

微生物生产 L-苏氨酸的代谢工程研究进展

董迅衍^{1,2}, 王小元^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: L-苏氨酸作为一种必需氨基酸被广泛用于食品、饲料、医药及化妆品行业。目前 L-苏氨酸主要通过微生物发酵法生产。代谢工程技术的应用为菌种选育开辟了有效途径,使在现有高产基础上进一步提高氨基酸的产量成为可能。作者对两大氨基酸生产菌——大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中的 L-苏氨酸生物合成相关途径、代谢调控机理以及运用代谢工程技术提高 L-苏氨酸产量所取得的成果进行了系统综述。

关键词: L-苏氨酸;谷氨酸棒杆菌;大肠杆菌;代谢工程;发酵

中图分类号: Q 933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)12—1233—08

Advances in Microbial Metabolic Engineering to Increase L-Threonine Production

DONG Xunyan^{1,2}, WANG Xiaoyuan^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: As an essential amino acid for mammals, L-threonine has a wide application in the food, feeds, pharmaceutical and cosmetics industries. To date, L-threonine is almost exclusively produced through microbial fermentation. Metabolic engineering provides an effective means to strain development and thus to enhancing the L-threonine production. In this article, the pathway and regulation of L-threonine in the major industrial strains, *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* are summarized, and advances on metabolic engineering to increase L-threonine production are reviewed.

Keywords: L-threonine, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, metabolic engineering, fermentation

收稿日期: 2016-07-08

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB725202); 国家自然科学基金项目(NSFC31370131); 江南大学博士科研基金项目(JUDCF11025)。

作者简介: 董迅衍(1986—), 女, 江苏无锡人, 发酵工程博士研究生, 主要从事氨基酸生产菌株代谢工程方面的研究。

Email: xunyandong@gmail.com

* 通信作者: 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: xwang@jiangnan.edu.cn

氨基酸发酵产业规模在过去 10 年中整整扩大了一倍, 目前达到了 500 万 t/年。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 及其亚种是发酵法生产氨基酸的主力军。其中, 由微生物发酵法生产、年产量排名前三的分别是 L-谷氨酸 (220 万 t)、L-赖氨酸 (195 万 t) 和 L-苏氨酸 (33 万 t)^[1-2]。如图 1 所示, 由 1993 年的 0.4 万 t/年到 2014 年的 330 万 t/年, L-苏氨酸的世界年产量提高了 82 倍。目前, 全球 L-苏氨酸以每年超 20% 的增长率高速增长, 这主要是因为 L-苏氨酸在饲料添加剂行业的需求量增长迅速。近年来的研究表明, 作为 8 种必需氨基酸之一, L-苏氨酸是猪饲料的第二限制氨基酸和家禽饲料的第三限制氨基酸。以添加了苏氨酸的低蛋白配方饲料作为家禽日粮, 不但降低了饲喂成本, 还有利于家禽吸收, 可促进家禽的生长^[3]。除了可以缓解天然蛋白质的匮乏, 家禽饲料营养配比合理还可以有效减少动物氮的排放, 从而减少环境污染, 有利于社会的可持续发展。此外, L-苏氨酸在食品、医药和化妆品等领域的用量也呈长期稳定增长趋势。在食品领域, L-苏氨酸是各类氨基酸保健饮品的配方成分, 也是重要的食品强化剂, 可以与其他氨基酸共用起到抗氧化的作用, 还可以与葡萄糖共热产生焦香味。在医药领域, L-苏氨酸有促进人体生长发育、促进骨髓 T 淋巴细胞前体分化发育成为成熟 T 淋巴细胞和抗脂肪肝的药用疗效, 因此在临床方面有着广泛的应用。此外, L-苏氨酸还是制造高效低过敏的抗生素单酰胺菌素等药物的中间体。在化妆品领域, L-苏氨酸的分子具有羟基结构, 因此可用作保湿剂^[4]。

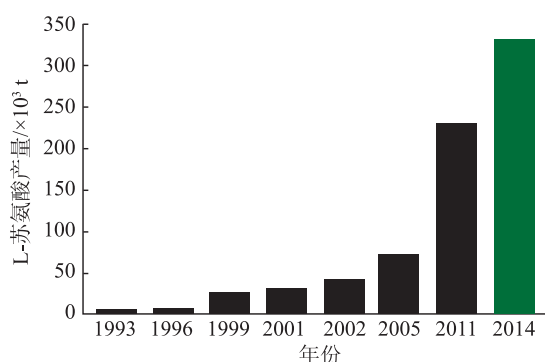


图 1 L-苏氨酸世界年产量

Fig. 1 L-threonine world annual yield

1 L-苏氨酸的生物合成途径

L-苏氨酸的生物合成以 TCA 循环中间代谢物草酰乙酸为前体。底物葡萄糖代谢经过糖酵解途径、磷酸戊糖途径、TCA 循环及 C3-C4 回补途径等中心代谢途径, 由草酰乙酸经天冬氨酸转氨酶催化生成 L-天冬氨酸, 即进入 L-苏氨酸合成途径, 见图 2。此转氨反应中, 由 L-谷氨酸提供氨基基团。其中, C3-C4 回补途径是指在磷酸烯醇式丙酮酸-丙酮酸-草酰乙酸节点处发生的 C3 化合物的羧化反应以及 C4 化合物的脱羧反应。由磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 和丙酮酸羧化酶 (PC) 分别催化的磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸的羧化反应, 直接生成草酰乙酸; 而由磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 催化的草酰乙酸和苹果酸的脱羧反应, 则直接消耗掉草酰乙酸。在 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 中, PEPC、PEPCK 和 PC 均分别由 *ppc*、*pck* 和 *pyc* 基因编码^[5]。

由 L-天冬氨酸起, L-苏氨酸途径包含 5 步酶催化反应: 1) 天冬氨酸激酶 (AK), 催化 L-天冬氨酸 γ -羧基磷酸化生成磷酸天冬氨酸; 2) 天冬氨酸半醛脱氢酶 (ASD) 以 NADPH 为还原力, 催化磷酸天冬氨酸还原生成天冬氨酸半醛; 3) 高丝氨酸脱氢酶 (HD) 以 NADPH 为还原力, 催化天冬氨酸半醛脱羧生成 L-高丝氨酸; 4) 高丝氨酸激酶 (HK), 催化 L-高丝氨酸磷酸化, 生成磷酸高丝氨酸; 5) 苏氨酸合酶 (TS) 催化磷酸高丝氨酸脱磷酸基团, 生成 L-苏氨酸。在 *E. coli* 中, AK 有三种同工酶, 分别为 AKI、AKII 和 AKIII^[14-15]; HD 有两种同工酶, 分别为 HDI 和 HDII。AKI 和 HDI 组成双功能酶, 由 *thrA* 基因编码; AKII 和 HDII 组成双功能酶, 由 *metL* 基因编码^[8]; 单功能的 AKIII 则由 *lysC* 基因编码^[17]。在 3 种 EcAK 中, EcAKI 的蛋白质丰度最高, 而 EcAKII 的蛋白质丰度最低。EcASD、EcHK 和 EcTS 则均为单一酶, 分别由 *asd*、*thrB* 和 *thrC* 基因编码^[18-19]。在 *C. glutamicum* 中, 上述 5 种酶均不存在同工酶: AK 由 *lysC* 基因编码^[10]; ASD 由 *asd* 基因编码^[9]; HD 由 *hom* 基因编码^[10]; HK 由 *thrB* 基因编码^[10]; TS 由 *thrC* 基因编码^[10]。L-苏氨酸由胞内向胞外转运被认为是微生物发酵生产 L-苏氨酸的限速步骤。在 *E. coli* 中, 有 3 种 L-苏氨酸输出蛋白质: RhtA、RhtB 和 RhtC, 分别由 *rhtA*、*rhtB* 和 *rhtC* 基因编码^[11-12]。在 *C. glutamicum* 中, 目前仅发现 1 种 L-苏氨酸输出蛋白



Fig. 2 Biosynthesis pathway of L-threonine

对于L-苏氨酸生物合成而言,碳流的浪费主要是由以下4条途径造成:1)其合成途径上的L-赖氨酸旁支路途径;2)L-甲硫氨酸旁支路途径;3)其合成后在胞内被降解为甘氨酸;4)用于合成L-异亮氨酸。L-赖氨酸旁支路途径在*E.coli*和*C. glutamicum*中都是由*dapA*基因编码的二氢吡啶二羧酸合酶(DDPS)催化起始^[15]。L-甲硫氨酸旁支路途径在*E. coli*中则由*metA*基因编码的琥珀酰基转移酶(SCT)催化起始^[16];在*C.glutamicum*中则由*metX*基因编码的乙酰基转移酶(ACT)催化起始。需要特别

说明的是,在 *C.glutamicum* 中,分别存在 2 条 L-赖氨酸合成途径(split pathway,在二氢吡啶二羧酸节点处分裂成两条途径)^[17]和 2 条 L-甲硫氨酸合成途径(在氧乙酰高丝氨酸节点处分裂成两条途径)^[18]。L-苏氨酸降解成甘氨酸的途径 L-苏氨酸降解生成甘氨酸的途径在 *E. coli* 中有两条,分别由 *tdh* 基因^[19]编码的苏氨酸脱氢酶(TDH)和 *ltaE* 基因^[20]编码的苏氨酸醛缩酶(TA)催化起始;而在 *C.glutamicum* 中目前只发现了一条,是由 *glyA* 基因编码的丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)催化一步生成。

2 L-苏氨酸生物合成调控机制

在 *E. coli* 中, L-苏氨酸合成途径上所有基因的转录都受终端产物的反馈阻遏调控; *thrA*、*thrB* 和 *thrC* 基因的转录受 L-苏氨酸和 L-异亮氨酸协同反馈阻遏调控; *metL* 基因的转录受 L-甲硫氨酸反馈阻遏调控; *lysC* 基因的转录受 L-赖氨酸反馈阻遏调控; *asd* 基因的转录受 L-赖氨酸、L-苏氨酸和 L-甲硫氨酸共价反馈阻遏调控^[21]。其中, *thrA*、*thrB* 和 *thrC* 基因在染色体上组成 *thrABC* 操纵子^[22]。在 *thrA* 基因可读编码框上游存在一段 178 bp 长度的前导序列 *thrL*。L-苏氨酸和 L-异亮氨酸对这三个基因的转录调控由 *thrL* 介导的转录衰减机制实现。在 *thrA* 基因上游 37 个碱基位点处插入一个 G 碱基可解除该转录衰减调控^[23-24]。L-赖氨酸对 *lysC* 基因转录的调控则由其上游的前导序列介导的翻译衰减机制实现^[25]。而在酶活水平上, EcAKI-EcHDI、EcAKIII、EcHK 受终端产物反馈抑制调节。EcAKI 的活性受 L-苏氨酸不完全反馈抑制调节。L-苏氨酸既可通过改变 EcAKI 的构象, 又可通过与底物 L-天冬氨酸竞争结合位点抑制其活性。EcHDI 的活性同样也受 L-苏氨酸不完全反馈抑制调节, 但抑制机制为非竞争性^[6]。L-赖氨酸可以通过改变 EcAKIII 的构象而完全抑制其活性^[26-27]。定点突变 T344M、S345L 及 T352I 均可部分解除 EcAKIII 受 L-赖氨酸的抑制^[27]。EcHK 受反馈抑制情况较为复杂。它不但受终端产物 L-苏氨酸的竞争性反馈抑制及 L-赖氨酸的非竞争性反馈抑制, 还受底物 L-高丝氨酸(浓度高于 1 mmol/L 时)和 ATP(浓度高于 3 mmol/L 时)的抑制调节^[6]。

在 *C. glutamicum* 中, L-苏氨酸合成途径上只有 *hom* 和 *thrB* 两个基因的转录受 L-甲硫氨酸反馈阻遏调节。这两个基因在染色体上按 5' *hom*-*thrB* 3' 方向组成一个操纵子。该操纵子 5' 端上游有一长串反向重复序列, 预示存在衰减子作用, 与 *hom* 和 *thrB* 的转录受 L-甲硫氨酸反馈阻遏调节有关^[28]。而在酶活水平上, CgAK、CgHD 和 CgHK 三个酶的活性受终端产物的反馈抑制调节。CgAK 是变构调节酶, 其活性受终产物 L-苏氨酸和 L-赖氨酸的协同反馈抑制调节。多个 CgAK 编码基因上的突变位点均可完全解除该反馈抑制^[29]。CgHD 的活性受 L-苏氨酸反馈抑制调节。L-苏氨酸的结合单元位于

CgHD 的 C-端^[30]。2 mmol/L L-苏氨酸即可完全抑制野生型 CgHD 的活性。Dieter 等通过对 *hom* 基因进行 G1133A 单碱基突变得到的 CgHDG378E 突变体在 25 mmol/L L-苏氨酸存在时完全不受抑制; 且半抑制 L-苏氨酸浓度高达 100 mmol/L^[31]。CgHK 的活性略受 L-苏氨酸反馈抑制调节。酶学动力学实验结果表明, L-苏氨酸对此酶的抑制作用系竞争性抑制; 随着其底物 L-高丝氨酸浓度提高, 受抑制程度降低。野生型 CgHK 的半抑制 L-苏氨酸浓度为 25 mmol/L^[32]。基于竞争性抑制机制——底物与抑制物结合位点为同一个, 抑制的解除不能通过改变酶蛋白结构来实现, 而只能依靠提高底物 L-高丝氨酸的浓度来缓解^[33]。

3 L-苏氨酸生产菌代谢工程研究状况

L-苏氨酸生产菌构建过程中采用的代谢工程策略主要有: 1) 高效表达合成途径关键酶基因, 以提高合成途径碳流量; 2) 削弱竞争支路的碳流量, 以聚拢碳流, 同时减少副产物的合成; 3) 削弱 L-苏氨酸的胞内降解; 4) 加快 L-苏氨酸向胞外分泌, 以减少 L-苏氨酸的胞内降解及避免胞内产物浓度积累过高而抑制关键酶的催化活性。

3.1 加强 L-苏氨酸合成途径关键基因的表达

高效表达合成途径关键酶的编码基因, 尤其是抗反馈抑制的突变体基因, 可以有效地提高 L-苏氨酸产量。在 *E. coli* 中, 高效表达 *thrABC* 操纵子是最常用的策略。Livshits 等^[11]在 L-苏氨酸生产菌 *E. coli* MG442 中通过用质粒载体表达带有突变位点的 *thrA*₄₄₂*BC* 操纵子, 将 L-苏氨酸产量由 8 g/L 提高到 18.4 g/L。张雪等在野生型菌株 *E. coli* W3110 中通过用高拷贝质粒载体 pMD19-T 表达 *thrA*₃₄₅*BC* 操纵子实现了 9.2 g/L L-苏氨酸胞外积累^[34]。在 *C. glutamicum* 中, 高效表达 *lysC*、*hom* 和 *thrB* 这三个关键基因被证实对提高 L-苏氨酸合成有利。Eikmanns 等^[35]在 *C. glutamicum* DM368-3 (AEC^r, AHV^r) 中通过采用质粒载体高效表达 *homr*-*thrB* 操纵子, 将 L-苏氨酸产量由 6.3 mmol/L 提高至 14.1 mmol/L。Colon 等^[32]通过在 L-赖氨酸生产菌 *C. lactofermentum* ATCC21799 (AEC^r) 中用质粒载体组成型高效表达 *hom*^r, 同时诱导型高效表达 *thrB*, 实现 L-苏氨酸胞外积累达 11.8 g/L, 而原产物 L-赖氨酸的产量由 22.0 g/L 降至 0.8 g/L。

3.2 加强 L-苏氨酸向胞外分泌

当 L-苏氨酸积累达到一定浓度时,其由胞内向胞外的转运成为生产的限速步骤。高浓度的胞内 L-苏氨酸积累会抑制合成途径关键酶的催化活性,增加降解代谢产物的合成,甚至抑制细胞生长。因此,加强 L-苏氨酸向胞外分泌是非常有效的代谢工程策略。Kruse 等^[12]在 *E. coli* MG422 中通过用质粒载体分别表达内源的 *rhtB*、*rhtC* 和来自 *C. glutamicum* 的 *thrE*,将 L-苏氨酸产量分别提高了 1.4 倍、2 倍和 2.9 倍。Livshits 等^[11]在 *E. coli* MG422 (pAYC32-*thrABC*) 菌株中通过对染色体上 *rhtA* 基因起始密码子上游 1 个碱基进行 G→A 替换突变以加强其转录,将 L-苏氨酸产量由 18.4 g/L 提高到 36.3 g/L。Simic 等^[36]通过在 L-苏氨酸生产菌 *C. glutamicum* DR-17 中用质粒载体表达内源的 *thrE* 基因,将 L-苏氨酸产量由 5.8 g/L 提高到了 8.1 g/L。Diesveld 等^[37]通过在 *C. glutamicum* DM368-3(AECr,AHV^r) 中用质粒载体异源表达来自 *E. coli* 的 *rhtC* 基因,将 L-苏氨酸产量由 0.9 g/L 提高到了 3.7 g/L,并将副产物甘氨酸的产量由 1.1 g/L 降低至 0.15 g/L。

3.3 削弱 L-苏氨酸在胞内的消耗

L-苏氨酸发酵生产的过程中主要产生的副产物有 L-甘氨酸、L-异亮氨酸和 L-赖氨酸,其中前两者为 L-苏氨酸胞内降解代谢产物。由于转运蛋白和降解代谢途径之间相互竞争共同底物 L-苏氨酸,因此,减少胞内消耗损失可提高 L-苏氨酸产量,还可以减少副产物的产生,从而降低下游提取成本。Lee 等^[38]在一株 *E. coli* L-苏氨酸生产菌中通过对染色体上 *ilvA* 基因进行 C290T 突变以降低其编码的 TD 的催化活性,并通过敲除染色体上的 *tdh* 基因以减少 L-苏氨酸胞内消耗。Diesveld 等^[24]在 *C. glutamicum* DM1800-T 中通过对染色体上 *ilvA* 基因进行定点突变使其编码的 TD 失活,将 L-苏氨酸产量由 2.5 g/L 提高到 4 g/L。

3.4 系统代谢工程

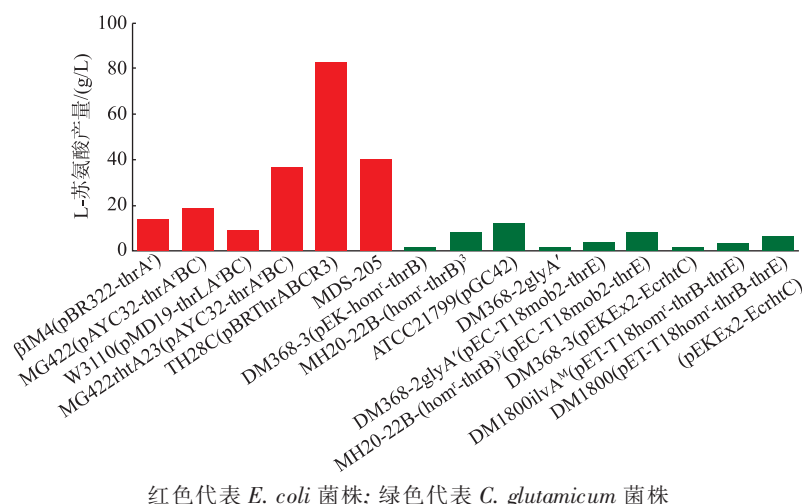
系统代谢工程技术的应用给 L-苏氨酸生产菌的构建带来了突破性的进展。通过系统代谢工程改造,研究人员成功构建出了几株 *E. coli* L-苏氨酸高产菌株。最典型的案例是由 Lee 等^[72]从野生型的 *E. coli* W3110 构建出高产 L-苏氨酸的 TH28C (pBRThrABCR3)。他们首先将 *E. coli* W3110 染色体上的 *lacI* 基因敲除,使一些强启动子如 P_{lac} 和 P_{trc}

可以进行组成型转录。其次,通过三步改造来加强 L-苏氨酸合成途径:1) 对染色体上 *thrA* 和 *lysC* 基因分别进行 C1034T 和 C1055T 定点突变,以解除 AKI 和 AKIII 的反馈抑制调节;2) 将染色体上 *thrABC* 操纵子的启动子替换成 P_{tac} 启动子,以解除反馈阻遏调节;3) 将解反馈抑制的 *thrABC* 操纵子放到质粒载体上过表达。接着,通过削弱竞争支路途径及 L-苏氨酸降解代谢途径来减少副产物并聚拢碳流:1) 敲除染色体上的 *lysA* 基因(编码 L-赖氨酸合成途径上最后一个酶)以阻断 L-赖氨酸的合成;2) 敲除染色体上的 *metX* 基因以阻断 L-甲硫氨酸支路;3) 敲除染色体上的 *tdh* 基因减少 L-苏氨酸向甘氨酸的转化;4) 通过对染色体上 *ilvA* 基因进行 C290T 突变以降低 TD 的催化活性,从而减少 L-苏氨酸向 L-异亮氨酸的转化。随后,通过加强前体草酰乙酸的供应来提高 L-苏氨酸产量:1) 将染色体上 *ppc* 基因的启动子替换成 P_{trc} 启动子以加强其转录;2) 敲除染色体上编码异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶的阻遏蛋白的 *iclR* 基因,以加强乙醛酸循环。再者,通过敲除 L-苏氨酸吸收转运蛋白基因 *tdcC* 以及用质粒载体过表达 *rhtA*、*rhtB* 和 *rhtC* 基因来加强 L-苏氨酸的分泌。最后,通过将染色体上乙酰辅酶 A 合酶编码基因 *acs* 的启动子替换成 P_{trc} 启动子以加强其转录,从而减少乙酸的积累。最终构建得到的菌株 TH28C (pBRThrABCR3) 在罐上分批补料发酵 50 h 可生产 82.4 g/L L-苏氨酸。L-苏氨酸-葡萄糖转化率达到 39.3%。并且不积累 L-乳酸,仅积累 2.35 g/L 乙酸,见图 3。

另一个典型案例是 Lee 等^[39]从基因组精简的 *E. coli* MDS42 出发构建出一株不含游离质粒的 L-苏氨酸高产菌 MDS-205。在 MDS-205 中,染色体上 *thrABC* 操纵子的启动子被 P_{trc} 启动子替换,而 *lacI*、*tdh* 基因被敲除;L-苏氨酸吸收蛋白基因 *tdcC* 和 *sstT* 被突变型 L-苏氨酸分泌蛋白基因 *rhtA23* 所替换。MDS-205 在罐上发酵 30 h 可生产 40.1 g/L L-苏氨酸,糖酸转化率达到 39.3%。该菌最大的特点是细胞生长强劲,尤其适合高密度细胞培养,可缩短发酵周期。

4 展望

随着市场需求量的不断加大,L-苏氨酸产业优化需要进一步提高产量、降低成本。我国 L-苏氨酸



红色代表 *E. coli* 菌株; 绿色代表 *C. glutamicum* 菌株

图 3 L-苏氨酸生产菌的代谢工程优化

Fig. 3 Metabolic engineering of L-threonine production strains

生产起步较晚,21 世纪初主要依靠进口,近几年虽然自主生产发展迅速,但是,我国饲料产业对 L-苏氨酸的需求量进一步加大。随着人们保健意识的加强以及 L-苏氨酸作为药物中间体等新价值的开发, L-苏氨酸在医药行业的应用越来越广。因此,构建 L-苏氨酸高产菌对社会发展及国民经济具有重要意义。目前工业上发酵生产 L-苏氨酸普遍采用 *E. coli* 菌株。其优点是生长迅速,发酵周期短,产量高。而在工业上产量排名前三(发酵法生产)的氨基酸中,除了 L-苏氨酸, L-谷氨酸和 L-赖氨酸均采用 *C. glutamicum* 发酵生产。*C. glutamicum* 是非致病的格兰氏阳性菌,符合食品安全标准,不生芽孢,并且生长也较快,被普遍认为是氨基酸发酵生产的理想菌

种。然而 *C. glutamicum* 的 L-苏氨酸合成能力在过去 20 年中始终未获得突破性的提高——L-苏氨酸产量和糖酸转化率都远低于 *E. coli*。作者所在团队从开发适用于 *C. glutamicum* 的分子操作工具(如基因表达和敲除载体)入手^[40-43],致力于 *C. glutamicum* 的氨基酸代谢工程研究^[44-47],对 *C. glutamicum* 的 L-苏氨酸合成能力仍在挖掘中^[48-50]。目前微生物发酵生产 L-苏氨酸的糖酸转化率仅为 40%~50%,与理论最大转化率 81%相比^[38],还有很大提升空间。运用代谢工程技术构建生产菌相对于传统育种的优点是可以大大缩短菌种选育的周期。此外,由于构建出的菌株遗传背景明确,后期发酵优化过程将可相应得到简化。

参考文献:

- [1] VOGT M, HAAS S, KLAFFL S, et al. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 22(3): 40-52.
- [2] Ajinomoto. Feed-use amino acids business[EB/OL]. 2013-10-01. <http://www.ajinomoto.com/en/ir/pdf/Feed-useAA-Oct2013.pdf>.
- [3] Ajinomoto. Feed-use amino acids business[EB/OL]. 2009-10-01. <http://www.ajinomoto.com/ir/pdf/Feed-useAA-Oct2009.pdf>.
- [4] 黄金, 徐庆阳, 陈宁. L-苏氨酸的生产方法及研究进展[J]. 河南工业大学学报, 2007, 28(5): 88-92.
HUANG Jin, XU Qingyang, CHEN Ning. The methods and study evolution of L-threonine production [J]. *Journal of Henan University of Technology*, 2007, 28(5): 88-92. (in Chinese)
- [5] UWE S, EIKMANN S B J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(4): 765-794.
- [6] CHASSAGNOLE C, RAIS B, Quentin E, et al. An integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 356(2): 415-423.
- [7] VIOLA R E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2001, 32(29): 339-349.
- [8] KATINKA M, COSSART P, SIBILLI L, et al. Nucleotide sequence of the *thrA* gene of *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(10):5730-5733.
- [9] CREMER J, TREPTOW C, Eggeling L, et al. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of General Microbiology**, 1988, 134(12):3221-3229.
 - [10] 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(2):53-62.
 - [11] LIVSHITS V A, ZAKATAEVA N P, ALESHIN V V, et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*[J]. **Research in Microbiology**, 2003, 154(2):123-135.
 - [12] KRUSE D, KRAMER R, EGGELING L, et al. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 59(2-3):205-210.
 - [13] DEBABOV, V G. The threonine story[J]. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 2003, 79:113-136.
 - [14] SIMIC P, SAHM H, EGGELING L. L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2015, 155(18):5317-5324.
 - [15] VELASCO A M, LEGUINA J I, Lazcano A. Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways[J]. **Journal of Molecular Evolution**, 2002, 55(4):445-449.
 - [16] RUCKERT C, PUHLER A, KALINOWSKI J. Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation [J]. **Journal of Biotechnology**, 2003, 104(13):213-228.
 - [17] SCHRUMPF B, SCHWARZER A, KALINOWSKI J, et al. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1991, 173(14):4510-4516.
 - [18] LEE H S, HWANG B J. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003, 62(5-6):459-467.
 - [19] BELL S C, TURNER J M. Bacterial catabolism of threonine-Threonine degradation initiated by L-threonine-NAD⁺ oxidoreductase [J]. **Biochemical Journal**, 1976, 156(2):449-458.
 - [20] LIU J, TOHRU D, NOBUYA I, et al. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1998, 255(1):220-226.
 - [21] BOY E, PATTE J C. Multivalent repression of aspartic semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12[J]. **Journal of Bacteriology**, 1972, 112(1):84-92.
 - [22] THEZEJ, Saint-Girons I. Threonine locus of *Escherichia coli* K-12: genetic structure and evidence for an operon[J]. **Journal of Bacteriology**, 1974, 118(3):990-998.
 - [23] GARDNER J F, REZNIKOFF W S. Identification and restriction endonuclease mapping of the threonine operon regulatory region [J]. **Journal of Molecular Biology**, 1978, 126(2):241-258.
 - [24] GARDNER J F. Regulation of the threonine operon: tandem threonine and isoleucine codons in the control region and translational control of transcription termination [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1979, 76(4):1706-1710.
 - [25] GRUNDY F J, LEHMAN S C, HENKIN T M. The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes[J]. **Proceedings of the National Academy of Science**, 2003, 100(21):12057-12062.
 - [26] CHASSAGNOLE C, RAIS B, QUENTIN E, et al. An integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli* [J]. **Biochemical Journal**, 2001, 356(2):415-423.
 - [27] KOTAKA M, REN J, LOCKYER M, et al. Structures of R- and T-state *Escherichia coli* aspartokinase III mechanisms of the allosteric transition and inhibition by lysine[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2006, 281(42):31544-31552.
 - [28] MATEOS L M, PISABARRO A, PATEK M, et al. Transcriptional analysis and regulatory signals of the *hom-thrB* cluster of *Brevibacterium lactofermentum*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1994, 176(23):7362-7371.
 - [29] YOSHIDA A, TOMITA T, KURIHARA T, et al. Structural insight into concerted inhibition of $\alpha\beta\gamma$ -type aspartate kinase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2007, 368(2):521-536.
 - [30] ARCHER J A, Solow-Cordero D E, SINSKEY A J. A C-terminal deletion in *Corynebacterium glutamicum* homoserine dehydrogenase abolishes allosteric inhibition by L-threonine[J]. **Gene**, 1991, 107(1):53-59.

- [31] REINSCHIED D J, EIKMANN S B J, SAHM H. Analysis of a *Corynebacterium glutamicum* hom gene coding for a feedback-resistant homoserine dehydrogenase[J]. **Journal of Bacteriology**, 1991, 173(10): 3228-3230.
- [32] COLON G E, JETTEN M S, NGUYEN T T, et al. Effect of inducible *thrB* expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1995, 61(1): 74-78.
- [33] MIYAJIMA R, OTSUKA S, SHIIO I. Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*-1-Inhibition by amino acids of the enzymes in the threonine biosynthesis [J]. **Journal of Biochemistry**, 1968, 63(2): 139-148.
- [34] 张雪, 闫继爱, 于雷, 等. 含苏氨酸操纵子重组质粒的构建及其对大肠杆菌 L- 苏氨酸积累的影响[J]. **微生物学报**, 2009, 49(5): 591-596.
- ZHANG Xue, YAN Jiai, YU Lei, et al. Construction of recombinant plasmids containing threonine operon and their effects on L-threonine accumulation[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2009, 49(5): 591-596. (in Chinese)
- [35] EIKMANN S B J, METZGER M, REINSCHIED D, et al. Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1991, 34(5): 617-622.
- [36] SIMIC P, WILLUHN J, SAHM H, et al. Identification of *glyA* (encoding serinehydroxymethyl transferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(7): 3321-3327.
- [37] DIESVELD R, TIETZE N, FURST O, et al. Activity of exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and their use to increase L-threonine production[J]. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2009, 16(3-4): 198-207.
- [38] LEE K H, PARK J H, KIM T Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production [J]. **Molecular Systems Biology**, 2007, 3(1): 149-156.
- [39] LEE J H, SUNG B H, KIM M S, et al. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. **Microbial Cell Factories**, 2009, 8(2): 2-13.
- [40] 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]. **Journal of Microbiological Methods**, 2010, 80(1): 86-92.
- [41] XU D, TAN Y, SHI F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Plasmid**, 2010, 64(2): 85-91.
- [42] 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(1): 44-52.
- [43] HU J, TAN Y, LI Y, et al. Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Plasmid**, 2013, 70(3): 303-313.
- [44] YIN L, HU X, XU D, et al. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Metabolic Engineering**, 2012, 14(5): 542-550.
- [45] ZHAO J, HU X, LI Y, et al. Overexpression of ribosome elongation factor G and recycling factor increases L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, 99(11): 4795-4805.
- [46] SHI F, LI K, HUAN X, et al. Expression of NAD⁺ (H) kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase improve NADPH supply and L-isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2013, 171(2): 504-521.
- [47] CHEN C, LI Y, HU J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for L-valine production [J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 29: 66-75.
- [48] DONG X, QUINN P, WANG X. Microbial metabolic engineering for L-threonine production [J]. **Subcellular Biochemistry**, 2012, 64: 283-302.
- [49] DONG X, ZHAO Y, ZHAO J, et al. Attenuating L-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on L-threonine and L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2016, 93-94: 70-78.
- [50] DONG X, ZHAO Y, HU 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 & Biotechnology**, 2016, 43: 873-85.