

L-赖氨酸合成代谢中 NADPH 代谢的研究进展

张伟国, 徐建中

(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: L-赖氨酸是人类和动物所必需的但自身不能合成的氨基酸之一, 它对平衡氨基酸组成、调节体内代谢平衡、提高体内对谷类蛋白质的吸收、改善动物营养、促进生长发育均有重要作用。L-赖氨酸的发酵不同于L-谷氨酸的发酵, 每形成1 mol的L-赖氨酸需要消耗4 mol的NADPH, 而每生产1 mol的L-谷氨酸只需消耗1 mol的NADPH, 因此在L-赖氨酸发酵过程中, 提高代谢途径中的NADPH量是增加L-赖氨酸产量的关键因素之一。作者从谷氨酸棒杆菌中L-赖氨酸生物合成途径、NADPH代谢以及与NADPH代谢相关的酶三个方面概述了L-赖氨酸合成代谢中NADPH代谢的研究进展。

关键词: L-赖氨酸; 代谢途径; NADPH; 谷氨酸棒杆菌

中图分类号: Q 591.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2012)10—1009—09

Research Progress on NADPH Metabolism in Constructive Metabolism of L-lysine

ZHANG Wei-guo, XU Jian-zhong

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China)

Abstract: As one of the essential amino acids for human beings and animals and one of the first restrictive amino acids for human and plants, L-lysine has many functions, such as balancing amino acid composition, adjusting in the body metabolic balance, accelerating the rate of absorption of protein, promoting the growth and development of animals, improving the utilization of protein. It takes around 4 mol NADPH to produce 1 mol L-lysine. However, it takes around 1 mol NADPH to produce 1 mol L-glutamic acid. Therefore, the improvement of NADPH in the pathway of L-lysine fermentation is one of the key factors to increase the output of L-lysine. This paper stated the research evolution focus on aspects of the L-lysine biosynthetic pathways of *Corynebacterium glutamicum*, the metabolism of NADPH and the NADPH-metabolizing enzymes.

Keywords: L-lysine, metabolic pathway, NADPH, *Corynebacterium glutamicum*

收稿日期: 2012-07-17

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

L-赖氨酸属于天冬氨酸家族氨基酸,为人类和动物所必需的自身不能合成的氨基酸之一,被广泛用于饲料添加剂、食品强化剂和医药产品等方面,其中90%以上的赖氨酸产品用作饲料添加剂^[1]。赖氨酸虽然存在两种旋光异构体:L-型(左旋)和D-型(右旋)和DL型(消旋,但人类和动物可吸收利用的只有L-型^[2]。随着对氨基酸需求量的不断增加,大量的氨基酸产生菌种筛选程序相继出现。自从1960年以谷氨酸产生菌为出发菌株经紫外诱变获得一株谷氨酸棒杆菌营养缺陷型变异株,从此开始了发酵法工业生产L-赖氨酸^[3]。谷氨酸棒杆菌及亚种,如黄色短杆菌、乳酸发酵短杆菌和百合棒杆菌等是工业上发酵生产L-赖氨酸的重要生产菌种。谷氨酸棒杆菌利用1 mol 丙酮酸、1 mol 草酰乙酸和2 mol NH₄⁺同时利用4 mol NADPH作为还原力开始合成L-赖氨酸^[4]。随着对生产菌种和发酵过程的不断优化,逐渐满足当今对L-赖氨酸的需求,同时也使得利用可再生资源发酵生产L-赖氨酸得以实现。作者围绕谷氨酸棒杆菌中L-赖氨酸生物合成途径、NADPH代谢以及与NADPH代谢相关的酶和国内外关于NADPH的研究进展4个方面综述了L-赖氨酸代谢途径中NADPH新陈代谢的研究进展及应

用前景。

1 谷氨酸棒杆菌中L-赖氨酸生物合成途径

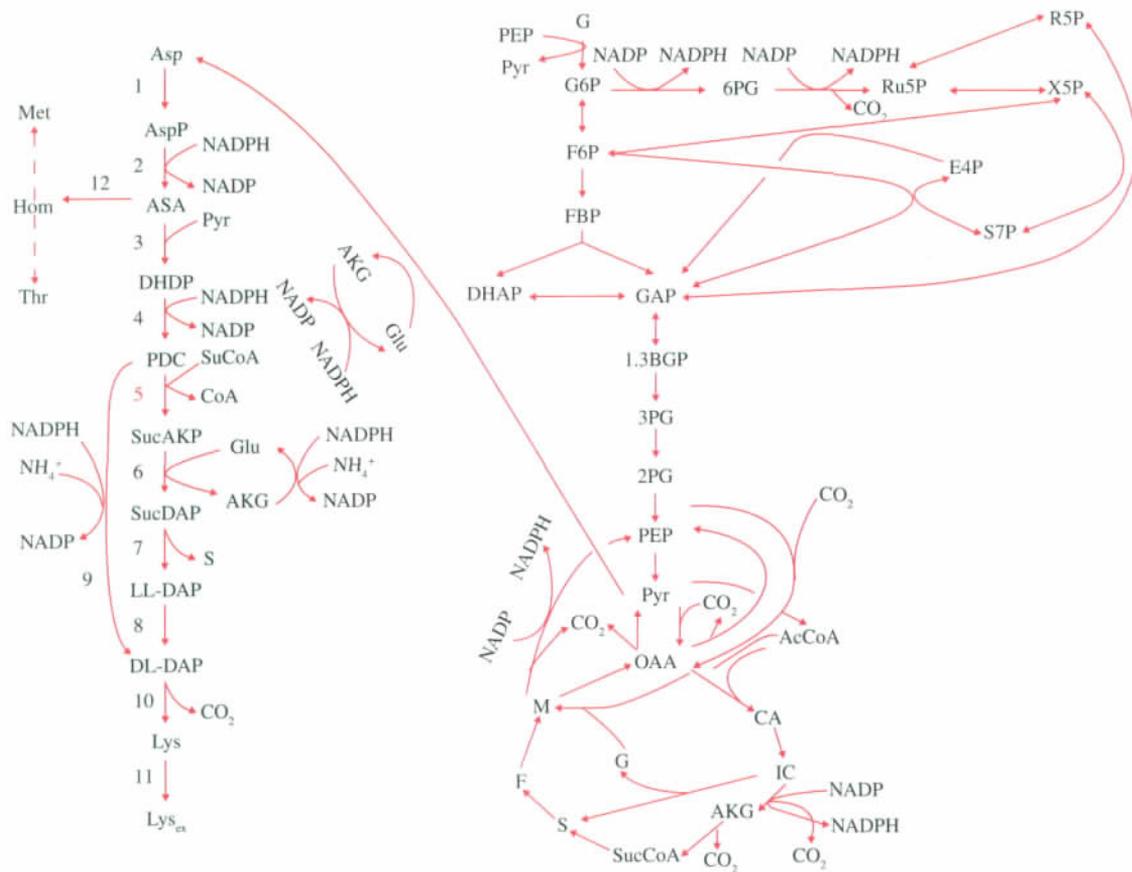
1.1 生产菌种——谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌细胞短杆至小棒状,有时微弯曲,两端钝圆,不分枝,单个或成八字排列,革兰氏阳性,无芽孢,不运动、菌落湿润、圆形的好氧菌。20世纪50年代首次发现谷氨酸棒杆菌具有氨基酸分泌能力,随后通过随机诱变获得产L-谷氨酸的谷氨酸棒杆菌营养缺陷型菌株^[5]。自1960年日本木下祝郎、中山清等经传统诱变获得一株产L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌营养缺陷型变异株以后,谷氨酸棒杆菌包括其亚种被用作工业生产L-赖氨酸的主要生产菌种^[3]。随着对谷氨酸棒杆菌生物化学的进一步研究及其基因组的阐明,将有利于谷氨酸棒杆菌中L-赖氨酸生物合成途径的各个反应和中心代谢途径的详细了解。谷氨酸棒杆菌中存在4种中心代谢途径:EMP、PPP、TCA和乙醛酸循环,不存在ED途径^[6]。图1为谷氨酸棒杆菌L-赖氨酸生物合成途径及中心代谢途径^[4,6]。参与L-赖氨酸生物合成的酶以及编码的基因表见表1。

表1 谷氨酸棒杆菌中L-赖氨酸生物合成途径中的酶

Tab.1 Genes and enzymes involved in L-lysine biosynthesis in *C. glutamicum*

编号	基因	酶	抑制子	转录单位	转录调节子	参考文献
1	<i>lysC</i>	天冬氨酸激酶	L-赖氨酸 L-苏氨酸	<i>lysC</i>	—	
2	<i>asd</i>	天冬氨酸半醛脱氢酶	L-赖氨酸 L-苏氨酸	<i>asd</i>	—	
3	<i>dapA</i>	二氢吡啶二羧酸合酶	—	<i>dapB</i> -orf 2 ⁻ <i>dapA</i> -orf 4 ⁻	—	
4	<i>dapB</i>	二氢吡啶二羧酸还原酶	—	<i>dapB</i> -orf 2 ⁻ <i>dapA</i> -orf 4 ⁻	—	
5	<i>dapD</i>	四氢吡啶二羧酸琥珀酰化酶	—	<i>dapD</i>	—	
6	<i>dapC</i>	琥珀酰二氨基庚二酸转氨酶	—	<i>dapC</i>	—	
7	<i>dapE</i>	琥珀酰二氨基庚二酸脱琥珀酰酶	—	<i>dapE</i>	—	
8	<i>dapF</i>	二氨基庚二酸差向异构酶	—	<i>dapF</i>	—	
9	<i>ddh</i>	内消旋二氨基庚二酸脱氢酶	—	<i>ddh</i>	—	
10	<i>lysA</i>	二氨基庚二酸脱羧酶	—	<i>lysA</i>	受L-赖氨酸的抑制	
11	<i>lysE</i>	赖氨酸通透酶	—	<i>lysE</i>	受L-赖氨酸的抑制	
12	<i>hom</i>	高丝氨酸脱氢酶	—	<i>hom</i>	—	



G: 葡萄糖;G6P:葡萄糖-6-磷酸;F6P:果糖-6-磷酸;FBP:果糖-1,6-二磷酸;DHAP:二羟丙酮磷酸;GAP:甘油醛-3-磷酸;1,3BPG:甘油酸-1,3-二磷酸;3PG:甘油酸-3-磷酸;2PG:甘油酸-2-磷酸;PEP:磷酸烯醇式丙酮酸;Pyr:丙酮酸;OAA:草酰乙酸;CA:柠檬酸;IC:异柠檬酸;AKG: α -酮戊二酸;SucCoA:琥珀酰-CoA;S:琥珀酸;F:延胡索酸;M:苹果酸;6PG:6-磷酸葡萄糖酸;Ru5P:5-磷酸核酮糖;R5P:核糖-5-磷酸;X5P:木酮糖-5-磷酸;E4P:赤藓糖-4-磷酸;S7P:景天庚酮糖-7-磷酸;Asp:天冬氨酸;AspP:天冬氨酸磷酸;ASA:天冬氨酸半醛;DHDP:二氢吡啶-2,6-二羧酸;PDC:六氢吡啶-2,6-二羧酸;SucAKP:琥珀酰-2-氨基-酮庚二酸;SucDAP:琥珀酰-二氨基庚二酸;LL-DAP:外消旋二氨基庚二酸;DL-DAP:外消旋二氨基庚二酸;Lys:赖氨酸;Lys_{ex}:细胞外的赖氨酸;Glu:谷氨酸;Hom:高丝氨酸;Thr:苏氨酸;Met:蛋氨酸;AcCoA:乙酰-CoA

图1 谷氨酸棒杆菌中中心代谢途径和 L-赖氨酸生物合成途径

Fig.1 Central metabolic pathways and L-lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*

1.2 赖氨酸生物合成途径

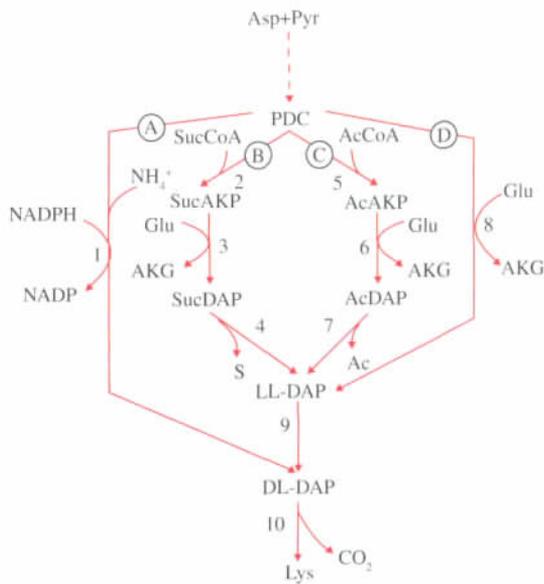
对于微生物来说,L-赖氨酸合成涉及到两个完全不同的途径:从 α -酮戊二酸和乙酰 CoA 起始的 α -氨基乙二酸途径;从天冬氨酸起始的二氨基庚二酸途径^[7]。 α -氨基乙二酸又含有两个变异型途径,主要存在于高等真菌和古生菌中,而二氨基庚二酸途径含有4个不同的变异途径,见图2。主要存在于细菌、绿藻、原虫和高等植物中,该途径还可以合成蛋氨酸、苏氨酸和异亮氨酸^[8]。作为 L-赖氨酸生产菌株谷氨酸棒杆菌利用二氨基庚二酸途径合成 L-赖氨酸,其存在两个不同的变异途径^[9]:二氨基庚二酸脱氢酶途径和琥珀酰转移酶途径。谷氨酸棒杆菌在 L-

赖氨酸生物合成过程中采用何种途径取决于培养过程中 NH_4^+ 的浓度。当 NH_4^+ 浓度高时,谷氨酸棒杆菌采用二氨基庚二酸脱氢酶途径合成 L-赖氨酸;当 NH_4^+ 浓度低时,则采用琥珀酰转移酶途径合成 L-赖氨酸^[10]。无论谷氨酸棒杆菌采用哪种途径合成 L-赖氨酸,每合成 1 mol L-赖氨酸都需消耗 4 mol NADPH,因此提高 NADPH 的量是提高 L-赖氨酸积累量的重要手段之一^[11]。

2 NADPH 代谢

2.1 NADPH 的合成代谢

考虑到 NADPH 的合成代谢,很自然的想到



(A): 二氨基庚二酸脱氢酶途径; (B): 琥珀酰转移酶途径; (C): 乙酰转移酶途径; (D): 氨基转移酶途径。(1): 内消旋二氨基庚二酸脱氢酶; (2): 四氢吡啶二羧酸琥珀酰化酶; (3): 琥珀酰-氨基-吡咯酮转氨酶; (4): 琥珀酰-二氨基庚二酸脱琥珀酰酶; (5): 四氢吡啶二羧酸乙酰转移酶; (6): 乙酰-氨基-吡咯酮转氨酶; (7): 乙酰-二氨基庚二酸脱乙酰酶; (8): 四氢吡啶二羧酸氨基转移; (9): 二氨基庚二酸差向异构酶; (10): 二氨基庚二酸脱羧酶。Asp: 天冬氨酸; Pyr: 丙酮酸; PDC: 六氢吡啶-2,6-二羧酸; SucAKP: 琥珀酰-2-氨基-酮庚二酸; SucDAP: 琥珀酰-二氨基庚二酸; AKG: α -酮戊二酸; SucCoA: 琥珀酰-CoA; S: 琥珀酸; Glu: 谷氨酸; AcCoA: 乙酰-CoA; AcAKP: 乙酰-2-氨基-酮庚二酸; AcDAP: 乙酰-二氨基庚二酸; Ac: 乙酸; LL-DAP: 外消旋二氨基庚二酸; DL-DAP: 外消旋二氨基庚二酸; Lys: 赖氨酸。

图2 原核生物中从天冬氨酸起始的L-赖氨酸合成的4种途径

Fig.2 Four pathways of L-lysine synthesis from aspartate in prokaryotes

PPP途径和TCA循环,因为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶是NADPH的主要来源,其中起最主要作用的是PPP中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶^[11-12]。谷氨酸棒杆菌中NADPH代谢的详细信息已经在不同的生理条件下通过¹³C代谢流分析研究获得^[13-15]。在谷氨酸棒杆菌,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶以NADP作为辅因子催化形成NADPH^[16-17]。在大肠杆菌中存在嘧啶核苷酸转氨酶(PntAB),它可以利用细胞膜上电化学质子浓度梯度,通过氧化NADH,从而降

低NADP⁺浓度,提高NADPH,满足形成L-赖氨酸的NADPH的需求^[18]。总而言之,NADPH的有效供应是提高L-赖氨酸产量的关键因素,因为增加NADPH的量可以提高L-赖氨酸合成途径中NADPH依赖性的酶的酶活力,进而增长L-赖氨酸的量。

2.2 NADPH的分解代谢

在L-赖氨酸生物合成过程中,有4个反应需要消耗NADPH。谷氨酸棒杆菌直接或间接的通过对氨基的同化作用来消耗NADPH。谷氨酸棒杆菌中的NADPH主要有两方面的用途:L-赖氨酸的合成;菌体生长需求。有报道表明,谷氨酸棒杆菌在生长过程中每生长1g生物量需消耗16.4mmol NADPH;在合成L-赖氨酸过程中,每合成1mol L-赖氨酸都需消耗4mol NADPH^[4]。NADPH消耗反应可能由存在于呼吸链中的形成超氧化物的NADPH氧化酶或者涉及到苹果酸酶的丙酮酸节点周围的代谢循环组成^[19],然而很多实验结果表明,这些反应中的任何一个的作用目前都没有明确说明。NADPH的消耗与供应与多种因素密切相关,如菌体生理状态^[20]、碳源供应^[21]和遗传背景等^[22]。在大多数情况下,NADPH供应是明显过量的,并且随着NADPH的氧化降低而增加。但也在一些情况下,NADPH存在明显不足,如分批发酵下赖氨酸生产的最大阶段或者以果糖为底物只有少量C流量进入PPP^[23]。

3 L-赖氨酸合成中与NADPH代谢相关的酶

3.1 NADPH合成过程中的酶

3.1.1 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)由基因zwf编码,它是磷酸戊糖途径的主要调节酶,催化6-磷酸葡萄糖脱氢,形成6-磷酸葡萄糖酸内酯,同时其还原当量产物以NADPH形式储存,以供生物合成及维持细胞内的还原状态,对维持细胞内NADPH和氧化还原反应的平衡起着重要作用^[24]。G6PD是由相对分子质量为58000的亚单位组成的二聚体或四聚体,各亚基由2个结构域组成,两个结构域之间由 α 螺旋连接,形成二聚体,其中较小的一个位于N-末端,相当于第27~200个氨基酸残基,被认为是还原型辅酶II(NADP)的结合点^[24]。G6PD基因中除外显子3和13外,均可发生变异,目前发现的生化变异型约有400余种,其中多数为

单个或多个碱基置换,且转换多于颠换^[25]。由于来源于 G6PD 的 NADPH 在细胞生长调节中起着重要作用,因此 G6PD 缺乏细胞对氧化应激超敏感^[24]。谷氨酸棒杆菌中 G6PD 在提供 NADPH 过程中起到非常重要的作用,但其活力受到 ATP、磷酸烯醇式丙酮酸、果糖-1,6-二磷酸的抑制作用^[26]。为了解除 G6PD 的反馈抑制作用和提高 G6PD 的表达,使更多的“C”流进 PPP 途径,从而提供更多的 NADPH,对其基因进行基因改造是一个很好的选择。Ohnishi 等都指出,通过定点突变,使 *zwf* 基因中的 243 位碱基由 A 突变成 T 可以有效解除 ATP、磷酸烯醇式丙酮酸和果糖-1,6-二磷酸的抑制作用,增大 NADPH 的量,从而有效增加 L-赖氨酸的量^[27]。Becker 等通过基因组替代方法将 *zwf* 基因中的启动子替换成 *sod* 中的强启动子,增强 *zwf* 基因的表达,能有效的增加 L-赖氨酸的产量,同时可以减少副产物海藻糖的产量^[26]。

3.1.2 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGDH)是由基因 *gnd* 编码,它是一种催化 6-磷酸葡萄糖酸脱羧氧化形成 5-磷酸核酮糖,产生 CO₂ 并将 NADP 还原生成 NADPH^[28]。6PGDH 在原核和真核生物中都是以二聚体形式存在,每个单体约含有 470 个氨基酸,单体的相对分子质量为 52 000 左右。每个亚基由 3 部分组成:一个是 N 端的“Rossmann Fold”构成的 NADP⁺结合区;另两个功能区是由 α 组成,两个区域在功能上是一致的,即二聚体结合和底物结合,但两个区域在结构上被一个长的“loop”分开^[28]。不同的物种中,6PGDH 的氨基酸系列的保守性很高。6PGDH 在谷氨酸棒杆菌中为其提供合成 L-赖氨酸所需的 NADPH 起到非常重要的作用,然而 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶活力受果糖-1,6-二磷酸的抑制作用^[27]。G. 蒂尔巴赫等通过将 6PGDH 多肽链中的第 326 位缬氨酸突变成蛋氨酸,可以有效解除果糖-1,6-二磷酸对该酶的抑制作用,从而提高 L-赖氨酸产量^[29]。将 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶肽链上的第 361 位的丝氨酸(Ser)突变成脯氨酸(Pro),能有效解除果糖-1,6-二磷酸的抑制作用^[27]。

3.1.3 NADP-苹果酸酶 苹果酸酶(Malic Enzyme, ME1),是催化 L-苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸和二氧化碳及其逆反应的酶,广泛存在于动物、植物和细菌体中,在高等生物中主要分布在线粒体、叶绿

体及细胞质中,并且以多种形式存在^[30]。NADP-ME1 是一种以 NADP⁺为辅因子的苹果酸酶,它普遍以四聚体蛋白质存在,在 Mn²⁺或 Mg²⁺存在的情况下,可以催化可逆的氧化脱羧反应使 L-苹果酸转变为丙酮酸,这个反应涉及到了 NADP⁺向 NADPH 的转化,将糖酵解途径和柠檬酸循环联系起来。NADP-ME1 在 C₃ 和 C₄ 化合物的相互转换过程中起着重要的作用,且对整个代谢过程都至关重要,广泛地参与不同的代谢途径,包括 C₄ 植物中的固碳作用、真菌和动物中脂质合成的 NADPH 源泉、以及组织快速繁殖时线粒体能量的供给等^[31]。编码 NADP-苹果酸酶的基因并不是惟一的,而是由多个基因组成的基因家族所编码。另外,苹果酸酶基因的表达受 ABA 诱导,有可能是由 ABA 胁迫信号系统调控的植物防御基因^[32]。NADP-ME1 含有 3 个保守结构域,其中 N-端结构域和 NADP⁺结合结构域为苹果酸酶所特有,C-端结构域与没有苹果酸酶活性但能够催化乙酰基群转化成正磷酸盐的 PTA(phosphotransacetylase)同源^[33]。NADP-ME1 是一个大小约 200 000 的四聚体,其中包含 4 个相似的亚基,大小分别约为 50 000^[30]。苹果酸酶作为生物体中枢代谢途径的关键酶,已应用于厌氧混合酸的发酵工程及酿酒工业。姜岷等指出,在 *E.coli* FM J39 中过表达 NADP-ME1 对其混合酸发酵有重要影响,能有效提高发酵液中甲酸和乙酸的量,同时也可以有效减少丁二酸的量^[34]。

3.1.4 嘧啶核苷酸转氢酶 嘧啶核苷酸转氢酶(Pyridine Nucleotide Transhydrogenase, PntAB)由 *pntAB* 基因编码,催化 H⁺在 NAD 和 NADP 之间转运,同时伴随着呼吸作用和 ATP 的水解^[18]。它首先发现存在于 *E.coli* 中的细胞膜和线粒体内膜上。嘧啶核苷酸转氢酶由两个多肽链组成(即两个亚基 α , β),分别由基因 *pntA* 和 *pntB* 编码,任何单独的亚基都不能发挥作用,其中 α 亚基相对分子质量 50 000, β 亚基相对分子质量 47 000。*pntA* 和 *pntB* 相距很近且两基因之间不存在类似启动子结构,因此它们可以共同转录^[35]。Anderlund 等指出,在酿酒酵母中过表达 *pntAB* 基因,可以降低甘油的产量,同时可以降低“C”流量流向 PPP 途径^[36]。PntAB 可以利用细胞膜上电化学质子浓度梯度,通过氧化 NADH,从而降低 NADP⁺浓度,提高 NADPH,满足形成 L-赖氨酸的还原力的需求,然而在谷氨酸棒杆菌/黄色短杆菌

中不存在这一酶。通过在谷氨酸棒杆菌/黄色短杆菌中表达 *E.coli* 中的 *pntAB*, 可以提高葡糖糖、果糖, 尤其是蔗糖的利用率。当以葡糖糖为碳源时, 赖氨酸产量提高了 10%; 当以果糖为碳源时, 赖氨酸产量提高了 70%; 当以蔗糖为碳源时, 赖氨酸产量可以提高 200%^[18]。工业上用于发酵赖氨酸的碳源一般是糖蜜, 糖蜜的主要成分是葡萄糖、果糖和蔗糖, 因此通过在谷氨酸棒杆菌/黄色短杆菌中表达 *pntAB*, 可以提高菌体对糖蜜的利用率。

3.2 NADPH 分解过程中的酶

3.2.1 天冬氨酸转氨酶 天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST), 原名谷草转氨酶 (glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT) 一种以磷酸吡哆醛 (pyridoxal phosphate, PLP) 为辅酶、由细胞核基因编码的线粒体酶, 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 在细胞的氮、碳代谢过程中起到非常重要的催化作用。AST 催化天冬氨酸的氨基转移到 α -酮戊二酸形成草酰乙酸和谷氨酸及其逆反应^[37]。1986 年英国 Orherrin 等率先克隆并测定了大肠杆菌中编码天冬氨酸转氨酶的基因 *aspC*^[38]。天冬氨酸转氨酶是一种以酸性氨基酸为氨基供体, 2-酮酸为氨基受体的具有高催化活性的酶, 在工业上可催化苯丙酮酸及天冬氨酸生成用作药物中间体与甜味剂阿斯巴甜前体的 L-苯丙氨酸^[39]。过表达 *aspC* 基因能够有效增加 L-苯丙氨酸的产量, 同时也能提高底物的转化率^[27]。

3.2.2 天冬氨酸半醛脱氢酶 天冬氨酸半醛脱氢酶 (Aspartic semialdehyde dehydrogenase, ASADH) 由基因 *asd* 编码, 催化 β -天门冬氨酰磷酸转变为 β -天门冬氨酰半醛。天冬氨酸半醛脱氢酶是细菌赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和二氨基庚二酸 (diaminopimelic acid, DAP) 合成途径中的一种关键酶, 而 DAP 是革兰阴性菌细胞壁主要成分, 因此当 *asd* 基因发生突变时, 菌体不能合成 DAP, 菌体就融解死亡^[40]。天冬氨酸半醛脱氢酶由功能性二聚体组成, 并带有大量的内部亚基结合位点以及含有一个连接活性位点的对称的 4-氨基酸桥, 其主要作用是作为信号通道^[41]。*asd* 基因的表达受多种氨基酸的抑制, 在 L-赖氨酸有限的情况下解抑制作用最为明显, 其中葡萄糖-6-磷酸对其具有调节作用^[40]。ASADH 中在活力上起主要作用的残基是 Cys-135、His-274、Gln-

162, 其中 Cys 作为亲核试剂接触基质; 带正电荷的 His 作为酸试剂, 而 Gln 涉及与基质进行连接。ASADH 活力位点的产生是通过 Cys-135 与 His-274 结合, 从而使其脱质子^[41]。虽然 ASADH 的结构及特性都有所研究, 但其与 L-赖氨酸生物合成的关系笔者尚未见国内外有研究。

3.2.3 二氢吡啶二羧酸还原酶 二氢吡啶二羧酸还原酶 (Dihydrodipicolinate reductase, DHDPR) 由基因 *dapB* 编码, 是细菌合成 L-赖氨酸和二氨基庚二酸过程中 L-赖氨酸生物合成途径中的关键酶之一, 催化二氢吡啶二羧酸转变成六氢吡啶二羧酸^[42]。二氢吡啶二羧酸还原酶由两个区域组成: 二核苷酸结合域和二氢吡啶二羧酸结合域。有活性的 DHDPR 一般以四分体的形式存在, 每个单体相对分子质量大小约为 30 000, 在蛋白质中心包含着一条长的色氨酸残基链。DHDPR 既可以以 NADH 又可以以 NADPH 作为辅助因子, 辅因子结合位点位于 β 折叠的 C 末端^[43]。DHDPR 虽然对微生物具有重要作用, 但大多数的研究集中在研究它与 DAP 的合成关系, 与 L-赖氨酸合成的关系的研究笔者尚未见有报道。

3.2.4 琥珀酰二氨基庚二酸转氨酶 琥珀酰二氨基庚二酸转氨酶 (N-succinyl diaminopimelate aminotransferase, DAP-AT) 由基因 *dapC* 编码, 催化氨基从 L-谷氨酸转移到琥珀酰酮庚二酸生成琥珀酰庚二酸, 同时该过程需要磷酸吡哆醛 (PLP) 作为辅助因子参与反应^[44]。DAP-AT 在多种微生物中都可鉴定和分离到, 它们都是以二聚体的形式存在, 目前还未发现有三聚体的 DAP-AT 存在^[45]。DAP-AT 晶体结构表明, 辅助因子 (PLP) 结合位点位于两个亚基的 Lys232 处。DAP-AT 除具有 PLP 结合位点外还存在多种结合位点, 如水和甘油结合位点、谷氨酸结合位点、琥珀酰酮庚二酸结合位点和氯化物结合位点^[44]。目前, DAP-AT 通过克隆和过表达已成功运用于 L-赖氨酸的生产。

3.2.5 内消旋二氨基庚二酸脱氢酶 内消旋二氨基庚二酸脱氢酶 (meso-Diaminopimelate dehydrogenase, DAPDH) 有基因 *ddh* 编码, 催化底物中 D 型结构中氨基可逆的氧化转移, 同时该反应需要 NAD (P)+ 参与, 生产 L 型氨基酮庚二酸^[46]。DAPDH 是唯一一个依赖 NAD(P)⁺ 的氨基酸脱氢

酶。该酶只作用于内消旋二氨基庚二酸,并可以用于分光光度法测定该物质和分析二氨基庚二酸差向异构酶。来源于谷氨酸棒杆菌和黄色短杆菌中的 *ddh* 基因序列已被测序,两者之间的同源性非常高,说明 DAPDH 的保守性很高^[47]。DAPDH 是由同源二聚体组成,每个亚基都由 3 个区域组成:N 端区域,包含二核苷酸结合区域或罗斯曼折叠;二聚体区域,包含 2 个 α 螺旋和 3 个 β 折叠;C 端区域,由 6 个 β 折叠和 5 个 α 螺旋组成^[48]。来自谷氨酸棒杆菌中的 *ddh* 基因成功克隆和在大肠杆菌中异源表达并运用在 L-赖氨酸生物合成中^[46]。

4 结语

L-赖氨酸发酵不同于 L-谷氨酸发酵,每合成 1 mol 的 L-赖氨酸需消耗 4 mol 的 NADPH,提高代谢途径中 NADPH 的量是增加 L-赖氨酸重要手段之一。因此,作者在进一步阐明 L-赖氨酸合成的代谢机制和进一步提高 L-赖氨酸产量时,应该将研究重点从下游代谢途径转移到上游的中心代谢途径,尤其是合成 NADPH 的途径,如戊糖磷酸途径。通过对 NADPH 代谢机制的研究,改造 L-赖氨酸产生菌,从而实现 L-赖氨酸最大积累,满足我国对 L-赖氨酸的不断需求。

参考文献:

- [1] 周勇,满云,张伟国. L-赖氨酸高产菌发酵的研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(6):924-927.
ZHOU Yong,MANG Yun,ZHANG Wei-guo. Study on fermentation of L-lysine hyper-producer[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(6):924-927. (in Chinese)
- [2] Paegle L,Ruklisha M. Lysine synthesis control in *Corynebacterium glutamicum* Re115 in mixed substrate (glucose-acetate) medium[J]. **Journal of Biotechnology**,2003,104(2003):123-128.
- [3] 刘晓飞,高学军,刘营,等. 微生物产赖氨酸的研究进展[J]. 东北农业大学学报,2010,41(1):157-160.
LIU Xiao-jun,GAO Xue-jun,LIU Ying,et al. Research progress on microbial production of lysine[J]. **Journal of Northeast Agriculture University**,2010,41(1):157-160. (in Chinese)
- [4] Wittmann C,Becker J. The L-Lysine story:from metabolic pathways to industrial production[J]. **Microbial Monogr**,2007,12(7):39-69.
- [5] Kinoshita S,Shigezo U,Shimono M. Studies on the amino acid fermentation,part I. production of l-glutamic acid by various microorganisms[J]. **J Gen Appl Microbiol**, 1957,3:193-205.
- [6] Masato I,Ohnishi J,Mikiro H,et al. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**,2006,33:610-615.
- [7] 张军华. 微生物发酵法生产 L-赖氨酸的研究进展[J]. 生物加工过程,2012,10(2):73-78.
ZHANG Jun-hua. Research progress on microbial fermentation of lysine[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2012,10(2):73-78. (in Chinese)
- [8] McCoy A J,Adams N E,Hudson A O,et al. L,L-diaminopimelate aminotransferase,a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,2006,103:17909-17914.
- [9] Sonntag K,Eggeling L,De Graaf A A,et al. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy[J]. **Eur J Biochem**,1993,213:1325-1331.
- [10] Sahn H,Eggeling L,de Graaf A A. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Biol Chem**, 2000,381:899-910.
- [11] Moritz B,Striegel K,de Graaf A A,et al. Changes of pentose phosphate pathway flux in vivo in *Corynebacterium glutamicum* during leucine-limited batch cultivation as determined from intracellular metabolite concentration measurements[J]. **Metabol Eng**,2002,4:295-305.
- [12] Wittmann C,Heinzle E. Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis:metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing *Corynebacteria*[J]. **Appl Environ Microbiol**,2002,68:5843-5859.
- [13] 魏爱英,葛玉萍. L-赖氨酸的代谢途径到工业生产[J]. 发酵科技通讯,2011,40(2):31-34.
WEI Ai-ying,GE Yu-ping. L-lysine:from metabolic pathways to industrial production [J]. **Fermentation Technology**

- Communication**, 2011, 40(2):31-34. (in Chinese)
- [14] Becker J, Klopffrogge C, Zelder O, et al. Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71:8587-8596.
- [15] Wittmann C, Heinzle E. Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing *Corynebacteria*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68:5843-5859.
- [16] Eikmanns B J, Rittmann D, Sahm H. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme[J]. **J Bacteriol**, 1995, 177:774-782.
- [17] Chen R, Yang H. A highly specific monomeric isocitrate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Arch Biochem Biophys**, 2000, 383:238-245.
- [18] Kabus A, Georgi T, Wendisch V F, et al. Expression of the *Escherichia coli* *pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2007, 75:47-53.
- [19] de Graaf A A, Eggeling L, Sahm H. Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 2001, 73:9-29.
- [20] Marx A, Striegel K, de Graaf A, et al. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1997, 56(2):168-180.
- [21] Wittmann C, Kiefer P, Zelder O. Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70:7277-7287.
- [22] Marx A, Hans S, Mkel B, et al. Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Biotechnol**, 2003, 104:185-197.
- [23] Kiefer P, Heinzle E, Zelder O, et al. Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70:229-239.
- [24] 安选, 刘良忠, 胡鹏. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(6):745-748.
AN Xuan, LIU Liang-zhong, HU Peng. Progress in research on glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. **Chin J Biologicals**, 2011, 24(6):745-748. (in Chinese)
- [25] Cappellini M D, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. **Lancet**, 2008, 371(9606):64-74.
- [26] Judith B, Corinna K, Andrea H Oskar Z, et al. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*-over expression and modification of G6P dehydrogenase[J]. **J Biotechnol**, 2007, 132:99-109.
- [27] Ohnishi J, Katahira R, Mitsuhashi S, et al. A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2005, 242:265-274.
- [28] 秦岭, 刘克武. 枯草芽孢杆菌 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的纯化及部分性质的研究[D]. 成都: 四川大学, 2003.
- [29] G·蒂尔巴赫, B·巴特, N·席施卡. 棒状细菌 *gnd* 基因的等位基因[P]. CN101080489, 2007.
- [30] 郑恩霞, 程文娟, 王宗达, 等. 苹果酸酶的分子生物学研究进展[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(10):51-52.
ZHENG En-xia, CHEN Wen-juan, WANG Zong-da, et al. Research on the molecular biology of malic enzyme[J]. **Anhui Agricultural Science Bulletin**, 2009, 15(10):51-52. (in Chinese)
- [31] Laporte M M, Shen B, Tarczynski M C. Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function[J]. **J Exp Bot**, 2002, 369(53):699-705.
- [32] FU Z Y, ZHANG Z B, HU X J. Cloning, identification, expression analysis and phylogenetic relevance of two NADP-dependent malic enzyme genes from hexaploid wheat[J]. **CR Biol**, 2009, 332(7):591-602.
- [33] Marchler-Bauer A, Anderson J B. A conserved domain database for protein classification[J]. **Nucleic Acids Res**, 2005, 33:192-196.
- [34] 姜岷, 谢鑫, 许琳, 等. 过量表达苹果酸酶对 *E.coli* FMJ39 厌氧混合酸发酵的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 27(1):69-74.
JIANG Min, XIE Xin, XU Lin, et al. Effect of overexpression of NAD⁺-dependent malic enzyme on anaerobic mixed acid fermentation of *E.coli* FMJ39[J]. **China Biotechnology**, 2006, 27(1):69-74. (in Chinese)
- [35] David MC, Tip W L, Shirley GILLAM, et al. Nucleotide sequence of the *pntA* and *pntB* genes encoding the pyridine nucleotide

- transhydrogenase of *Escherichia coli*[J]. **Eur J Biochem**, 1986, 158, 647–653.
- [36] Anderlund M, Nissen T L, Nielsen J, et al. Expression of the *Escherichia coli* *pntA* and *pntB* genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 65: 2333–2340.
- [37] 周华, 洪媛, 严明, 等. 极端嗜热菌 *Thermus thermophilus* HB8 中天冬氨酸转氨酶在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质研究[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 278–283.
ZHOU Hua, HONG Yuan, YAN Ming, et al. Expression, purification and enzymatic characterization of *Thermus thermophilus* HB8 aspartate aminotransferase in *Escherichia coli*[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2007, 23(2): 278–283. (in Chinese)
- [38] CHAO Y P, LAI Z J, CHEN P. Enhanced conversion rate of L-phenylalanine by coupling reactions of aminotransferases and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli* K-12[J]. **Biotechnol Progr**, 1999, 15(3): 453–458.
- [39] 徐虹, 欧阳平凯, 周卫斌. 大肠杆菌 EP8-10 转化苯丙酮酸生成 L-苯丙氨酸的研究[J]. 微生物学报, 1999, 33(3): 272–274.
XU Hong, OUYANG Ping-kai, ZHOU Wei-bing. Research on production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid by *E. coli* EP8-10[J]. **Microbiology Sinici**, 1999, 33(3): 272–274. (in Chinese)
- [40] Catherine H, Patnick S, Jean-Claude P. Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*; absence of a typical attenuation signal[J]. **EMBO J**, 1982, 1: 379–384.
- [41] Blanco J, Moore R A, Venkataraman K, et al. A structural basis for the mechanism of aspartate-semialdehyde dehydrogenase from *Vibrio cholerae*[J]. **Protein Sci**, 2003, 12: 27–33.
- [42] García-Rodríguez J F M, Toro S Z N. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* genes encoding a functional dihydrodipicolinate synthase (*dapA*) and dihydrodipicolinate reductase (*dapB*) [J]. **Arch Microbiol**, 2000, 173: 438–444.
- [43] Scapin G, Blanchard J S, Sacchettini J C. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate reductase [J]. **Biochemistry**, 1995, 34: 3502–3512.
- [44] Cox R J, Sherwin W A, Lam L K P, et al. Synthesis and evaluation of novel substrates and inhibitors of N-succinyl-LL-diaminopimelate aminotransferase (DAP-AT) from *Escherichia coli*[J]. **J Am Chem Soc**, 1996, 118: 7449–7460.
- [45] Weyand S, Kefala G, Weiss M S. The three-dimensional structure of N-succinyl-diaminopimelate aminotransferase from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. **J Mol Biol**, 2007, 367: 825–838.
- [46] Akita H, Fujino Y, Doi K, Ohshima T. Highly stable meso-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from Japanese compost; purification, characterization and sequencing[J]. **AMB Express**, 2011, 43: 1–8.
- [47] Sakamoto S, Seki M, Nagata S, Misono H. Cloning, sequencing, and expression of the meso-diaminopimelate dehydrogenase gene from *Bacillus sphaericus*[J]. **J Mol Catal B-Enzyme**, 2001, 12: 85–92.
- [48] Reddy S G, Scapin G, Blanchard J S. Expression, purification, and crystallization of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Proteins**, 1996, 25: 514–516.