

工业微生物菌种改造的新方法——优势小基因组生产菌的构建

王媛媛, 郭文斌, 宋存江*

南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要:本文介绍了构建优势小基因组生产菌株的必要性和可行性;介绍了优势小基因组工业微生物的构建原理和方法;同时,还介绍了几个目前已成功应用的通过基因组精简提高生产效率的例证;最后,结合作者的研究对优势小基因组生产菌的应用进行了展望。

关键词:菌种改造,必需基因,基因组精简

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)03-0286-09

传统的工业微生物菌种改造是通过随机诱变(物理或化学因素),推理选育而实现。其操作靶点目标不明确、且需要大量的筛选工作,才能得到优良的菌株^[1]。分子生物技术的发展推动了基因工程技术的使用,人们能够目标明确的进行菌种改造,如:基因删除、克隆、整合或重组等,加快了工业微生物菌种改造的发展。代谢工程将分子育种和生物过程系统工程方法相结合,对胞内代谢网络的诸多特征进行精确定量的分析,通过重组 DNA 技术来赋予细胞理想的特性^[2],使工业微生物菌种改造又向前推进了一大步。

随着基因组测序技术的不断进步,基因组工程亦应运而生。基因组工程(genome engineering)是指为了实现某一目标对复制系统进行有意地、广泛地遗传修饰。本文所介绍的“工业微生物菌种改造的新方法——优势小基因组生产菌的构建”就是基于基因组的数据,对工业菌种进行基因组层面的遗传改造。

1 构建优势小基因组工业生产菌的必要性和可行性

最小基因组是指在最适宜条件下维持细胞生长繁殖所必需的最小数目的基因^[3],优势小基因组菌株是保留有菌株特殊功能基因簇的最小基因组菌株。基因组减少可以改善代谢效率,减少代谢调节网络中的冗余,获得高效的电转化率,准确的复制重组基因和稳定的质粒复制,基因组越小生长速度越快等,可提高菌株的预测性和可控性。优势小基因组菌株可以提高目标产物的合成量和含量,尽可能的消除副产物,提高菌株的生长繁殖速率,降低原料消耗,缩短生产周期^[3-5]。

最小基因组和优势小基因组菌株的构建也就是在认识目标菌株遗传信息的基础之上,根据具体的研究目的对于菌株基因组的精简。

众所周知,利用基因工程和代谢工程技术所获得的工业微生物菌株,比传统育种方式能够获得更具优势性状的菌种,极大地推动了微生物产业的发

基金项目:国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划(2012CB725204);国家自然科学基金(31070039,31170030,51073081)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-22-23503866; E-mail: songcj@nankai.edu.cn

作者简介:王媛媛(1986-),女,河北献县人,博士研究生,主要从事微生物合成方面的研究。E-mail: wyy2589@163.com

收稿日期:2011-10-11;修回日期:2012-01-14

展。然而,在发酵产业依然广泛存在有:① 发酵过程有副产物、② 底物转化率不高(非目的代谢过程消耗过多的能量)、③ 生长周期长(菌体生长繁殖速度慢)和④ 菌株不稳定(基因组中可转位元件的存在)等亟待解决的问题,也是不争的事实。优势小基因组菌株恰恰能够克服上述缺点。本文所介绍的基因组精简的例证,足以证明优势小基因组菌株构建是可行的。

有人说,“微生物基因组是微生物在自然界经过了长期的进化所形成的,它本身就是一个‘非常精简’了的基因组。采用外力干预基因组的组成,未必就能获得理想的结果”!诚然,野生菌株在自然界,为了适应千变万化的自然生存条件,为了抵御同类生物的生存竞争以及自然界存在的生物种群之间的基因水平转移等,进化形成了现有野生菌的基因组。这是不争的事实。但是,人类利用微生物进行生产实践和科学研究的条件是已知的,是可控的,与微生物在自然界的生存竞争条件相比,是极其不一样的。因此,野生菌株基因组中的某些片段是可以删除的,微生物基因组也是可以精简的。这样经过基因组精简所构建的优势小基因组微生物可控性更强,可预测性也会更高。一些成功的案例已经证明精简的小基因组微生物繁殖速度更快^[6]。

2 优势小基因组工业生产菌的构建过程(基因组精简过程)

工业生产菌株基因组精简的过程概括起来主要包括:① 在掌握菌株全基因组数据的基础上,② 确立菌株生长繁殖发育的必需基因和生产某产品的功能基因及其关联基因,③ 建立无痕敲除大片段基因序列的方法,采用所构建的方法进行基因组精简,④ 检验所构建的优势小基因组菌株的生长和生产状况。

2.1 完成菌株全基因组测序

DNA 测序技术自发明以来在推动分子生物学发展方面一直起着至关重要的作用。1995 年生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*) 全基因组测序完成后^[7],越来越多的生物被纳入基因组测序完成的名单。截至到 2011 年 7 月 1 日,GOLD (Genomes OnLine Database) 公开报道:已完成 6891 株综合微生物全基因组 (Integrated Microbial Genomes) 的测

序,包括 2780 株细菌、121 株真核微生物、107 株古菌、2697 株病毒和 1186 个质粒。

2.2 必需基因的确立和删除对象的确立

必需基因指能支持一个完整的生物体存活所必需的基因,包括编码与 DNA 复制、RNA 处理和修饰、解码遗传密码的 tRNA、翻译组分和分子伴侣等蛋白的基因。目前必需基因确立的方法主要包括有 3 种。

2.2.1 采用生物信息学、比较基因组学的方法预测菌株的必需基因、分析基因组岛和复制原点^[8-11]

采用生物信息学的方法确立删除对象,首先进行必需基因分析:使用生物信息学必需基因在线数据库 (Database of Essential Genes, DEG, <http://tubic.tju.edu.cn/deg/>),用所研究菌株的全基因组碱基序列和数据库中同类菌株的必需基因数据进行比对,相似性在 50% 以上的可能为必需基因(可以结合实际的敲除结果,修正相似性百分量进行比对,相似性较高的为必需基因),在基因组的大片段敲除过程中需要避开这些基因。此在线数据库为张春霆院士率领的天津大学生物信息研究中心所建。其次,进行基因组岛分析:使用生物信息学基因组岛在线分析软件 (<http://tubic.tju.edu.cn/GC-Profile/>) 对所研究菌株的全基因组碱基序列进行分析,分析得到 n 个分割点,将全基因组分成 $n+1$ 个片段,这 $n+1$ 个片段的 G+C 百分含量与全基因组 G+C 百分含量比较,差距较大者可能是基因组岛,可能为外来的(水平转移获得的)基因,可以删除。最后,进行复制原点分析:使用生物信息学中的复制原点在线分析软件 (<http://tubic.tju.edu.cn/Ori-Finder/>),对所研究菌株的全基因组碱基序列进行分析,可发现 oriC 的位置,可确定其大小,复制原点侧翼基因需要保留。总之,在选定删除片段的时候,利用生物信息学的方法进行预测,但是,在实际操作中,还要结合实际情况进行修正。

2.2.2 通过确立核心编码区,确定必需基因:选择亲缘关系较远的同属菌株全基因组序列,确定一个基因组的 backbone,即保守核心编码区。由于所选取菌株为同属但亲缘关系较远,保守核心编码区在进化过程中能够保存下来应该是菌体生长和基础代谢所必需的。核心编码区包含的基因被认为是必需基因,保守区之外的基因则可能是和次级代谢相关的具有菌种特异性的非必需基因。Mamoru Komatsu

使用该方法,确立了 *Streptomyces avermitilis* 的必需基因^[12]。

2.2.3 借助基因组水平代谢网络重构 采用计算机模拟确立必需基因:采用被精简微生物的基因组数据,利用 NCBI 数据库,可建立基因与蛋白之间的对应关系,将基因间的逻辑关系对应于相应酶的催化反应上。从而,可构建出初始代谢网络;将该网络转化成数学式,对模型进行分析、模拟、验证和填补,得到定量的、具有高精度预测能力的全基因组水平代谢网络模型。进一步建立调控网络和信号网络。采用流平衡分析(FBA)、代谢调节最小化分析(MOMA)、调节的开关最小化(ROOM)以及含有二次线性规划的动态流平衡(DFBA-LQR)等网络分析方法,结合已知必需基因信息,对被精简微生物进行计算机模拟的基因组精简,确立必需基因^[13]。

2.3 通过无痕删除对菌株基因组进行精简

目前对细菌基因组进行定点无痕修饰的方法日渐成熟,主要包括:传统同源重组即利用宿主菌自身 RecA 修复系统的双交换同源重组,利用 λ -Red 系统的同源重组,利用 Cre/loxP 的切除系统和 Tn 转座系统^[14-17]。在大片段基因序列的敲除实验中,与传统的同源重组相比, λ -Red 系统具有很多优点:①需要的同源序列片段短,②打靶分子为线性,无需构建打靶载体,③利用噬菌体重组酶介导,大大提高了重组效率,④既可以完成单一碱基对的敲除,也可完成 100 kb 以上的靶基因的敲除。但是,对于酵母以外的真菌,尚不能利用 λ -Red 系统,它们的同源重组还需要借助宿主体内自身的重组系统。Cre/loxP 系统则会在敲除完成后留下一个 loxP 位点,不是严格意义上的无痕。

3 基因组精简提高生产效率的例证

生殖道支原体 (*Mycoplasma genitalium*) 拥有自然界自由生长的微生物中最小的基因组,长度只有 580 kb,编码大约 480 个蛋白。即使在生殖道支原体的基因组中也存在着约 100 个非必需基因,这些基因的失活不会对细胞的正常生命活动产生影响。这激发了众多研究者进一步探索维持一个细胞正常生存的最小基因组。转座子突变显示,在实验室条件下,只需 387 个蛋白基因和 43 个结构 RNA 基因

就能维持生殖道支原体生存^[18]。大肠杆菌、枯草芽胞杆菌、谷氨酸棒杆菌、粟酒裂殖酵母、酿酒酵母等一些微生物已经完成基因组的初步精简,删除范围从 4% - 29.7% 不等,获得的突变株出现了一些新的特性^[19-26]。下面详细介绍了几株微生物基因组精简后,突变株合成产物能力提高的例证。

3.1 大肠杆菌基因组精简提高苏氨酸产量

大肠杆菌是了解得最清楚、分析得最透彻的微生物,是遗传学研究、生化研究和代谢模拟研究的模式生物。大肠杆菌是遗传重组领域广泛应用的宿主之一,在医药和发酵工业中用于生产重组蛋白、氨基酸和其他化学品。2001 年,日本启动了 MGF (Minimum genome factory) 计划,目标即是构建一株最小基因组的菌株作为细胞工厂。在该计划中, *Escherichia coli* K12 的 4.6 Mb 基因组被削减至 3.6 Mb,得到突变株 MGF-01^[27]。在选定删除片段时,研究人员首先是对比了 *Escherichia coli* K12 和 *Buchnera* sp 的基因组序列,相同的基因被认为是必需基因。*Buchnera* sp 是一种蚜虫的内共生菌,和 *Escherichia coli* 有很近的亲缘关系。它的基因组被认为在与环境相适应的过程中已经比 *Escherichia coli* 的基因组精简很多。同时维持 *Escherichia coli* 在最小培养基中生存的基因也是必需基因,避开这些基因,且包含多于 10 个基因的核酸片段被选为敲除目标。对于这些片段的敲除,Hiroshi Mizoguchi 等人采用的是两个连续的 λ -Red 介导的同源重组(图 1)。加有同源臂的链霉素敏感基因-蔗糖敏感基因-氯霉素抗性基因片段首先通过一轮的 λ -Red 同源重组代替靶基因,筛选氯霉素抗性转化子进行第二步的同源重组。将整合的上下游同源臂片段通过第二轮 λ -Red 同源重组替换插入的片段。筛选链霉素抗性和蔗糖抗性的转化子,获得目的突变株 MGF-01。

在 M9 培养基中,该突变株在对数生长期的生长速度和野生株相同,并且在野生株进入稳定期后,仍然生长,最终细胞密度是野生株的 1.5 倍。该研究组又将合成苏氨酸的遗传元件 ($\Delta metA::thrABC-cat$) 整合进突变株 MGF-01 和野生株的基因组中,发酵 48 h 结果表明,突变株 MGF-01 苏氨酸的合成能力是野生株的 2 倍,分别为 10 g/L 和 5 g/L。基因组中非必需基因的删除使其拥有了高于野生株的合成化合物的能力,这是构建细胞工厂的一个良好开端。

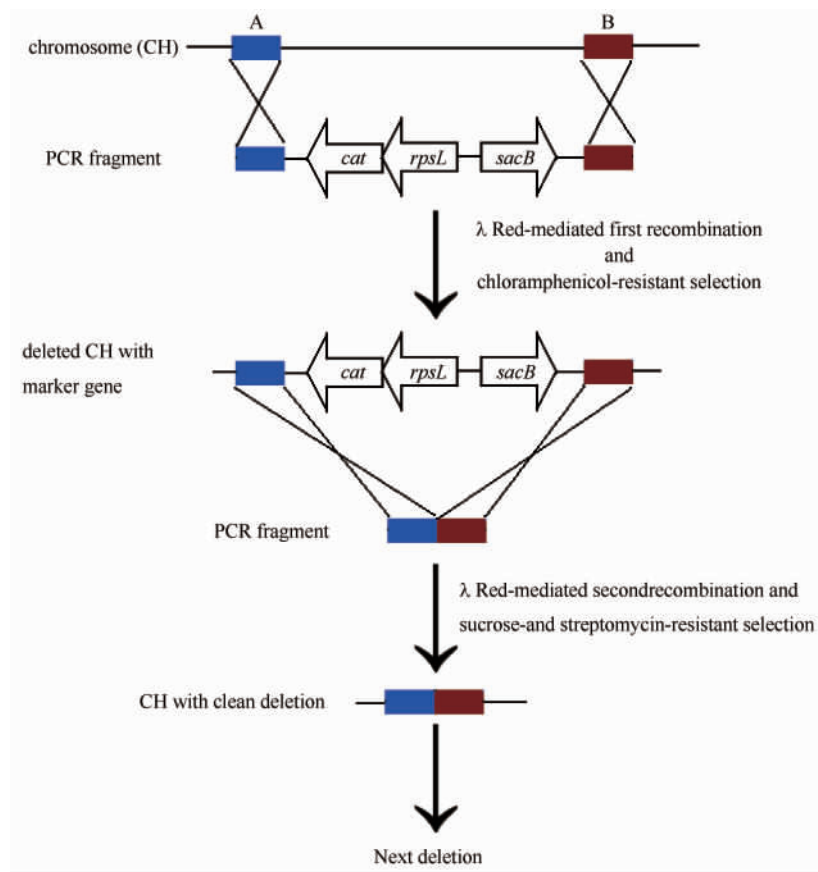


图 1 无痕敲除大肠杆菌大片段基因序列的原理示意图^[27]

Fig. 1 The strategy for construction of unmarked large-deletion mutants of *Escherichia coli*.

3.2 枯草芽胞杆菌基因组精简提高外源蛋白产率

枯草芽胞杆菌,是一种研究深入的微生物模式菌株,能够分泌多种具有重要应用价值的酶。枯草芽胞杆菌广泛应用于工业生产领域。Westers 等^[23]报道了一株枯草芽胞杆菌突变菌株 $\Delta 6$,该菌株通过删除两个原噬菌体 (SPb, PBSX) 减少了基因组的 7.7%。然而, $\Delta 6$ 的表型特征表明其没有独特的性质。2008 年,Takuya Morimoto 等人^[28]通过精简枯草芽胞杆菌的基因组得到了一系列突变株,其中,MGB874 缺失 0.87 Mb 的基因序列,并表现了良好的特性。他们首先通过转录组分析,确定 10 kb 以上的不编码 RNA 和特殊蛋白质的基因序列,并且排除所有已知的和可能的初级代谢基因,利用 RecA 介导的同源重组的方法(图 2),无痕敲除靶基因序列,其中包括噬菌体、次级代谢相关基因等。

得到突变体后,研究人员检测了该突变株生产耐热碱性纤维素酶和碱性蛋白酶的能力。他们将构

建的蛋白酶表达载体分别转入得到的突变株中。分析发现,两种蛋白酶的产量随着缺失基因序列的增多而增大。MGB874 发酵液中纤维素酶和蛋白酶的活性比野生型细胞高约 1.7 和 2.5 倍,而且蛋白酶生产期也被延长。此外,MGB874 细胞在培养液中麦芽糖消耗增强,表明碳源的利用效率改善也是基因组减少导致的。

3.3 啤酒酵母基因组精简突变体高效生产酒精

啤酒酵母,几个世纪以来用于酒精发酵工业,如今也是一个用于生物学的模式生物。对 6500 个基因的单独敲除,得到了维持啤酒酵母生长的基础基因。但这种方法得到的酵母突变体在发酵和适应环境方面不尽如人意,不能完全像一个真核微生物一样。为了研究有多少基因能维持酵母生存且同时能有效产生酒精,Kiriko Murakami 等人^[29]通过当前先进的 PCR 调节的染色体分裂 (PCS) 技术大规模缺失啤酒酵母的基因组,成功改造酵母染色体。

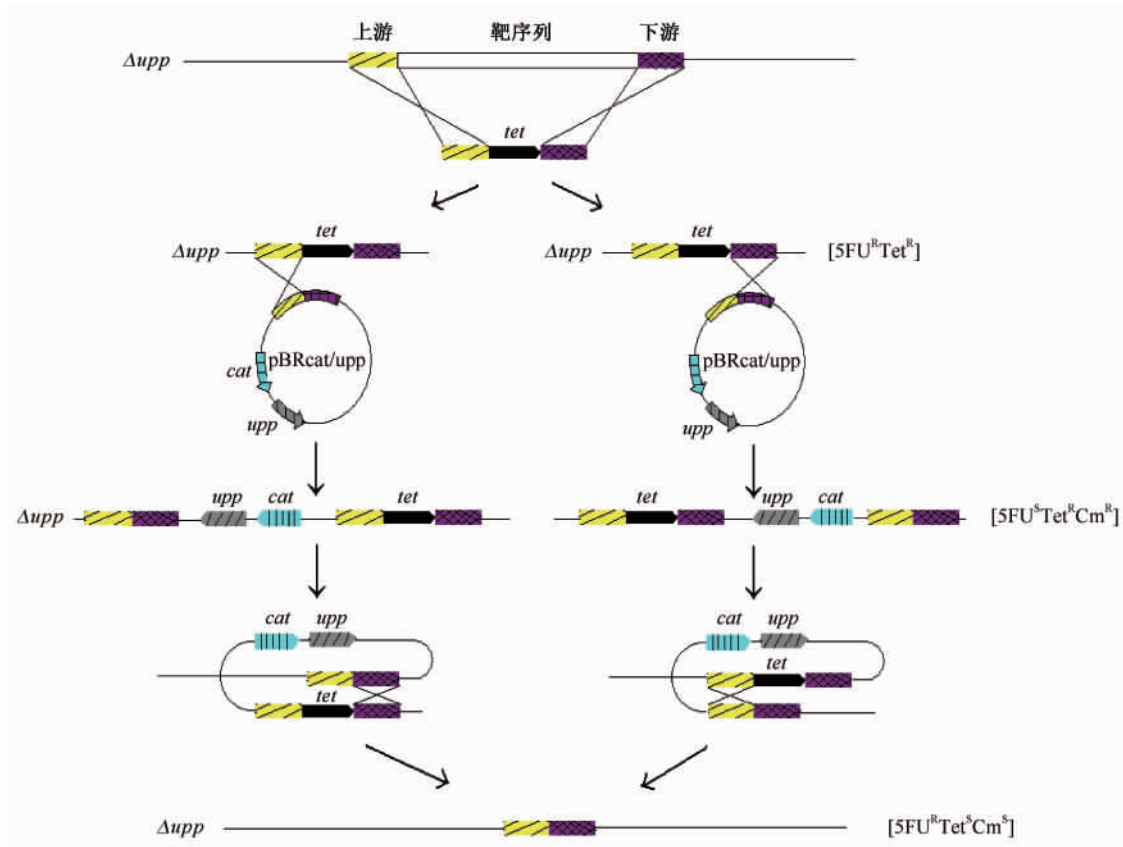


图 2 无痕敲除枯草芽胞杆菌大片段基因序列的原理示意图^[28]

Fig. 2 The strategy for construction of unmarked large-deletion mutants of *Bacillus subtilis*

在这项研究中,研究人员首先通过软件预测了基因组中可缺失的区域。该软件是一个网络在线系统,从一个非生长必需基因的删除开始,程序能找到在此条件下其他可以删除的基因区域,这些区域不包含已知的必需基因。该程序在以下网址可用 http://www.gbpr.riise.hiroshima-u.ac.jp/index_en.php。同时研究人员还参考了其他两个数据库:酵母菌属基因组数据库 (Saccharomyces Genome Database (SGD), <http://www.yeastgenome.org/>) 和广义酵母基因组数据库 (Comprehensive Yeast Genome Database, <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/>)。

选定靶位点后,研究人员用 PCR 调节的染色体分裂 (PCS) 技术敲除了啤酒酵母 5% 的基因组序列,实验原理可概括为下图 (图 3)。该技术的核心是裂解模块,包括三部分:靶标序列、两端加有 *loxP* 位点的标记物 (marker) 和可被修饰为端粒序列的 (C4A2)₆ 序列。裂解模块转化靶细菌,同源重组使染色体发生裂解,利用营养型筛选突变体。移除标记基因时,表达 Cre 蛋白的 pSH47 质粒转化靶细菌,

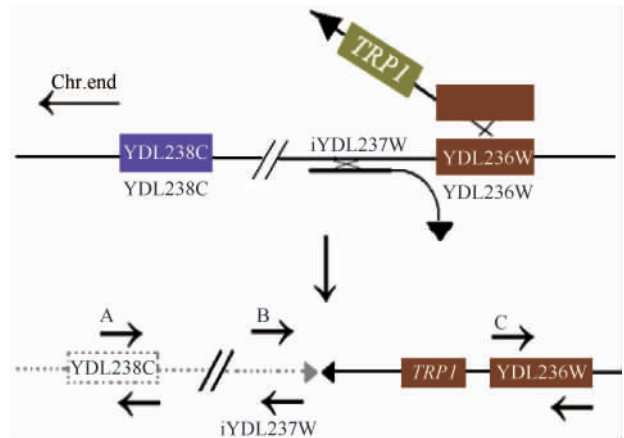


图 3 PCS 技术敲除啤酒酵母大片段基因序列原理示意图^[29]

Fig. 3 The strategy for construction of unmarked large-deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae* utilizing PCS.

筛选酪氨酸营养缺陷体,即为目的转化子。

对本研究得到的基因缺失体研究显示,大约 530 kb 的基因缺失不影响酵母的生长与发酵,其中,突变体 MFY1162 比母本多产 1.8 倍的酒精。对基

因表达谱的分析发现,缺失体中代谢受到非正常的调节导致了更多的酒精和甘油的产生。该研究首次修整了酵母的基因组,并证明基因功能重组有益于酒精生产。

3.4 链霉菌基因组精简突变体异源合成次级代谢物

链霉菌是重要的工业微生物,链霉菌属的细菌能够合成为数众多的次级代谢产物,包括抗生素和一些对人类健康、兽药研究和农业生产有价值的化合物。这些化学结构多样的代谢产物包括

聚酮类、非核糖体合成多肽、细菌素类、萜类和氨基糖苷类化合物等,表现出抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗肿瘤的作用,而且有抗高血压和免疫抑制的功能^[30]。

近年来,科研人员对应用工程菌异源合成次级代谢物有很大的兴趣。工业上用来生产驱肠虫剂阿佛菌素的 *Streptomyces avermitilis* 就是一株高效合成次级代谢产物的菌株,日本研究人员 Mamoru Komatsu^[12] 等就通过减小 *S. avermitilis* 基因组来实现其高效合成异源次级代谢产物的目的。

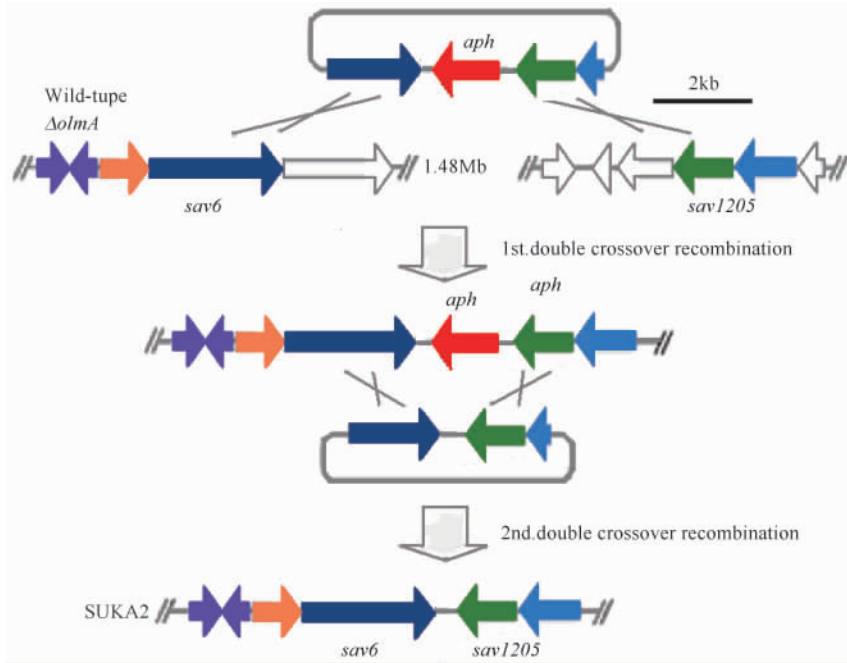


图4 两步双交换同源重组敲除链霉菌大片段基因序列原理示意图^[12]

Fig. 4 The strategy for construction of large-deletion mutants of *Streptomyces avermitilis* utilizing double crossover recombination.

在他们的研究中,首先通过比较三株分类学上不同的链霉菌 *Streptomyces avermitilis*、*Streptomyces coelicolor* A3 和 *Streptomyces griseus* 的基因组,发现一个 6.28 – 6.50 Mb 核心保守区。和其他两株菌不同的是, *S. avermitilis* 的基因组是不对称的,线性染色体的两端分别有一个 2 Mb 和 0.5 Mb 的近端区域。Mamoru Komatsu 等推测这些近端区域和菌种特异的次级代谢有关,它们的敲除应该不会影响菌体的正常生长和初级代谢。

两步双交换同源重组首先被用来无痕敲除 1.4 Mb 的片段(图 4)。大约 2 kb 的同源臂连接在卡那霉素/新霉素抗性基因 *aph* 的两侧,连接到

pGM160Δaac(3) I::oriT, 进行第一步双交换,基因 *aph* 替代靶位点。连有两个同源臂的 pGM160Δaac(3) I::oriT 再次导入宿主,进行第二次双交换,消除抗性基因 *aph*。

采用该方法他们得到突变体 SUKA2 (Δ7,734 – 1,494,898 nt),但是该方法假阳性率高,应用 Cre-loxP 的位点特异性重组是他们敲除的主要方法并获得了其他一系列的突变体(图 5)。在这种方法中,两个 loxP 位点分别通过双交换同源重组的方法整合到靶位点的上下游,Cre 蛋白表达质粒 pKU471 导入宿主菌,在 Cre 蛋白的作用下,在两个 loxP 位点之间发生同源重组,完成靶位点的敲除。

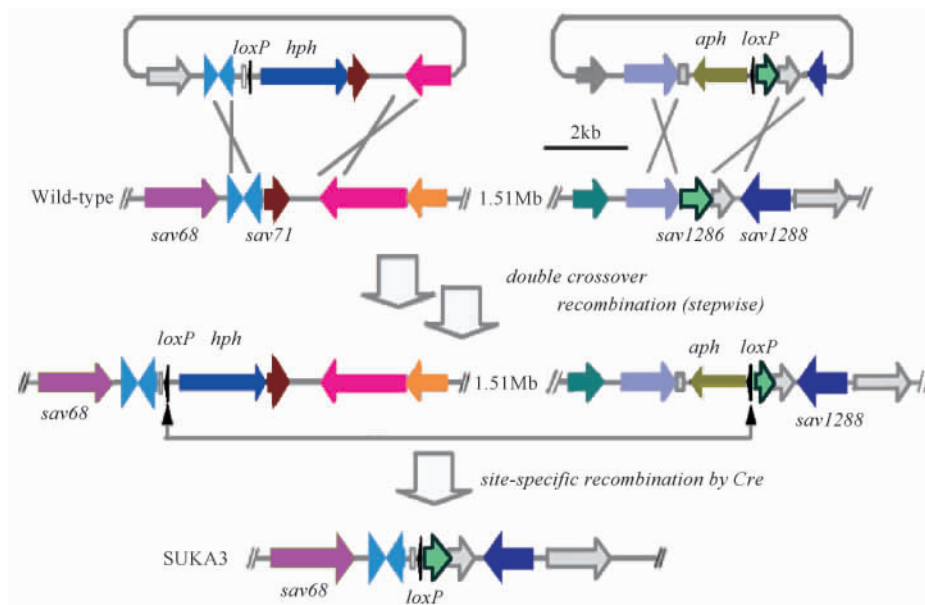


图5 Cre-LoxP 的位点特异性重组敲除链霉菌大片段基因序列原理示意图^[12]

Fig. 5 The strategy for construction of large-deletion mutants of *Streptomyces avermitilis* utilizing Cre-LoxP specific recombination system.

获得大片段(16.8% - 18.54%)缺失的突变体后, Mamoru Komatsu 等以突变体为宿主菌异源合成了链霉素(氨基糖苷类), 头孢霉素 C (β 内酰胺类), 普拉地内酯(大环内酯类)和植物倍半萜烯化合物。当使用的培养基为 *S. avermitilis* 合成阿佛菌素的最适培养基时, 链霉素和头孢霉素 C 在突变体中的产量均高出原宿主菌的产量。此外, 他们还还对次级代谢基因簇在突变体中的调控做了初步的研究探讨。

4 展望

笔者研究组已经完成了门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* NK-01^[31] 和解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* LL3^[32] 的全基因组序列测定。目前, 研究组正在构建适合于上述菌株大片段基因序列无痕删除的技术方法, 构建相应的优势小基因组菌株^[33-34]。其实, 优势小基因组研究属合成生物学的范畴。我国该领域研究与发展迅猛。涵盖人造细胞工厂、光合作用与人造叶片、新功能人造生物器件、药物创新与优产人工合成体系以及生物基材料合成新途径等 5 个项目已立项运行。诚然, 从基础到应用, 从技术到工程, 需要一定周期。笔者以为, 优势小基因组工业微生物菌株的构建在众多合

成生物学方法中是上手简单、研究周期较短的技术方法之一。笔者深信优势小基因组生产菌株将在生物医药、生物能源、生物材料、生物环境和生物制造等领域发挥出令人瞩目的作用。

参考文献

- [1] Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(3): 287-301.
- [2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press, 1998.
- [3] 张柳燕, 常素华, 王晶. 从首个合成细胞看合成生物学的现状与发展. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 2010, 55(36): 3477-3488.
- [4] Koonin EV. How many genes can make a cell: The minimal-gene-set concept. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2000, 1: 99-116.
- [5] 方宏清, 陈惠鹏. 大肠杆菌基因组减小研究进展. *生物技术通讯 (Letters in biotechnology)*, 2009, 20(4): 564-567.
- [6] 宋凯. *合成生物学导论*. 第一版, 北京: 科学出版, 2010: 6-10.
- [7] Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton

- G, Kelley JM, Fritchman RD, Weidman JF, Small KV, Sandusky M, Fuhrmann J, Nguyen D, Utterback TR, Saudek DM, Phillips CA, Merrick JM, Tomb JF, Dougherty BA, Bott KF, Hu PC, Lucier TS, Peterson SN, Smith HO, Hutchison CA 3rd, Venter JC. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 1995, 270: 397-403.
- [8] Mushegian AR, Koonin EV. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1996, 93: 10268-10273.
- [9] Koonin EV. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Natural Reviews Microbiology*, 2003, 1: 127-136.
- [10] Gao F, Zhang CT. Ori-Finder: a web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 79-84.
- [11] Gao F, Zhang CT. GC-Profile: a web-based tool for visualizing and analyzing the variation of GC content in genomic sequences. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34: 686-691.
- [12] Murakami K, Tao E, Ito Y, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Sumiya T, Nakamura A, Nishizawa M. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 75: 589-597.
- [13] 陈琦, 王卓, 魏冬青. 代谢网络流分析进展及应用. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 2010, 55(14): 1302-1309.
- [14] Fehér T, Papp B, Pal C, Pósfai G. Systematic genome reductions: Theoretical and experimental approaches. *Chemical Reviews*, 2007, 107: 3498-3513.
- [15] Zhang L, Chang S, Wang J. How to make a minimal genome for synthetic minimal cell. *Protein & Cell*, 2010, 1: 427-434.
- [16] Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular System Biology*, 2006, 2, doi: 10.1038/msb4100050
- [17] Sung BH, Lee JH, Kim SC. Systems Biology and Biotechnology of *Escherichia coli*. Daejeon: Springer, 2009: 19-40.
- [18] John IG, Nacyra AG, Nina A, Shibu Y, Matthew RL, Mahir M, Clyde A. Hutchison III, Hamilton OS, Venter JC. Essential genes of a minimal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 425-430.
- [19] Goryshin IY, Naumann TA, Apodaca J, Reznikoff WS. Chromosomal deletion formation system based on Tn5 double transposition: Use for making minimal genomes and essential gene analysis. *Genome Research*, 2003, 13: 644-653.
- [20] Vitaliy K, Guy P III, Christopher DH, Tamás F, János P, Frederick RB, György P. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Research*, 2002, 12: 640-647.
- [21] György P, Guy P III, Tamás F, David F, Günther MK, Kinga U, Vitaliy K, Buffy S, Shamik SS, Monika A, Valerie B, Sarah WH, Frederick RB. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312: 1044-1046.
- [22] Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, Tanaka K, Fujimitsu K, Keyamura K, Ote T, Yamakawa T, Yamazaki Y, Mori H, Katayama T, Kato J. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Molecular Microbiology*, 2005, 55: 137-149.
- [23] Helga W, Ronald D, Jan MD, Jorrit K, Tony F, Kevin MD, Florence J, Simone JS, Aaron CB, Elise D, Caroline E, Anne J, Sierd B, Oscar PK, Alessandra MA, Haike A, Michael H, Nicola Z, Uwe S, Claude B, Dusko SE, Juan CA, Margarita S, Wim JQ. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20: 2076-2090.
- [24] Ara K, Ozaki K, Nakamura K, Yamane K, Sekiguchi J, Ogasawara N. Bacillus minimum genome factory: Effective utilization of microbial genome information. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2007, 46: 169-178.
- [25] Nobuaki S, Hiroshi N, Yota T, Satoshi O, Masayuki I, Hideaki Y. Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69: 151-161.
- [26] Giga-Hama Y, Tohda H, Takegawa K, Kumagai H. *Schizosaccharomyces pombe* minimum genome factory. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2007, 46: 147-155.
- [27] Mizoguchi H, Mori H, Fujio T. *Escherichia coli* minimum genome factory. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2007, 46: 157-167.

- [28] Takuya M , Ryosuke K , Keiji E , Masatoshi T , Kazuhisa S , Shengao L , Tadahiro O , Takeko K , Hiroshi K , Yasushi K , Kenji M , Shigehiko K , Katsutoshi A , Katsuya O , Naotake O. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Research* , 2008 , 15 : 73-81.
- [29] Nett M , Ikeda H , Moore BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Products Reports* , 2009 , 26 : 1362-1384.
- [30] Mamoru K , Takuma U , Satoshi O , David EC , Haruo I. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2009 , 107 (6) : 2646-2651.
- [31] Guo WB , Wang YY , Song CJ , Yang C , Li Q , Li BB , Su WP , Sun XM , Song DF , Yang XJ , Wang SF. Complete genome of *Pseudomonas mendocina* NK-01 , which synthesizes medium-chain-length polyhydroxyalkanoates and alginate oligosaccharides. *Journal of Bacteriology* , 2011 , 193 (13) : 3413-3414.
- [32] Geng WT , Cao MF , Song CJ , Xie H , Liu L , Yang C , Feng J , Zhang W , Jin YH , Du Y , Wang SF. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 , which exhibits glutamic acid-independent production of poly- γ -glutamic acid. *Journal of Bacteriology* , 2011 , 193 (13) : 3393-3394.
- [33] Guo WB , Song CJ , Kong MM , Geng WT , Wang YY and Wang SF. Simultaneous production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates and alginate oligosaccharides by *Pseudomonas mendocina* NK-01. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-011-3333-0.
- [34] Cao MF , Geng WT , Liu L , Song CJ , Xie H , Guo WB , Jin YH , Wang SF. Glutamic acid independent production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Bioresource Technology* , 2011 , 102 : 4251-4257.

New method for industrial microbial strains improvement——construction of dominant genome-simplified strains—A review

Yuanyuan Wang , Wenbin Guo , Cunjiang Song*

Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology for Ministry of Education , College of Life Sciences , Nankai University , Tianjin 300071 , China

Abstract: The necessity and feasibility of constructing dominant genome-simplified strains for industrial production were introduced , based on some successful cases in which the production efficiency was improved after simplifying the genome of strains. The principle and process of genome simplifying were summarized. In addition , the perspective of dominant genome-simplified strains for industrial production was discussed , combined with authors' own studies.

Keywords: strain improvement , essential gene , genome simplifying

(本文责编 : 王晋芳)

Supported by the National Key Basic Research Program of China (2012CB725204) and by Natural Science Foundation of China (31070039 , 31170030 , 51073081)

* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-22-23503866 ; E-mail : songcj@nankai.edu.cn

Received : 11 October 2011 / Revised : 14 January 2012