GD和TCA环的KD两者的反馈调节而提供)将通过ID调节其自身的合成而不打乱乙醛酸循环。作为ID与IL受反馈控制的结果,ICA过量(也就是CAA过量)会抑制CS以控制其自身的合成。

葡萄糖降解到PEP以后,其碳架物质分成去PYR方向和OAA方向两个流向。暂且不去考虑去PYR方向(后面另有讨论),先看去OAA方向的代谢流。从OAA开始又要分两支,碳架物质的分配主要取决于OAA对CS和TA亲和力的相对大小。实验指出,在分岔点OAA处,碳架质将优先与CS结合而受其催化,生成CTA^[40,51]。

假如细胞膜有利于Glu的排出,那么由胞内Glu浓度而引起的负反馈调节机制不起作用,PEP在PEPC的催化下固定二氧化碳生成OAA,OAA优先合成CTA,经CAA、ICA和 α -KG形成Glu。由于黄色短杆菌中KD受CAA、OAA的抑制,受CTA的阻遏,胞内较高浓度的OAA、CAA和CTA等将削弱KD,从而防止碳架物质过多地流向TCA环的后半部。同时,控制乙醛酸循环的ID同样受到OAA和 α -KG的调节,因而流向乙醛酸循环的碳架物质也是少的。此外培养基中的无机盐(包括KCl、NaCl、NH₄Cl也会抑制KD,激活GD^[50]。所有这些都有利于碳架物质优先地集中地流向Glu。合成的Glu顺利地排出细胞,并在培养基中累积。

假如培养基中生物素浓度高,膜对Glu和Asp透性(指排出)均会降低。胞内优先合成的Glu先在胞内累积,其浓度增高到一定程度就会引起对CS的顺序负反馈控制(见图3),从而全盘地破坏前面所述OAA碳架物质集中流向Glu的格局。来自PEP、TCA环(包括乙醛酸循环)等方向的OAA碳架物质会因CS的削弱而较少地用于合成CTA;相反TA在细胞内一定浓度的Glu推动下将Glu的氨基转移给OAA,从而使碳架物质主要流向Asp方向。如果由于遗传和环境条件的限制Asp不能继续进行合成代谢(指合成易排出细胞的其它氨基酸),那么Asp亦将在细胞内积累,当其浓度增加到一定值就会与胞内的Glu一起对PEPC进行反馈调节,阻止PEP的羧化,从而使PEP更多地转向PYR方向。由于CS缺失而导致的CA-CoA异常高浓度(可从醋酸的产生而判断),将反作用于PEPC的反馈抑制^[42],致使该突变株过量合成Asp。

五、天冬氨酸族氨基酸合成代谢调节

关于 Asp 族氨基酸合成代谢路线及其调节方式早有报道^[52-58,7],但以往的研究着重在合成途径中自 Asp 以后的代谢及其调节。实践证明,对 Asp 以后的合成代谢及其调节机制的研究以及在此基础上对菌种进行的改造,对 Asp 氨基酸的育种工作来说是关键性的。但是,单靠对这一段代谢流的人工调节,目的氨基酸对葡萄糖的转化率仍较低,与理论推算值相差甚远。最近十年来,研究者们逆 Asp 族氨基酸合成代谢流而上,寻找消耗碳架物质又无助于目的氨基酸合成代谢环节,并设法堵塞这些漏洞,从而使 Asp 族氨基酸菌种的产酸率及转化率上升到新的水平。

图 4 表示从 PEP 开始和碳架物质在 Glu 及 Asp 族氨基酸的合成代谢流中的分布,从 PEP 到 Asp 族氨基酸终端产物一共有六处发生了碳架物质的分配问题。这六处已分别列入图 5。

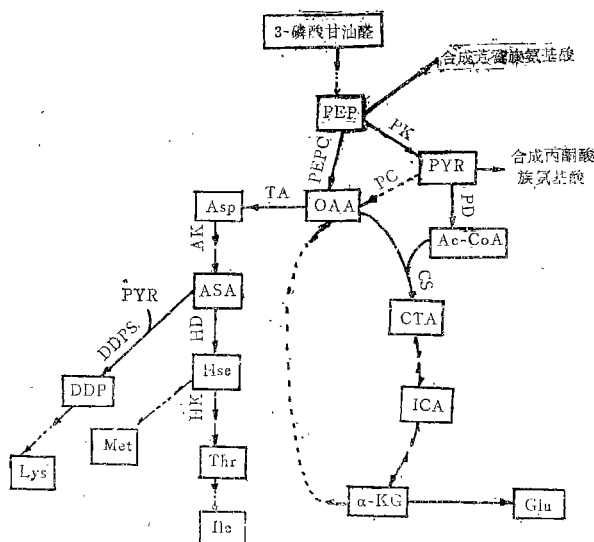


图 4 碳架物质在谷氨酸及天门冬氨酸族氨基酸合成代谢流中的分布

第一处是 PEP。它本身主要来自酵解途径的中间产物 3-磷酸甘油醛,除了用于合成芳香族氨基酸外,要在形成 OAA 和形成 PYR 之间进行分配。已有报道:在黄色短杆菌中,PEP 对 PEPC 的亲合性只有 PEP 对 PK 的亲合性的十分之一,PEP 优先合成 PYR^[42]。PK 所催化的反应过强势必减少流向 OAA (即去 Glu 或 Asp 族氨基酸方向)的碳架物质的量。

第二处是 PYR。它有四个去向。①用于形成 Ac-CoA;②用于合成 OAA;③用于合成 PYR 族氨基酸;④用于 Lys 合成。在乳糖发酵短杆菌的无细胞提取液中 PD 的水平比 PC 要高得多,而且 PC 对生物素有依赖性^[59]。在黄色短杆菌的无细胞提取液中不能测得 PC 的存在^[60]。第③个去向显然会影响 Glu 和 Asp 族氨基酸的产酸率和转化率,因为这个去向消耗碳架物质而合成非目的氨基酸。第④个去向似乎在一定程度上可满足 Lys 大量合成的需求。

第三处是 OAA。它自身主要来自:① PEP 的羧化;② PYR 的羧化(若细胞中 PC 起作用);③ TCA 环和乙醛酸循环运转而再生。其去向主要有两个,①与 Ac-CoA 一起合成 CTA;②合成 Asp。本文第四部分已述此处碳架物质优先流向 CTA。

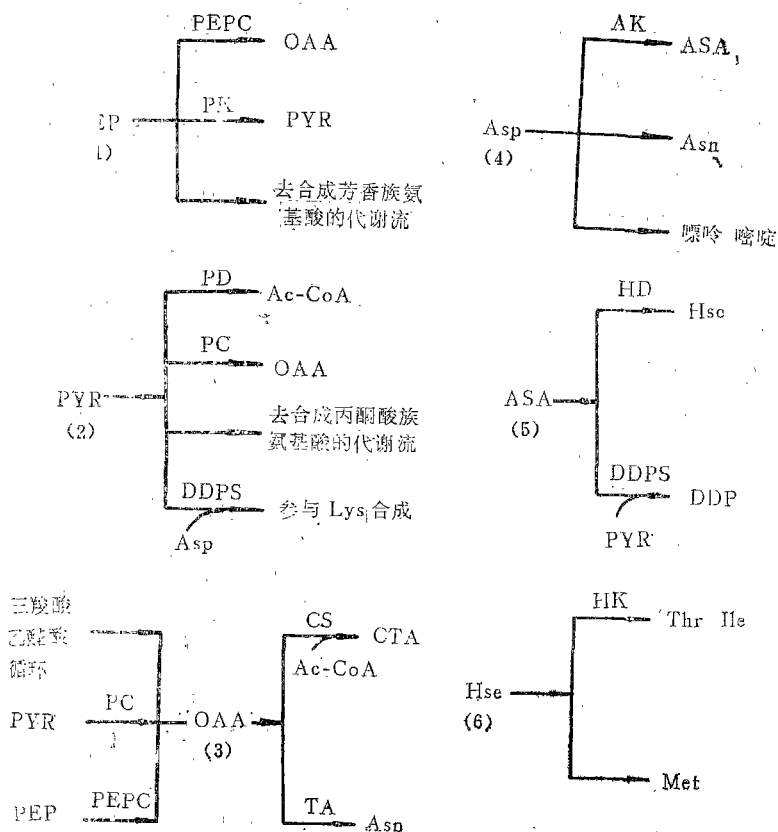


图5 碳架物质的六个分配处

第四处是Asp。它自身主要来自 OAA，主要有两个去向，① 在天门冬氨酸激酶 (AK) 作用下合成天冬酸-β-半醛 (ASA)，显然这对 Asp 族氨基酸的合成有利 (Asn 除外)。② 合成嘌呤、嘧啶以有利于细菌细胞生长。

第五处是ASA，它主要有两个去向，① 在 HD 作用下生成 Hse。② 在 DDP 合成酶的作用下与 PYR 结合成 DDP。在黄色短杆菌中 ASA 优先流向 Hse^[61,62]。

第六处是Hse，它主要有两个去向，① 去Thr和Ile。② 去Met。

从第四处到第六处的调节可在以往的综述中读到，第三处碳架物质的分配情况已在第四部分说明。对照图4看第一处，PEP 优先流向 OAA，不论对 Glu 族还是对 Asp 族氨基酸的合成均有利，为此主要可从削弱丙酮酸激酶 (PK) 和加强 PEPC 着手。由于 PK 催化的反应是从葡萄糖形成 PYR 的必经的反应，因此从不能在以葡萄糖为唯一碳源的培养基上生长而能在以醋酸为唯一碳源的培养基上生长的突变株中，可挑选到 PK 缺损型突变株^[63]，从而达到削弱 PK 的目的。PK 缺损已给 Lys 育种带来好处，同时缺损 PK 和 Hse 脱氢酶 (HD) 的一突变株产 Lys 盐酸盐 50g/L，Lys 盐酸盐对葡萄糖的转化率达 50%^[64]。因为 PK 是从 PEP 生成 PYR 的主要酶，所以 PK 缺损将限制 PYR 方向的合成，使碳架物质流相对集中。PEPC 酶水平的提高能使 PEP 碳架物质流向 Glu 和 Asp 族氨基酸的共同前体 OAA，将有利于这些氨基酸的形成。此外，在这个酶的作用下，细菌将环境中的二氧化碳固定到碳架物质中，从而提高目的氨基酸对葡萄糖的转化率。细菌的 Asp 结构类似物抗性突变株中，可以挑选到

具有对 Asp 脱敏的 PEPC 的菌株。

第二处的情况似乎与细菌的种类有关。在黄色短杆菌中没有 PC 存在^[60], 因此就没有图中第二个去向, 而留下的三个去向中除第四个去向与 Lys 的合成直接有关外, 第一、三两个去向均消耗碳架物质而与 Asp 族氨基酸的合成无直接关系。第三个去向的阻塞对 Asp 族氨基酸的累积有利, 但由 PD 催化的第一个去向直接关系到能量的产生, 因而不可过分降低 PD 的水平。乳糖发酵短杆菌的 Lys 产率与 PD 之间的关系先有报道^[65], 不久椎尾等^[66]育成了 PK 与 PD 均缺损的黄色短杆菌突变株, 其产 Lys 能力是至今最高的(转化率达 55%)。实际上这菌株累积了几乎所有有利于过量合成 Lys 的生理特性(包括 PK、PD、CS 和 HD 的低活性, PEPC 的脱敏性以及菌株对 AEC 的抗性)。

乳糖发酵短杆菌具有依赖于生物素的 PC。PC 强大固然可以获得更多的 OAA, 但又要防止 PD 的过分削弱。这样似乎可以找到一个 PC/PD 的最佳比值, 在最佳情况下对 Asp 族氨基酸的合成最有利。从 PYR 的结构类似物氟丙酮酸(FP)对 PD(实际上是 PD 复合体的第一个酶组分丙酮酸脱氢酶)有抑制作用出发, 可从对 FP 有不同敏感度的突变株中选择具有合适 PC/PD 比值的 Lys 高产株。用这个方法得到的一突变株在适宜的条件下产 Lys 达 70g/L, 转化率达 50%^[67]。

六、氨基酸菌种选育的新动向

为了获得更好的氨基酸菌种, 可以对出发株顺序地迭加因诱变而发生的遗传标记。然而由于先前突变的回复、抗性的交叉, 还有多重缺陷带来的生长迟缓, 往往使育种的计划无法按部就班地去完成, 特别是在调节机制相当复杂或代谢分支途径较多的情况下。近年来, 在氨基酸育种工作中除了主要采用常规的诱变筛选方法有目的地选育特定的营养缺陷突变株和调节突变株外, 已引进了更前沿的育种技术, 如原生质体融合和遗传工程技术。

七十年代末, 用转导方法构建了肠杆菌科的粘质沙雷氏菌的一些调节突变株, 其中一株产苏氨酸的粘质沙雷氏菌的 AK 和 HD 对反馈抑制均不敏感而且有相当高的酶水平, 在含糖 16% 的培养基中释放 25g/L 苏氨酸^[68-70]。用类似的方法还构建成功了粘质沙雷氏菌高产 His^[71] 和 Arg^[72] 的菌株。八十年代初, 通过并发转导构建了另一株高产 Thr 的粘质沙雷氏菌, 产酸达 40.3g/L (培养基中糖 15%, Ile 10 mM, Met 10 mM)^[73]。

原生物体融合技术在氨基酸菌种选育中的主要作用是育出单靠常规诱变筛选难以育成的菌株和改进氨基酸菌种的生产性能。户坂等^[61]采用原生质体融合的方法将对 Lys 有需求这个遗传标记引进一株既产 Thr 同时又产 Lys 的乳糖发酵短杆菌中, 得到对 Lys 有需求的重组菌株。原菌株产 Thr 13g/L, 同时产 Lys 6g/L, 新株产 Thr 18g/L, 不产 Lys。若要通过常规诱变筛选的方法给产 Thr 同时又产 Lys 的菌株加上 Lys 需求的遗传标记是困难的, 因为未发生变化的出发菌株的细胞分泌的 Lys 扩散到培养基中会干扰 Lys 需求型突变株在平板上被检出。同一篇文章中还报道了采用原生质体融合的方法来提高和改进 Lys 菌种的生产性能的成果。一株 Lys 产生菌经历了多次诱变育种后对葡萄糖的消耗速度变慢了。为了改进菌株的生产性能, 将它与一株能迅速耗用葡萄糖的菌进行原生质融合。结果重组的新株葡萄糖消耗速率提高到原来的三倍, 原消耗葡萄糖 130g/L 需 100 小时, 现缩短到 30 小时, 同时产酸速率也达亲株的三倍而转化率没有下降。

现在正试图通过遗传工程技术去提高细菌生产氨基酸的能力。已报道从没有色氨酸操纵

子的突变株和携带色氨酸操纵子的突变株的质粒建成一株大肠杆菌^[74]。还有人将能过量合成 Thr 的大肠杆菌结构类似物抗性突变株的 Thr 操纵子(整个操纵子或该操纵子的一部分)与质粒 PBR332 结合,然后将这种杂种质粒转移入合适的受体。此外还将参与糖的利用的基因引入所得到的工程菌。特殊的突变操作可保证带有杂种质粒的菌株的稳定性。该菌株在合适的发酵条件下产 Thr 达 55g/L,这时氨基酸对糖的转化率已超过 40%^[74]。

尽管目前还有难题未解决,如导入基因的不稳定性和当把组建的菌株用于工业生产时出现的不稳定性等,然而包括转化、转导、原生质体融合及遗传工程方法将在氨基酸,特别是那些在野生菌株中受严格反馈控制的氨基酸的生产菌的育种中已越来越表现出优越性。

文中缩写说明

Ac-CoA	乙酰辅酶 A	ID	异柠檬酸脱氢酶
AEC	硫代赖氨酸	IL	异柠檬酸裂合酶
AK	天门冬氨酸激酶	KD	α -酮戊二酸脱氢酶
ASA	天门冬氨酸- β -半醛	α -KG	α -酮戊二酸
CAA	顺乌头酸	OAA	草酰乙酸
CS	柠檬酸合成酶	PC	丙酮酸羧化酶
CTA	柠檬酸	PD	丙酮酸脱氢酶
DDP	二氢吡啶二羧酸	PEP	磷酸烯醇式丙酮酸
DDPS	二氢吡啶二羧酸合成酶	PEPC	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶
EDP	1,6-二磷酸果糖	PFK	磷酸果糖激酶
FP	氟代丙酮酸	PK	丙酮酸激酶
GD	谷氨酸脱氢酶	PTS	磷酸转移酶系统
HD	高丝氨酸脱氢酶	PYR	丙酮酸
Hse	高丝氨酸	SCA	琥珀酸
ICA	异柠檬酸	TA	(天门冬氨酸)氨基转移酶

(氨基酸及其它生物化学中常用的缩写未予标出)

参 考 文 献

- [1] Nakayama, K., Process Biochem., 12, 4, 1976
- [2] Nakayama, K., "Amino Acids" in "Prescott and Dunn's Industrial Microbiology" 4th Ed (G. Reed, ed), AVI Publishing Co. Westport connecticut, 1982
- [3] Kinoshita, S. et al., Economic Microbiology, Vol 2, (Rose, A.H., ed) 209—261, 1978
- [4] Hirose, Y. et al., In "Microbiological Technology" 2nd Ed., Vol 1, 211—240, Academic Press, New York, 1979
- [5] Soda, K. et al., "Amino Acids" in "Biotechnology" Vol 3, 477—530, Verlag Chemie, 1983
- [6] Karasawa, M. & Tosaka, O. et al., Agric. Biol. Chem., 50, 339—346,

1986

- [7] Tosaka, O. et al., *ibid.*, **42**, 1181, 1978
- [8] Tosaka, O. et al., *ibid.*, 1501, 1978
- [9] H.W. 多伊尔, 《细菌的新陈代谢》(郭杰炎等译)pp. 207—259, 科学出版社, 1983
- [10] 焦瑞身, “微生物的代谢”, 《微生物学进展》pp. 199—224, 农业出版社, 1984
- [11] 俞大绂、李季伦, 《微生物学》, (第2版), 科学出版社, 1985
- [12] Sanwal, B. D., *Bacteriol. Rev.*, **34**, 20—39, 1970
- [13] Krebs, H. A., *Advan. Enzyme Regul.*, **8**, 335, 1970
- [14] Rosen, B. P. (ed), *Bacterial Transport (Microbiology Series Vol 4)*, Marcel Dekker, New York, 1978
- [15] Romano, A. H., *J. Bacteriol.*, **104**, 808, 1970
- [16] 植村定治郎等编, 《发酵与微生物》I, (天津工业微生物研究所译), p.313, 科学出版社, 1979
- [17] Tanaka, K. et al., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **34**, 593, 1960
- [18] Okumura, S. et al., *ibid.*, **36**, 204, 1962
- [19] Kanazaki, T. et al., *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1416, 1967
- [20] Summerson, N. L., U.S. Patent, 3, 080, 297, 1962
- [21] Takinami, K. et al., *Agric. Biol. Chem.*, **25**, 114, 1964
- [22] Kanazaki, T. et al., *ibid.*, **33**, 771, 1969
- [23] Kamiry, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 386, 1976
- [24] Shiio, I. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **53**, 333, 1963
- [25] 石桥丸应, 《病理生理与药物作用图解》, (姚应鹤等译) pp. 5—8, 上海科学技术出版社, 1933
- [26] Nakao, Y. et al., *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2399—2401, 1973
- [27] Nakao, Y. et al., *ibid.*, **36**, 490—496, 1972
- [28] Nakao, Y. et al., *ibid.*, **34**, 1875, 1970
- [29] Kikuchi, M. et al., *ibid.*, **36**, 809, 1972
- [30] Shiio, I. et al., *ibid.*, **46**, 493—500, 1982
- [31] Shiio, I. et al., *ibid.*, **47**, 983—990, 1983
- [32] Shiio, I. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **73**, 1185, 1973
- [33] 滝波弘一等, 农化大会(昭和50, 52年, 醸工大会(昭和51年)要旨
- [34] Hilliger, M. et al., *Biotechnol. Lett.*, **13**, 219, 1981
- [35] Hanel, K. et al., *ibid.*, **3**, 361, 1981
- [36] 张克旭主编, 《氨基酸工艺学》, pp. 75—100, 轻工出版社, 1983
- [37] Shiio, I. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **50**, 164, 1961
- [38] Shiio, I. et al., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1897—1904, 1980
- [39] Britz, M.L. & Demain, A.L., “Regulation of Metabolite Synthesis” in

“Comprehensive Biotechnology” (Murry Moo-Young ed.) Vol 1, pp.617—636, 1985

- [40] Shiio, I. et al., J. Biochem. (Tokyo), **82**, 395—405, 1977
- [41] Shiio, I. et al., *ibid.*, **84**, 647—657, 1977
- [42] Shiio, I. et al., Agric. Biol. Chem., **43**, 2479—2485, 1979
- [43] Vender, J. et al., Biochim. Biophys. Acta, **90**, 218—220, 1965
- [44] Vender, J. et al., J. Bacteriol., **90**, 1304—1307, 1965
- [45] Hanson, R. S. et al., *ibid.*, **93**, 1777—1787, 1967
- [46] Flechtner, V. R. et al., Biochim. Biophys. Acta, **184**, 252—262, 1969
- [47] Fortnagel, P., *ibid.*, **222**, 290—298, 1970
- [48] Ozaki, H. et al., J. Biochem. (Tokyo), **64**, 355—363, 1968
- [49] Shiio, I. et al., *ibid.*, **64**, 45—53, 1968
- [50] Shiio, I. et al., *ibid.*, **68**, 633—647, 1970
- [51] Gelfand, D. H. et al., J. Bacteriol., **130**, 429—440, 1977
- [52] 中森茂等, 《发酵と代谢》, No.36, 34—48, 1977
- [53] Tosaka, O. et al., Agric. Biol. Chem., **43**, 265—270, 1979
- [54] Kase, H. et al., *ibid.*, **35**, 2089, 1971
- [55] Tosaka, O. et al., *ibid.*, **42**, 745—752, 1978
- [56] Nakayama, K. et al., U.S. Patent 3, 708, 395, 1973
- [57] Shiio, I. et al., J. Biochem. (Tokyo), **68**, 311, 1970
- [58] Shiio, I. et al., Agric. Biol. Chem., **35**, 424, 1971
- [59] Tosaka, O. et al., *ibid.*, **43**, 491, 1979
- [60] Shiio, I. et al., J. Biochem. (Tokyo), **48**, 110, 1960
- [61] Shiio, I. et al., Agric. Biol. Chem., **37**, 653—659, 1973
- [62] Miyamori, M. & Shiio, I., Biochem. (Tokyo), **65**, 849, 1969
- [63] Oyama, A. & Shiio, I., Abstracts of Papers, the 42nd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, p.535, 1969
- [64] Shiio, I. et al., Agric. Biol. Chem., **47**, 1596, 1983
- [65] 户坂修、滝波弘一: 发酵と工业, Vol 40(2), 110—127, 1982
- [66] Shiio, I. et al., Agric. Biol. Chem., **48**, 3091—3098, 1984
- [67] Tosaka, O. et al., *ibid.*, **49**, 1305—1312, 1985
- [68] Komatsubara, S. et al., Appl. Environ. Microbiol., **35**, 834, 1978
- [69] Komatsubara, S. et al., *ibid.*, **36**, 777, 1979
- [70] Komatsubara, S. et al., *ibid.*, **36**, 1045, 1979
- [71] Kisumi, M. et al., *ibid.*, **34**, 465, 1977
- [72] Kisumi, M. et al., J. Biochem. (Tokyo), **84**, 881, 1978
- [73] Debabov, V., Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms, pp.247—258, Kodansha, Tokyo, 1982
- [74] Aiba, S. et al., Appl. Environ. Microbiol., **43**, 289, 1982

87044

氨基酸高产菌株的选育及其机理研究的新进展《无锡轻工业学院学报》1987年,第6卷,第4期

关键词 谷氨酸; 赖氨酸; 苏氨酸; 微生物育种;

摘要 就谷氨酸、赖氨酸和苏氨酸产生菌的生理特性和它们的生产能力之间的关系阐述了包括代谢调节的相互作用,分泌和吸收能力,以及优良菌种的选育方法的新进展。

作者: 张星元

87044

NEW PROGRESSES CONCERNING STUDIES ON AMINO ACID—
PRODUCING STRAINS AND ITS MECHANISM 《Journal of the Wuxi

Institute of Light Industry》Vol.6, No.4, 1987

SUBJECT WORDS Glutamic acid; Lysine; Threonine; Microbial
breeding

ABSTRACT This paper concentrates on the relationship between the
physiology of producer organisms and their productivity in respect to L-
glutamate, L-lysine, and L-threonine, including metabolic regulatory
interaction, capacity for excreting and uptaking, and new development
in approaches to superproducing strains.

Author: Zhang Xingyuan