

谷氨酸棒杆菌生产缬氨酸的代谢工程研究进展

王小元

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: L-缬氨酸是人体必需的三种支链氨基酸之一, 在生命代谢过程中起着非常重要的作用, 因此被广泛应用于食品、医药及饲料等行业。目前, L-缬氨酸主要采用微生物发酵法生产, 而谷氨酸棒杆菌是最常用的生产菌种。作者分析了谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸的生物合成途径和代谢调控, 综述了对其进行代谢工程改造来提高 L-缬氨酸产量的最新研究进展。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; L-缬氨酸生产; 代谢工程; 发酵; 支链氨基酸

中图分类号: Q 933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)03-0225-07

Metabolic Engineering in *Corynebacterium glutamicum* to Increase L-Valine Production

WANG Xiao-yuan

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: L-valine, one of the three branched-chain amino acids, is essential for human, and plays an important role in the metabolism of life, therefore, it is widely used in products of food, medicine and feed. L-valine is mainly produced by bacterial fermentation, and the most used bacterium is *Corynebacterium glutamicum*. In this article, the pathway and regulation of L-valine biosynthesis in *C. glutamicum* are analyzed and researches on metabolic engineering to increase L-valine production in *C. glutamicum* are reviewed.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*, L-valine production, metabolic engineering, fermentation, branched-chain amino acids

自从 1957 年 Kinoshita 等人^[1]报道了谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)可以发酵生产谷氨酸, 该菌已逐渐被用来发酵生产各种氨基酸, 包括 L-缬氨酸(L-valine)。L-缬氨酸是人体必需的一种支链氨基酸, 具有多种生理功能, 因此被广泛应用于食品、医药及饲料等行业。例如, L-缬氨酸在食品工业中用作营养强化剂和增香剂, 在医药工业中用于制造复合氨基酸注射液和合成抗生素, 在饲料行业中作

为一种限制性氨基酸添加剂。由于其用途广泛, 市场上 L-缬氨酸总是处于供不应求局面, 带动企业在 L-缬氨酸产量及其生产成本等方面的良性竞争。目前, 多数企业使用的 L-缬氨酸生产菌来自于反复诱变, 因而其遗传背景不明, 很难通过进一步诱变来提高 L-缬氨酸产量。近年来, 随着谷氨酸棒杆菌全基因组测序及基因功能注释的完成^[2], 代谢工程已被用于构建 L-缬氨酸生产菌, 成为提高 L-缬氨酸发

收稿日期: 2012-02-20

作者简介: 王小元(1965-), 男, 山西垣曲人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物代谢工程方面的研究。

E-mail: xiaoyuanwang@hotmail.com

酵生产水平的最有效方法。众所周知,优良的生产菌种是提高发酵产品产量和质量的保障。作者在分析谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸的生物合成途径和代谢调控机理的基础上,对其生产 L-缬氨酸的代谢工程改造的研究进行综述。

1 谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸分子的生物合成途径

谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸的合成途径见图 1。从丙酮酸出发,L-缬氨酸的合成先后涉及到乙酰羟酸合酶(AHAS)、乙酰羟酸同分异构酶(AHAIR)、二羟酸脱水酶(DHAD)和支链氨基酸转氨酶(TA)等^[3-5]。首先,由两个基因 *ilvB* 和 *ilvN* 共同编码的 AHAS 将两分子的丙酮酸缩合成 2-乙酰乳酸;其次,由基因 *ilvC* 编码的 AHAIR 将 2-乙酰乳酸转化成双羟基异戊酸;再次,由基因 *ilvD* 编码的 DHAD 将双羟基异戊酸脱水形成 2-酮异戊酸;最后,由基因 *ilvE* 编码的 TA 将 2-酮异戊酸转化成 L-缬氨酸;由 *pdxR* 和 *avtA* 编码的蛋白质在 L-缬氨酸合成的最后一步也起到转氨酶的作用^[6]。另外,TA 也能催化 L-亮氨酸和 L-异亮氨酸合成途径的最后一步反应^[5]。

谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸的合成途径还与其它一些主要代谢产物的合成途径相互交错,见图 1。首先,L-缬氨酸合成的关键前体物质丙酮酸(Pyruvate)同时也被用于合成 L-丙氨酸(L-alanine)、乙酰 CoA(Acetyl CoA)和草酰乙酸(Oxaloacetate)。其次,L-缬氨酸的合成与 L-异亮氨酸(L-isoleucine)的合成共享 AHAS、AHAIR、DHAD 和 TA 等 4 种酶,但是这些酶在不同的合成途径选用不同的底物。例如,AHAS 以丙酮酸为底物合成 L-缬氨酸,而用丙酮酸和 2-酮丁酸二者为底物则合成 L-异亮氨酸。AHAS 对 2-酮丁酸的亲和性远高于丙酮酸,因此在有 2-酮丁酸存在时,丙酮酸被用来优先合成 L-异亮氨酸,不利于 L-缬氨酸的积累^[7]。最后,L-缬氨酸合成前体 2-酮异戊酸的同时也被用于合成 L-亮氨酸(L-leucine)和 D-泛酸(D-pantothenate)。针对这些特点,在优化谷氨酸棒杆菌生产 L-缬氨酸时,不仅要加强 L-缬氨酸的合成,还要考虑减弱其它相关代谢产物的合成,积累关键前体物质,将碳流导向 L-缬氨酸的合成。

2 谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸合成相关的调控机制

微生物细胞内存在复杂的代谢网络,许多分子的合成都 DNA 或蛋白质层次上受到严格调控,L-缬氨酸也不例外。L-缬氨酸合成途径中的一些关键酶受到产物抑制或转录弱化作用调控。胞内合成的 L-缬氨酸的胞外分泌也受到调控。因此,要对 L-缬氨酸生产菌进行理性的代谢工程优化,必须对其调控机制进行全面了解。

2.1 氨基酸产物对乙酰羟酸合酶的反馈抑制

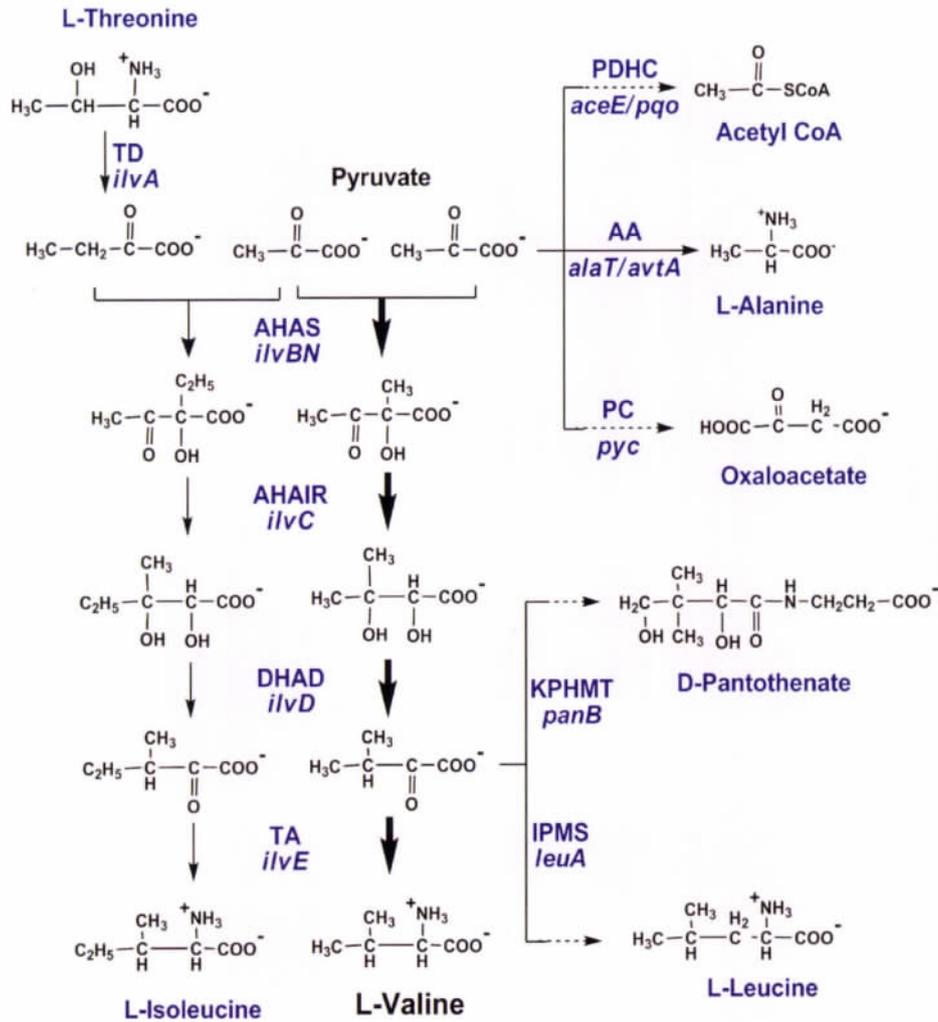
L-缬氨酸反馈抑制的主要对象是其合成途径上的第一个关键酶 AHAS。谷氨酸棒杆菌中 AHAS 全酶是四聚体,由两个相同的大亚基和两个相同的小亚基构成。大亚基为催化亚基,由 *ilvB* 基因编码;而小亚基为调节亚基,由 *ilvN* 基因编码。3 种支链氨基酸均可以反馈抑制 AHAS 的小亚基^[7-8]。L-缬氨酸、L-异亮氨酸和 L-亮氨酸对 AHAS 的半抑制浓度分别为 0.9、3.1 和 6.0 mmol/L^[3]。当浓度取 5.0 mmol/L 时,无论是单一的支链氨基酸,还是任意两种或三种支链氨基酸组合,对 AHAS 活性的抑制程度均不会超过 57%^[8]。这些数据说明 3 种支链氨基酸在 AHAS 小亚基上的结合位点是相同的,但它们与该结合位点的亲和性有差异。通过定点突变,对谷氨酸棒杆菌 AHAS 小亚基上 20、21 和 22 位的氨基酸进行替换,可获得一个不受任何支链氨基酸反馈抑制的突变体^[8]。

2.2 编码乙酰羟酸合酶的基因转录弱化

在谷氨酸棒状杆菌染色体上,基因 *ilvB*、*ilvN* 和 *ilvC* 串联构成一个操纵元 *ilvBNC*。Northern 印迹实验证明 *ilvBNC* 操纵元可以转录 3 种长度分别为 3.9、2.3、1.1 kb 的 mRNA;它们分别对应于 *ilvBNC*、*ilvNC* 和 *ilvC* 3 种 DNA 片段^[4]。如果将 *ilvB* 的上游序列删除,则只能获得长度分别为 2.3 kb 和 1.1 kb 的 mRNA;如果将 *ilvN* 的上游序列删除,则只能获得长度为 1.1 kb 的 mRNA^[4]。这些数据说明 *ilvBNC* 操纵子中含有 3 个启动子,因而基因 *ilvC* 可被转录 3 次,导致其表达效率在 3 个基因中最高。进一步研究发现,在 *ilvB* 上游 292 bp 处的一段 DNA 能表达一个短肽。这个短肽含有 25 个氨基酸,其中包括 2 个 L-异亮氨酸、3 个 L-缬氨酸和 2 个 L-亮氨酸,且短肽形成序列的后面存在能

形成 RNA 茎环结构和转录终止子结构的序列^[9], 说明这个短肽是对操纵元 *ilvBNC* 具有弱化调节作用的前导肽。前导肽翻译偶联的弱化作用对 *ilv*

vBNC 的转录调控进一步被 Mobach 等人用 *lacZ* 作为报告基因实验证实^[9]。



其中关键步骤用粗箭头表示,蛋白质名用大写的首英文字母组合表示,基因名用斜体英文字母表示

图 1 谷氨酸棒杆菌中 L-缬氨酸的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis of L-valine in *C. glutamicum*

2.3 L-缬氨酸胞外分泌的调控

如果胞内的 L-缬氨酸不能被及时分泌到胞外,积累的 L-缬氨酸就会抑制其生物合成途径中关键酶的活性,并弱化编码关键酶的基因转录,使 L-缬氨酸的合成速度降低。胞内的 L-缬氨酸必须通过膜转运酶 BrnF 和 BrnE 分泌到胞外^[10]。全局基因表达分析发现,L-异亮氨酸的加入可以增加野生型谷氨酸棒杆菌中 BrnF 和 BrnE 的表达,但是对 *lrp* 敲除菌株没有影响。通过与 *lrp* 和 *brnF* 的启动子

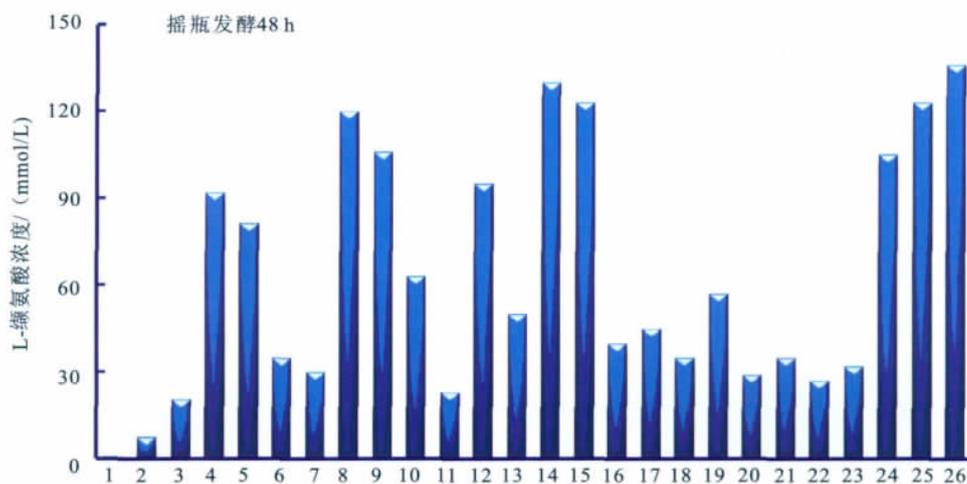
的转录融合表达分析,发现在培养基中添加 3 种支链氨基酸或 L-甲硫氨酸均可以刺激 *brnFE* 的表达,但是这种刺激作用需要调控因子 Lrp 的存在^[11]。芯片分析、带转变实验和 DNase 足迹分析证明 Lrp 结合在 *lrp* 和 *brnF* 之间的 DNA 上^[11]。

3 L-缬氨酸代谢工程菌研究进展

L-缬氨酸工业生产菌主要来自于传统诱变育种^[12],但目前代谢工程正在被用于谷氨酸棒杆菌的

改良:利用已知的遗传学信息,对 L-缬氨酸代谢网络进行系统分析,并采用基因工程技术改造谷氨酸棒杆菌以提高 L-缬氨酸的产量^[13-14]。近年来,一些适用于用于谷氨酸棒杆菌的表达载体已经被构建^[15-17]。这些表达载体一般为大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的穿梭载体,含有较多的限制酶单酶切位点,有的是诱导性表达,有的是组成型表达。在谷氨酸棒杆菌中进行基因敲除的各种方法已经被建立^[18-19]。由于同一启动子在大肠杆菌和谷氨酸棒

杆菌中的活性差别很大,所以针对谷氨酸棒杆菌中启动子的研究也已经展开^[20-21]。目前,人们已经从阻止杂酸合成、积累关键前体物质、解除反馈抑制和优化启动子等方面入手构建出一些能高产 L-缬氨酸的代谢工程菌,见图 2。通过解析影响 L-缬氨酸合成的关键因素,对谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的基因组进行优化或在其中高效表达关键基因均可以大幅度地提高 L-缬氨酸的产量^[8,15,22-24]。



1. ATCC13031; 2. 13032 Δ pan BC; 3. 13032 Δ pan BC Δ ilvA; 4. 13032 Δ pan BC Δ ilvA pJC1ilvBNCD; 5. 13032 Δ pan BC Δ ilvA pJC1ilvBNCE; 6. 13032 Δ pan B Δ ilvA; 7. 13032 Δ pECKAilvBNC; 8. 13031 Δ panB Δ ilvA pECKAilvBNC; 9. 13032 Δ aceE Δ pqo pJC4ilvBNCE; 10. 13032 Δ aceE Δ pqo Δ sugR pJC4ilvBNCE; 11. ilvNM13; 12. ilvNM13 Δ panB Δ ilvA; 13. ilvNM13 pECKAilvBNM13C; 14. ilvNM13 Δ panB Δ ilvA pECKAilvBNC; 15. ilvNM13 Δ panB Δ ilvA pECKAilvBNM13C; 16. ilvNM13 p-ilvAM1CG; 17. ilvNM13 p-leuAM3A; 18. ilv NM13 p-leuAM2C; 19. ilv NM13 p-leuAM3TCG; 20. ilvNM13 p-ilvDM14; 21. ilvNM13 p-ilv DM7; 22. ilvNM13 p-ilvEM6; 23. ilvNM13 p-ilvDM14 p-ilvEM6; 24. ilvNM13 Δ panB p-ilvAM1CG; 25. ilvNM13 Δ panB p-ilvAM1CG p-ilvDM14 p-ilvEM6; 26. ilvNM13 Δ panB p-ilvAM1CG p-ilvDM7 p-ilvEM6

图 2 谷氨酸棒杆菌 L-缬氨酸生产菌的代谢工程优化

Fig. 2 Metabolic engineering of L-valine production strains

3.1 切断旁支路并加强主干道碳流

如图 1 所示, L-缬氨酸的合成与 L-异亮氨酸、L-亮氨酸和 D-泛酸的合成交错在一起。因此,要提高 L-缬氨酸的产量,首先要通过基因敲除阻止杂酸合成,然后通过高效表达来进一步加强 L-缬氨酸合成。L-异亮氨酸和 L-缬氨酸的合成途径共享的 4 个酶需要不同的底物。合成 L-异亮氨酸最关键的前体是 L-苏氨酸在 ilvA 编码的苏氨酸脱氨酶作用下产生的 2-酮丁酸,所以可以通过敲除基因 *ilvA* 阻止 L-异亮氨酸的合成。2-酮异戊酸是 L-缬氨酸、L-亮氨酸和 D-泛酸等 3 种酸的共同合成前体。由 *leuA* 编码的异丙基苹果酸合酶是 L-亮氨酸合成途

径中的第一个关键酶,通过敲除基因 *leuA* 可以阻止 L-亮氨酸的合成。从 2-酮异戊酸到泛酸的合成涉及到 3 个基因 *panB*、*panC* 和 *panE*, 其中两个关键基因 *panB* 和 *panC* 在染色体上位置相邻,通过敲除这两个基因可以阻止 D-泛酸的合成。从丙酮酸出发合成 L-缬氨酸需要 5 个基因 *ilvB*、*ilvN*、*ilvC*、*ilvD* 和 *ilvE*。在基因组中,*ilvB*、*ilvN* 和 *ilvC* 3 个基因是串联的,*ilvD* 与 *ilvB* 只相隔两个基因,而 *ilvE* 却远离其他基因。所以,基因 *ilvBNCD* 可以作为一个整体从基因组中扩增出来,通过载体高效表达来提高 L-缬氨酸的产率。2002 年, Radmacher 等人通过缺失 *ilvA* 和 *panBC* 基因并过量表达 *il-*

ilvBNCD 基因构建了一个谷氨酸棒杆菌 L-缬氨酸高产工程菌株 ATCC 13032 $\Delta ilvA\Delta panBC$ pJC1*ilvBNCD*^[15]。该菌株利用 4 g/dL 葡萄糖摇瓶培养 48 h 能产生 91.9 mmol/L (10.8 g/L) 的 L-缬氨酸。

3.2 积累关键前体和储备能源

L-缬氨酸合成的关键前体丙酮酸是细胞内非常重要的代谢产物,因此,降低丙酮酸的消耗也可以增加 L-缬氨酸产量。谷氨酸棒杆菌中丙酮酸的消耗方式主要有以下几种:一是通过 *alaT* 和 *avtA* 等基因编码的丙氨酸氨基转移酶(AA)生成 L-丙氨酸^[25];二是通过 *aceE* 等基因编码的丙酮酸脱氢酶复合体(PDHC)直接合成乙酰-CoA,或通过 *pqo* 基因编码的丙酮酸/奎宁氧化还原酶合成乙酸,再进一步合成乙酰-CoA;三是通过丙氨酸羧化酶(PC)合成草酰乙酸。敲除这些相关基因,就可以通过积累丙酮酸而增加 L-缬氨酸产量或通过减少杂酸含量而降低其生产成本。比如,在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 $\Delta ilvA\Delta panBC$ pJC1*ilvBNCD*^[15] 中进一步敲除 *alaT* 基因,L-缬氨酸的产量虽然增加不明显,但杂酸 L-丙氨酸的含量降低了 80%,最终导致下游分离纯化成本的降低^[25]。通过敲除 *aceE* 基因并过表达 *ilvBNCE* 而构建的 ATCC13032 $\Delta aceE$ pJC4*ilvBNCE* 分批发酵能产生 210 mmol/L (24.6 g/L) 的 L-缬氨酸^[22],说明丙酮酸的累积确实能增加 L-缬氨酸产量。进一步敲除 *pqo* 基因,得到的菌株 ATCC13032 $\Delta aceE\Delta pqo$ pJC4*ilvBNCE* 能进一步提高 L-缬氨酸的产量。由于培养丙酮酸脱氢酶缺陷型谷氨酸棒杆菌必须添加乙酸,这会影响葡萄糖的消耗,进而影响 L-缬氨酸的合成^[26]。Blombach 等人^[23] 通过一系列实验发现用乙醇代替乙酸可以解决这个问题。添加乙醇来分批发酵 ATCC13032 $\Delta aceE\Delta pqo$ pJC4*ilvBNCE*,葡萄糖的消耗速率是乙酸的 6 倍,66 h 后积累了 301 mmol/L (35.3 g/L) 的 L-缬氨酸^[23]。通过降低谷氨酸棒杆菌中 H⁺-ATPase 的活性也可以积累丙酮酸^[24]。将 ATCC13032 中染色体上 *atpG* 基因 817 位的 T 突变成 C,导致其编码的 H⁺-ATPase 的 273 位的 Ser 变成 Pro,得到突变株 A-1。在 A-1 中导入质粒 pVK*ilvN53C* 摇瓶发酵 72 h 能产生 95.7 mmol/L (11.2 g/L) 的 L-缬氨酸^[24]。质粒 pVK*ilvN53C* 含有 *ilvN53* 和 *il-*

ilvC 两个基因,其中基因 *ilvN53* 编码的 AHAS 小亚基在 C-端缺少 53 个氨基酸,导致 AHAS 具有抗 L-缬氨酸反馈抑制的能力。

辅因子也会对 L-缬氨酸的合成造成影响。在 L-缬氨酸的合成途径中,消耗 1 mol 的葡萄糖,能产生 2 mol NADH,同时消耗 2 mol NADPH,才能合成 1 mol L-缬氨酸。为了消除这种辅因子的影响,可以敲除编码磷酸葡萄糖异构酶的基因 *pgi*,增加通过磷酸戊糖途径的碳流而生成更多的 NADPH^[27]。这样获得的菌株的 ATCC13032 $\Delta aceE\Delta pqo\Delta pgi$ pJC4*ilvBNCE* 分批发酵能产生 412 mmol/L (48.3 g/L) 的 L-缬氨酸^[28]。最近,Hasegawa 等人通过修饰 AHAS 和取代 TA 的方式,将对辅因子 NADPH 的需求转变成对 NADH 的需求,也大幅度提高了 L-缬氨酸的产量^[29]。

3.3 解除反馈抑制和优化启动子活性

Elisakova 等人^[8] 通过定点突变技术将染色体上 *ilvN* 基因编码的 AHAS 的小亚基的第 20~22 位氨基酸由原来的 GlyIleIle 突变为 AspAspPhe,导致 AHAS 完全解除了 3 种支链氨基酸的反馈抑制,在此基础上敲除了 *ilvA* 和 *panB* 基因,并转入重组质粒 pECKA*ilvBNC*,构建的工程菌株 *ilvNM13\Delta ilvA\Delta panB* pECKA*ilvBNC* 能产生 130 mmol/L (15.2 g/L) 的 L-缬氨酸。以 *ilvNM13* 菌株为背景,利用染色体定点突变技术,Holakto 等人^[30] 首先通过减弱 *ilvA* 和 *leuA* 基因的启动子活性,导致 L-异亮氨酸和 L-亮氨酸的合成速率下降,其次增强 *ilvD* 和 *ilvE* 基因的启动子活性,所得菌株 *ilvNM13\Delta panBP-ilvAM1CGP-ilvDM7P-ilvEM6* 在 48 h 内摇瓶发酵能产生 136 mmol/L (15.9 g/L) 的 L-缬氨酸。这些数据说明通过谷氨酸棒杆菌染色体上的定点突变来提高 L-缬氨酸的产量也是可行的。

4 展 望

理性设计是代谢工程育种策略的最大优势,这样构建的谷氨酸棒杆菌不仅能够最大限度地积累 L-缬氨酸,而且能够最大限度的减少杂酸,简化后续分离提纯工艺,降低生产成本。目前,谷氨酸棒杆菌 L-缬氨酸生产菌的理性设计研究主要围绕 L-缬氨酸的生物合成途径,从以下几个方面展开:首

先,在 DNA 层次上进行其编码基因的序列分析,通过定点突变消除转录弱化的调控和改变启动子的活性;其次,在蛋白质层次上解析这些酶的催化结构域和调节结构域,通过理性改造提高其催化活性和抗反馈抑制能力;最后,通过高效表达其编码基因将碳流最大限度地导向 L-缬氨酸的合成。

L-缬氨酸的生物合成途径固然是优化改进谷

氨酸棒杆菌的关键,但并不是全部。要构建最优的谷氨酸棒杆菌 L-缬氨酸生产菌,还有很多其它的因素要考虑。未来代谢工程研究应针对谷氨酸棒杆菌细胞的整体代谢网络,结合转录组学、蛋白组学、代谢组学和计算机建模等现代生物技术^[31],全面分析影响 L-缬氨酸生产的所有节点,提出全局性的菌种改进优化策略。

参考文献(References):

- [1] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms[J]. **J Gen Appl Microbiol**, 1957, 3: 193–205.
- [2] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins[J]. **J Biotechnol**, 2003, 104: 5–25.
- [3] 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]. **J Biotechnol**, 2003, 104: 241–252.
- [4] Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon[J]. **J Bacteriol**, 1993, 175: 5595–5603.
- [5] McHardy AC, Tauch A, Ruckert C, et al. Genome-based analysis of biosynthetic aminotransferase genes of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Biotechnol**, 2003, 104: 229–240.
- [6] Marienhagen J, Kennerknecht N, Sahm H, et al. Functional analysis of all aminotransferase proteins inferred from the genome sequence of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Bacteriol**, 2005, 187: 7639–7646.
- [7] Eggeling I, Cordes C, Eggeling L, et al. Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of alpha-ketobutyrate to L-isoleucine[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1987, 25: 346–351.
- [8] Elisáková V, Pátek M, Holátko J, et al. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71: 207–213.
- [9] Morbach S, Junger C, Sahm H, et al. Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site[J]. **J Biosci Bioeng**, 2000, 90: 501–507.
- [10] Kennerknecht N, Sahm H, Yen MR, et al. Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family[J]. **J Bacteriol**, 2002, 184(14):3947–3956.
- [11] Lange C, Mustafi N, Frunzke J, et al. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the *brnFE* operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids[J]. **J Biotechnol**, 2011, doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.003.
- [12] Tsuchida T, Yoshinaga F, Kubota K. Production of L-valine by 2-thiazolealanine resistant mutants derived from glutamic acid bacteria[J]. **Agric Biol Chem**, 1975, 39: 1319–1322.
- [13] Nielsen J. Metabolic Engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1998, 58: 125–132.
- [14] Bailey J E. Towards a science of metabolic engineering[J]. **Science**, 1991, 252: 1668–1674.
- [15] Radmacher E, Vaitsikova A, Burger U, et al. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 2246–2250.
- [16] Xu D, Tan Y, Huan X, et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer[J]. **J Microbiol Methods**, 2010, 80: 86–92.
- [17] Xu D, Tan, Y, Shi, F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Plasmid**, 2010, 64: 85–91.
- [18] Okibe N, Suzuki N, Inui M, et al. Efficient markerless gene replacement in *Corynebacterium glutamicum* using a new

- temperature-sensitive plasmid[J]. **J Microbiol Methods**, 2011, 85(2):155–163.
- [19] Tan, Y, Xu, D, Li, Y, et al. Construction of a novel *sacB*-based system for marker-free gene deletion in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Plasmid**, 2012, 67: 44–52.
- [20] Holátko J, Elišáková V, Prouza M, et al. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation[J]. **J Biotechnol**, 2009, 139(3): 203–210.
- [21] Xu, D, Tan, Y, Li, Y, et al. Construction of a novel promoter-probe vector and its application for screening strong promoter for *Brevibacterium flavum* metabolic engineering[J]. **World J Microbiol Biotechnol**, 2011, 27: 961–968.
- [22] Blombach B, Schreiner ME, Holátko J, et al. L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2007, 73: 2079–2084.
- [23] Blombach B, Arndt A, Auchter M, et al. L-valine production during growth of pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* in the presence of ethanol or by inactivation of the transcriptional regulator SugR[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2009, 75: 1197–1200.
- [24] Wada M, Hijikata N, Aoki R, et al. Enhanced valine production in *Corynebacterium glutamicum* with defective H⁺-ATPase and C-terminal truncated acetohydroxyacid synthase[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2008, 72: 2959–2965.
- [25] 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: 7457–7462.
- [26] Wendisch VF, de Graaf AA, Sahm H, et al. Quantitative determination of metabolic fluxes during co-utilization of two carbon sources; comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose[J]. **J Bacteriol**, 2000, 182(11):3088–3096.
- [27] Bartek T, Blombach B, Zönnchen E, et al. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Biotechnol Prog**, 2010, 26:361–371.
- [28] Blombach B, Schreiner M E, Bartek T, et al. *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2008, 79: 471–479.
- [29] Hasegawa S, Uematsu K, Natsuma Y, et al. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2011, doi: 10.1128/AEM.07056–11.
- [30] Holátko J, Elišáková V, Prouza M, et al. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation[J]. **J Biotechnol**, 2009, 139: 203–210.
- [31] Park J H, Lee K H, Kim T Y, et al. 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.