



L-鸟氨酸发酵菌种的代谢工程研究进展

徐心怡¹, 张斌^{1*}, 吴晓玉¹, 江燕¹, 陈雪岚²

¹江西农业大学生物科学与工程学院, 江西省农业微生物资源开发利用工程实验室, 江西 南昌 330045

²江西师范大学生命科学学院, 功能有机小分子教育部重点实验室, 江西 南昌 330022

摘要: L-鸟氨酸是一种非蛋白类氨基酸参与尿素代谢及生物多胺类的合成, 其对人体具有治疗肝脏疾病、增强免疫力等作用, 被广泛应用于医疗、保健、食品等领域。工业上生产鸟氨酸主要有化学法、酶法及工业发酵法。其中, 发酵法因其生产成本及环境保护等方面的优势而逐渐成为研究的焦点。本文归纳了近年来采用基因工程技术选育鸟氨酸高产菌种最新研究进展, 重点讨论了产鸟氨酸谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造策略, 并对未来的研究方向进行了预测。

关键词: L-鸟氨酸, 代谢工程, 谷氨酸棒杆菌, 分子育种

1877年, 杰费在鸟尿的水解液中分离得到一种特殊的氨基酸, 随后将其命名为鸟氨酸。L-鸟氨酸是一种碱性氨基酸, 含有2个氨基和1个羧基, 化学名称为 α, δ -二氨基戊酸, 分子式为 $C_5H_{12}N_2O_5$ 。研究发现, 鸟氨酸是普遍存在于生物体内的一种非蛋白类氨基酸, 作为尿素循环途径的一种中间代谢产物, 也是合成精氨酸、瓜氨酸、胺类等重要代谢产物的前体物质, 其由于对肝脏方面具有解毒作用而被广泛应用于医药健康领域^[1-2]。

随着人们生活水平的提高, 市场上对鸟氨酸的需求也在逐年增长, 这也对鸟氨酸的生产提出

了更高的要求。目前, 用于生产鸟氨酸的方法主要有化学法、酶催化法和微生物发酵法。由于化学法合成鸟氨酸具有操作工艺复杂、环境污染等多种缺陷以及酶催化法合成鸟氨酸的高成本问题, 科学家正逐渐将研究焦点转移到利用微生物发酵法生产鸟氨酸。目前, 微生物发酵法已成功被应用于各种高附加值产品如有机酸^[3]、氨基酸^[4]、天然产物^[5]等的合成研究。微生物发酵法可以利用廉价的原料, 如葡萄糖、糖蜜、硫酸铵等经过高密度发酵, 依靠细菌自身的代谢反应生成鸟氨酸, 具有成本低、环境污染小、提高产量方面潜力大等优势。随着微生物分子育种方法的不断

基金项目: 江西农业大学博士科研启动基金; 国家自然科学基金(31660019)

*通信作者。Tel/Fax: +86-791-83813459; E-mail: zhangbin2919@163.com

收稿日期: 2019-06-02; 修回日期: 2019-08-03; 网络出版日期: 2019-12-06

断发展和微生物遗传操作系统的日益完善，越来越多的菌种被开发用于合成鸟氨酸。然而，尽管早在1961年人们就想到利用微生物发酵法合成鸟氨酸，但是微生物发酵法在鸟氨酸生产的应用较为有限，鸟氨酸发酵菌种的性能还有待提升^[6-7]。

1 L-鸟氨酸的生物合成途径

想要获得性能优良的L-鸟氨酸发酵菌种，首先就需要了解其生物合成途径。微生物体内，L-鸟氨酸的生物合成途径主要有两条，如图1所示。第一条是存在于大肠杆菌等微生物体内的线性合成途径。葡萄糖依次经历糖酵解途径、三羧酸循环途径转化为谷氨酸以后，谷氨酸再依次经历 *argA* 编码

的N-乙酰谷氨酸合成酶、*argB* 编码的N-乙酰谷氨酸激酶、*argC* 编码的N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸还原酶、*argD* 编码的N-乙酰鸟氨酸氨基转移酶、*argE* 编码的N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的催化最终生成鸟氨酸。此外，第二种是存在于棒杆菌、酵母菌、芽孢杆菌等微生物体内的经济循环途径。以谷氨酸棒杆菌为例，该菌体内，鸟氨酸合成代谢途径与大肠杆菌极为相似，均以谷氨酸为前体，经历多步酶促反应生成。然而，谷氨酸棒杆菌不存在 *argA*，其第一步N-乙酰谷氨酸的合成是由 *argJ* 编码的双功能酶鸟氨酸乙酰基转移酶和 *cg3035* 编码的乙酰基转移酶共同催化完成的。其中，发挥主要功能的是鸟氨酸乙酰基转移酶，其不仅能催化N-乙酰鸟氨酸的

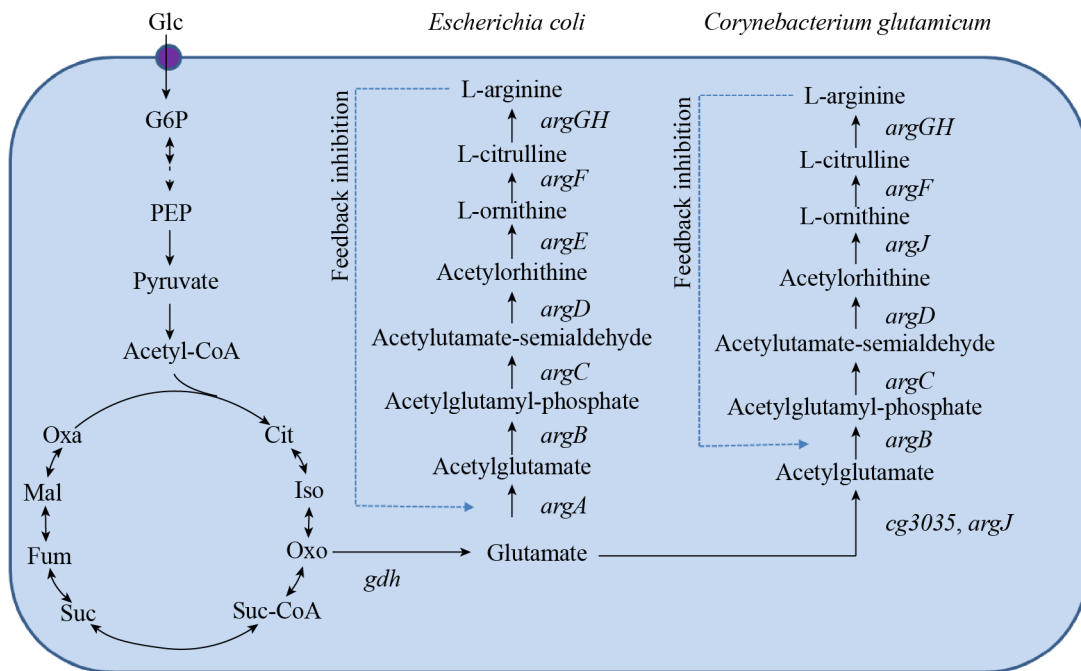


图 1. L-鸟氨酸生物合成途径

Figure 1. The metabolic pathway of L-ornithine. Glc: glucose; G6P: glucose-6-P; PEP: phosphoenolpyruvate; Qxa: oxaloacetate; Mal: malate; Fum: fumarate; Suc: succinate; Suc-CoA: succinyl-coA; Oxo: α -oxoglutarate; Iso: isocitrate; Cit: citrate; *gdh*: encodes glutamate dehydrogenase; *cg3035/argA*: encodes N-acetylglutamate synthase; *argB*: encodes N-acetylglutamate kinase; *argC*: encodes N-acetyl- γ -glutamylphosphate reductase; *argD*: encodes acetylornithine aminotransferase; *argE*: encodes N-acetylornithine deacetylase; *argF*: encodes ornithine carbamoyltransferase; *argJ*: encodes ornithine acetyltransferase; *argR*: encodes arginine repressor.

去乙酰化生成鸟氨酸, 又能将 N-乙酰鸟氨酸水解下来的乙酰基转移至谷氨酸生成 N-乙酰谷氨酸。此条代谢途径, 乙酰基作为一个辅基被循环利用, 因此也称为经济循环途径。在反馈调控方面, 大肠杆菌 *argA* 编码的 N-乙酰谷氨酸合成酶受到终产物精氨酸的反馈抑制, 而谷氨酸棒杆菌体内精氨酸则是对 *argB* 编码的 N-乙酰谷氨酸激酶具有反馈抑制作用(图 1)。大肠杆菌体内, 催化鸟氨酸合成的相关基因分散排列于基因组, 而在谷氨酸棒杆菌基因组内 *argCJBDFR* 以操纵子的形式排列并受到负调控蛋白 ArgR 的反馈阻遏^[8]。

2 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌产鸟氨酸

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*, 简称 *C. glutamicum*)被认定为一株非致病性的工业发酵菌种, 被广泛应用于合成各种氨基酸^[9]、工

业化学品^[10]、食品类产品等^[11], 在合成鸟氨酸方面同样具有非常大的潜力。生物体内鸟氨酸的合成是以谷氨酸为前体, 然后进一步依靠自身代谢途径完成的。因此, 选择能产大量谷氨酸的谷氨酸棒杆菌为底盘细胞合成鸟氨酸, 在前体供应方面具有较大的优势。传统选育高产鸟氨酸的谷氨酸棒杆菌主要是依靠化学诱变法, 同时结合类似物的筛选获得精氨酸营养缺陷型或瓜氨酸营养缺陷型菌种, 再从这些菌种筛选具有积累鸟氨酸的能力的突变体。然而, 利用化学诱变法筛选鸟氨酸高产菌种存在突变的随机性大、筛选工作繁琐以及易产生回复突变株等缺点, 使得其在鸟氨酸高产谷氨酸棒杆菌的选育方面应用有限。为了规避化学诱变法的缺点, 科学家们借助了快速发展的分子生物学技术, 对谷氨酸棒杆菌进行理性的改造, 使得产鸟氨酸工程菌的选育工作取得了长足的进步。近年来, 已有许多研究报道了开发谷氨酸棒杆菌产鸟氨酸的案例, 见表 1。

表 1. 目前被应用于合成鸟氨酸的谷氨酸棒杆菌

Table 1. Comparison of *C. glutamicum* strains engineered for L-ornithine production

Strains	L-ornithine production (g/L)/yield (g/g glucose)	Cultivation	Modulations	Reference
<i>C. glutamicum</i> SJC8514 (pEC- <i>argCJBDmut</i>)	12.48/ND	Shake flask; Batch	Overexpression of <i>NCgl0462</i> and <i>argCJBD</i> mut	[12]
<i>C. glutamicum</i> SO27	38.5/0.44	Shake flask; Batch	Deletion of <i>argF</i> , <i>ncgl1221</i> , <i>argR</i> , <i>putP</i> , <i>mscCG2</i> and <i>iolR</i> ; attenuation of <i>odhA</i> , <i>proB</i> , <i>ncgl2228</i> , <i>pta</i> , <i>cat</i> , <i>pgi</i> ; overexpression of <i>lysE</i> , <i>gdh</i> , <i>cg3035</i> , <i>pfkA</i> , <i>tkl</i> , <i>argCJBD</i> , <i>glt</i> , <i>gdh2</i>	[6–7]
<i>C. glutamicum</i> YW06 (pSY223)	51.5/0.240	Fermenter; Fed-Batch	Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , <i>proB</i> ; overexpression of pentose phosphate pathway and mutant N-acetylglutamate kinase	[13]
<i>C. glutamicum</i> ORN6	20.96*/0.524	Shake flask; Batch	Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , <i>argG</i> ; overexpression of <i>argB^M</i> ; attenuation of <i>pgi</i>	[14]
<i>C. glutamicum</i> SJC8039 Δ NCgl0281 Δ NCgl2582 Δ NCgl2053	14*/ND	Shake flask; Batch	Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , <i>proB</i> ; block the synthetic pathway of gluconate	[15]
<i>C. glutamicum</i> Δ APE6937R42	24.1/0.298	Fermenter; Batch	Deletion of <i>argF</i> , <i>argR</i> , <i>proB</i> ; adaptive evolution	[16–17]
<i>C. glutamicum</i> 1006 Δ <i>argR-argJ</i>	31.6/0.396	Shake flask; Batch	Deletion of <i>argR</i> ; overexpression of <i>argJ</i>	[18]

*These values were not described in the main text of the original reference and thus estimated from the figure or graph.

2.1 阻断鸟氨酸分解代谢及竞争支路代谢提高鸟氨酸产量

鸟氨酸作为精氨酸代谢的一个中间产物,可以在 *argF* 编码的鸟氨酸氨甲酰基转移酶的作用下生成瓜氨酸,而瓜氨酸进一步代谢生成精氨酸,同时精氨酸和瓜氨酸积累又分别会对其合成途径 *argB* 编码的 N-乙酰谷氨酸激酶和 *argJ* 编码的鸟氨酸乙酰基转移酶形成反馈抑制作用,从而抑制该通路的代谢流。因此,构建鸟氨酸高产菌种首先需要敲除 *argF*,阻断鸟氨酸的分解代谢途径,获得精氨酸和瓜氨酸营养缺陷型菌种。当前通过理性设计代谢工程改造构建的鸟氨酸高产工程菌种均对 *argF* 进行了敲除,同时也不可避免地需要向发酵培养基投入精氨酸以维持菌体的正常生长,这显然不利于节约成本。本课题组借助常规的遗传操作方法,如更换核糖体结合位点、替换起始密码子以及添加转录终止子等,弱化 *argF* 的表达量,结果发现基于同源重组的方法在 *argF* 基因上游插入强转录终止子 T4,可以有效抑制 *argF* 的转录,从而开发了一种基于添加转录终止子的代谢工程改造策略。应用此方法不仅可以降低 *argF* 的表达量以弱化鸟氨酸的分解代谢途径,同时还可以提高鸟氨酸合成基因簇 *argCJBD* 的表达量,最终获得一株鸟氨酸产量达到 6.1 g/L 的重组谷氨酸棒杆菌,与原始菌种相比其鸟氨酸产量提高了 11 倍,与 *argF* 敲除菌种相比鸟氨酸产量提高了 42.8%^[19]。此外,经过对代谢途径剖析发现,前体谷氨酸除了流向鸟氨酸合成途径以外,还可以流向脯氨酸合成的代谢支路,脯氨酸和鸟氨酸的合成存在竞争前体谷氨酸的关系。为了构建鸟氨酸高产菌,显然也需要对脯氨酸合成途径 γ -谷氨酰激酶的编码基因 *proB* 进行敲除,阻断谷氨酸的分支代谢流,使谷氨酸最大量地流向鸟氨酸合

成途径^[15]。然而,敲除 *proB* 虽然可以阻断脯氨酸的合成代谢途径,提高鸟氨酸的产量,但同时也使得菌种成为脯氨酸营养缺陷型,需要额外添加脯氨酸至发酵培养基方可维持细胞正常的生长。为了规避因向发酵培养基添加脯氨酸引起的成本问题,本课题组前期通过插入转录终止子的方法弱化 *proB* 的表达,发现此举不仅可以降低脯氨酸的合成代谢通量,提高鸟氨酸的产量,而且还不会导致菌种成为脯氨酸营养缺陷型^[20]。

2.2 解除胞内反馈阻遏及反馈抑制促进鸟氨酸的积累

鸟氨酸合成途径的四步酶促反应所需的基因 *argCJBD* 在谷氨酸棒杆菌基因组上以操纵子的形式排列,受到阻遏蛋白 ArgR 的反馈阻遏作用。开发鸟氨酸高产菌时,解除 ArgR 的反馈阻遏作用可以极大提升基因簇 *argCJBD* 的表达水平,从而强化鸟氨酸生物合成途径所需酶的表达丰度。因此,构建鸟氨酸和精氨酸高产菌种首先就需要敲除精氨酸操纵子的负调控蛋白 ArgR^[8]。此外,虽然针对鸟氨酸的反馈抑制靶点尚未得到报道,但构建的鸟氨酸高产菌种一般都是精氨酸营养缺陷型,需要向培养基投入一定量的精氨酸以满足菌体生长的需要,精氨酸则会对鸟氨酸合成途径的关键限速酶 N-乙酰谷氨酸激酶(由 *argB* 编码)形成反馈抑制作用,从而不利于鸟氨酸的合成。选育精氨酸高产菌种时,研究者们运用点突变的方法对 ArgB 与精氨酸结合的部位进行改造,得到多种对精氨酸敏感度降低的 N-乙酰谷氨酸激酶突变体,再通过质粒将这些酶导入谷氨酸棒杆菌,发现过表达这些酶突变体不仅可以提高精氨酸的产量,而且还可以应用于鸟氨酸高产菌种的选育。Jensen 等^[14]通过质粒表达当前报道的多种对精氨酸不敏感的

N-乙酰谷氨酸激酶突变体, 发现过表达源自大肠杆菌的 *argB*, 以及含有 A49V 和 M54V 突变的内源性 ArgB 可使得鸟氨酸的转化率达到 0.3 g/g 葡萄糖, 相对表达未突变的 *argB* 提高了接近 20%。

2.3 改造中心代谢途径优化鸟氨酸代谢流

通常情况下, 用于发酵合成鸟氨酸的原料是较好利用且廉价的葡萄糖。然而, 从葡萄糖到鸟氨酸还需要经历糖酵解途径和三羧酸循环途径生成 α -酮戊二酸, 然后在谷氨酸脱氢酶的作用下转化为谷氨酸, 谷氨酸又进一步在 *argC/JBD* 编码的相应酶的作用下最后生成鸟氨酸。因此, 强化中心代谢途径对鸟氨酸的合成同样具有重要作用。Jiang 等^[16]根据前期完成的全蛋白组学数据, 利用质粒分别对 *pgi*、*pfkA*、*gap*、*pyc*、*pyk*、*gltA* 和 *gdh* 等基因进行过表达, 结果发现过表达 *pgi*、*pfkA*、*gap*、*pyc*、*gdh* 对鸟氨酸的积累具有较大的促进作用。本课题组在构建鸟氨酸高产菌种的研究时, 也采用插入强启动子的方法分别在基因组水平对 *pfkA*、*gap*、*pyk* 进行过表达, 发现过表达 *pfkA* 可以使得鸟氨酸产量在出发菌种的基础上提高 11.2%^[17]。

2.4 增加细胞内辅因子的供给促进鸟氨酸的合成

生物体内, NADPH 是一种非常重要的辅因子, 广泛存在于体内的合成与分解代谢途径^[21-23]。谷氨酸棒杆菌体内, 脂肪酸以及多种氨基酸如赖氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、精氨酸等的合成均需要 NADPH 的参与, 且 NADPH 常常是限制产量进一步提升的限速瓶颈^[24-26]。根据鸟氨酸的生物合成途径, 从葡萄糖到鸟氨酸的合成代谢途径中有两步反应需要辅因子 NADPH 的参与: 第一步是在 *gdh* 编码的谷氨酸脱氢酶的作用下, 将 α -酮戊二酸转化成谷氨酸; 第二步是在 *argC* 编码的 N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸还原酶的作用下, 将 N-乙

酰-谷氨酰磷酸转化为 N-乙酰鸟氨酸。为了疏通辅因子对进一步提高鸟氨酸产量的限制, 研究者们开发了多种增加细胞内 NADPH 的方法。近期, 本课题组将谷氨酸棒杆菌蛋白降解标签 SsrA^[27]的其中一种短肽 AAV (AAEKSQRDYAAAV) 插入到 6-磷酸葡萄糖异构酶的 C 端以弱化其表达, 并通过插入强启动子的策略过表达 *tkt* 操纵子, 以及更换 *zwf* 的核糖体结合位点等方式提高了鸟氨酸产量^[7]。Kim 等^[13]利用强化磷酸戊糖途径的方法将更多的碳代谢流引向 NADPH 的合成, 为鸟氨酸的生物合成提供足量的辅因子。Hwang 等^[15]敲除了 3 个 NADP⁺ 依赖的氧化还原酶编码基因 *ncgl0281*、*ncgl2582* 和 *ncgl2053*, 使得细胞内 NADPH 的含量提高了 72.4%, 发酵液鸟氨酸产量相对出发菌种提高了 66.3%。Jiang 等^[17]通过表达源自丙酮丁醇梭菌的 *gapC*, 其编码的 3-磷酸甘油醛脱氢酶可以偶联 NADPH 的再生, 使得细胞可利用糖酵解途径生成 NADPH, 最终促进了鸟氨酸的积累。由此可见, 提高胞内辅因子 NADPH 的供给对提高鸟氨酸的发酵水平是非常有效的策略。

2.5 加强转运系统提高鸟氨酸产量

开发产氨基酸菌种时, 特异性转运系统的发现往往可以较大幅度地推动其发酵菌种性能的提升, 如谷氨酸转运蛋白 Ncg11221^[28]、赖氨酸转运蛋白 LysE^[29-31]等。目前针对鸟氨酸的特异性转运蛋白尚未报道, 2001 年, Bellmann 等^[32]在 *argF* 敲除菌中过表达 *lysE*, 短期发酵结果显示过表达 *lysE* 并不能使该菌胞内胞外的鸟氨酸含量发生变化, 得出 LysE 不能充当鸟氨酸转运蛋白的角色。然而, 近期本课题组在一株工业发酵生产谷氨酸的菌种谷氨酸棒杆菌 S9114 中过表达 *lysE*, 发现经过 72 h 的发酵可以使得鸟氨酸产量提高

21.8%^[8]。随后进行了敲除实验,发现敲除 *lysE* 可以使鸟氨酸产量下降 41.7%。同时,基于基因组插入强启动子的策略也同样可以过表达 *lysE*,鸟氨酸产量可以从 15 g/L 提升至 19 g/L。该研究结果进一步证实了谷氨酸棒杆菌 S9114 中过表达 *LysE* 对鸟氨酸产量提高具有重要作用^[20]。

3 利用代谢工程改造其他菌种发酵产鸟氨酸

3.1 钝齿棒杆菌

钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*, 简称 *C. crenatum*)是我国科学家从土壤中分离得到的另一种棒杆菌,其基因组与谷氨酸棒杆菌具有 99% 的相似度,理论上,该菌种应当具有类似谷氨酸棒杆菌的发酵产氨基酸性能。目前,对钝齿棒杆菌的研究主要集中于采用诱变育种或基因工程育种等手段对其进行改造,使其具有发酵产精氨酸的能力^[33-34]。位于精氨酸合成途径的鸟氨酸,作为一种高价值的非蛋白类氨基酸也进入了研究者的视线。Shu 等^[35]以钝齿棒杆菌为研究对象,通过切除竞争代谢途径,过表达大肠杆菌来源的 *argA* 以及粘质沙雷氏菌来源的 *argE*,最终得到一株在 5 L 发酵罐中鸟氨酸产量达到 40.4 g/L 的重组菌种。

3.2 大肠杆菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*, 简称 *E. coli*)是微生物界的“超级明星”,其由于遗传背景清楚、生长繁殖速度快、基因操作工具成熟等优势而被广泛应用于产各种高附加值化学品工程菌种的开发研究。目前,大肠杆菌已被成功改造产苏氨酸、精氨酸、丝氨酸等多种蛋白类氨基酸^[36]。鸟氨酸的合成也可以利用大肠杆菌作为底盘细胞,经过

相应的遗传改造,最后发酵生成。2006 年, Lee 等^[37]以常用于氨基酸分子育种的大肠杆菌 W3110 为出发菌种,进行了多种途径工程改造,如敲除 *argF* 阻断鸟氨酸向瓜氨酸的代谢,解除负调控蛋白 ArgR 的反馈阻遏作用,过表达抗精氨酸反馈抑制的 ArgA,以及敲除 *speF* 和 *proB* 阻断鸟氨酸向胺类的分解代谢和谷氨酸流向脯氨酸的竞争代谢支路,最终构建了一株重组大肠杆菌,其鸟氨酸产量达到 13.2 mg/g 菌体干重。

3.3 酿酒酵母

酿酒酵母又称面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, 简称 *S. cerevisiae*),是日常生活中与人类联系异常紧密的一种真核生物,在食品和酿酒方面得到非常广泛的应用^[38]。由于近代分子生物学技术的飞速发展,其在工业方面的应用逐渐可以与大肠杆菌相媲美,具备极其优良的分子生物学工具、能够高效表达复杂的酶等优势,从而成为极具吸引力的微生物细胞工厂^[39-40]。秦久福等^[41]利用模块化路径重新布线策略,将酿酒酵母体内鸟氨酸的合成代谢途径分为三个模块:第一,鸟氨酸降解或消耗模块,通过更换弱启动子 P_{KEX2} 弱化 *ARG3* 和敲除 *CAR2* 降低鸟氨酸的分解代谢;第二,鸟氨酸合成模块,改造靶点包括过表达内源性的 *ORT1*、*AGC1*、*GDH1* 基因、异源表达大肠杆菌来源的 *argA* 和 *argB* 以及谷氨酸棒杆菌来源的 *argC*、*argD* 和 *argJ* 等;第三, α -酮戊二酸合成模块,改造靶点包括过表达与 α -酮戊二酸合成有关的基因 *PDA1*、*PYC2*、*CIT1*、*ACO2* 和 *IDP1* 等和过表达 *MTH1- Δ AT* (编码己糖转运蛋白 Mth1p)。经过以上 3 个模块的改造,再结合对尿素循环途径 *CARI* 的过表达,最终使得鸟氨酸产量可以达到 1041 mg/L,首次开发了产鸟氨酸的真核微生物细胞。

4 展望

利用微生物发酵法生产鸟氨酸虽然是一个极富潜力的方法, 选育鸟氨酸高产菌种是热门的研究领域。当前, L-鸟氨酸发酵菌种的开发已取得了巨大进步, 利用微生物发酵法合成鸟氨酸已成为现实。但仍然存在生产成本低、菌种性能低等缺点。选育鸟氨酸高产菌种仍是一个亟待解决的问题。为了进一步提高鸟氨酸发酵菌种的性能, 接下来的研究可以集中于以下几个方面: (1) 挖掘鸟氨酸转运蛋白。除了 LysE 以外, 理论上谷氨酸棒杆菌体内应当存在特异性的转运蛋白负责鸟氨酸的运输。倘若能借助转录组学、蛋白质组学等系统生物学技术找出鸟氨酸转运蛋白, 再利用质粒或插入强启动子等方法对其进行过表达, 将不仅可以加强鸟氨酸向胞外的运输, 而且还能避免因胞内积累鸟氨酸产生的毒性和反馈调控问题, 可以为微生物发酵法合成鸟氨酸提供巨大的推动力。(2) 结合 CRISPR 技术高效改造鸟氨酸生物合成途径。随着科学技术的不断发展, CRISPR 基因编辑技术正以席卷的态势覆盖各个研究领域^[42], 并且已被广泛开发用于各种细菌, 如大肠杆菌^[43-45]、酿酒酵母^[46-47]、谷氨酸棒杆菌^[48-50]、枯草芽孢杆菌^[51]等工业菌种的遗传改造。在 CRISPR 基因编辑技术的推动下, 采用基因工程技术对鸟氨酸合成途径进行优化将更为高效和便捷。未来的途径工程改造可以进一步拓宽至糖酵解途径、三羧酸循环途径以及磷酸戊糖途径的大部分甚至每一个基因。另外, 借助 CRISPRi^[52]技术还可以对鸟氨酸合成途径关键基因的表达实行精细调控, 从而解决产物合成与菌体生长的矛盾关系, 进一步促进鸟氨酸产量的提升。(3) 建立鸟氨酸高通量筛选方法, 结合非理性菌种选育技术筛选鸟氨酸高产菌。虽然诱变育种、

定向进化等传统的非理性菌种选育技术具有筛选工作量大、正突变率少等缺点, 但其在基因突变的广度方面具有巨大的优势。通常情况下, 生物体的代谢网络极其复杂, 使得运用理性的基因工程技术对单个靶点进行改造的效率较低, 难以获得满意的效果。近年来, 代谢产物生物传感器的开发推动了高通量筛选方法的迅猛发展^[53], 如 Mahr 等^[54]基于转录调控因子 Lrp 开发了一种响应缬氨酸的胞内生物传感器, 然后借助适应性进化和荧光分选技术筛选到一种生长显著提升的突变株, 其缬氨酸产量较出发菌种提高了 25%, 并且副产物的含量也下降了 3-4 倍。若是能借助系统生物学技术找出响应鸟氨酸的合成生物学元件, 构建鸟氨酸高通量筛选方法, 再结合化学诱变、紫外诱变、常压室温等离子体诱变等技术应当可以获得较为理想的产鸟氨酸菌种。(4) 通过发酵过程控制提高鸟氨酸产量。当前对微生物发酵法合成鸟氨酸的研究主要集中于发酵菌种的开发工作, 但想要实现鸟氨酸的工业化生产, 选择合适的微生物发酵方法以及优化诸如溶氧、pH 等发酵参数同样具有重要作用。

参考文献

- [1] Goh ET, Stokes CS, Sidhu SS, Vilstrup H, Gluud LL, Morgan MY. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018, 5: CD012410.
- [2] Rathi S, Taneja S. Terminating and episode of overt hepatic encephalopathy: L-ornithine-L-aspartate may have some role. *Hepatology*, 2018, 67(2): 797.
- [3] Becker J, Wittmann C. Advanced biotechnology: metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and health-care products. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015, 54(11): 3328-3350.
- [4] D'Este M, Alvarado-Morales M, Angelidaki I. Amino acids production focusing on fermentation technologies-A review. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 14-25.

- [5] Jeandet P, Sobarzo-Sánchez E, Clément C, Nabavi SF, Habtemariam S, Nabavi SM, Cordelier S. Engineering stilbene metabolic pathways in microbial cells. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(8): 2264–2283.
- [6] Zhang B, Gao G, Chu XH, Ye BC. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 to enhance the production of L-ornithine driven by glucose and xylose. *Bioresource Technology*, 2019, 284: 204–213.
- [7] Zhang B, Yu M, Wei WP, Ye BC. Optimization of L-ornithine production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* S9114 by *cg3035* overexpression and manipulating the central metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 91.
- [8] Zhang B, Yu M, Zhou Y, Li Y, Ye BC. Systematic pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 for L-ornithine production. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 158.
- [9] Kogure T, Inui M. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(20): 8685–8705.
- [10] Kim HT, Khang TU, Baritugo KA, Hyun SM, Kang KH, Jung SH, Song BK, Park K, Oh MK, Kim GB, Kim HU, Lee SY, Park SJ, Joo JC. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of glutaric acid, a C5 dicarboxylic acid platform chemical. *Metabolic Engineering*, 2019, 51: 99–109.
- [11] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 122–141.
- [12] Kim DJ, Hwang GH, Um JN, Cho JY. Increased L-ornithine production in *Corynebacterium glutamicum* by overexpression of a gene encoding a putative aminotransferase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(1): 45–50.
- [13] Kim SY, Lee J, Lee SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 416–421.
- [14] Jensen JV, Eberhardt D, Wendisch VF. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the glutamate-derived compounds ornithine, proline, putrescine, citrulline, and arginine. *Journal of Biotechnology*, 2015, 214: 85–94.
- [15] Hwang GH, Cho JY. Enhancement of L-ornithine production by disruption of three genes encoding putative oxidoreductases in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(3): 573–578.
- [16] Jiang LY, Chen SG, Zhang YY, Liu JZ. Metabolic evolution of *Corynebacterium glutamicum* for increased production of L-ornithine. *BMC Biotechnology*, 2013, 13: 47.
- [17] Jiang LY, Zhang YY, Li Z, Liu JZ. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for increasing the production of L-ornithine by increasing NADPH availability. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(10): 1143–1151.
- [18] Hao N, Mu JR, Hu N, Xu S, Shen P, Yan M, Li Y, Xu L. Implication of ornithine acetyltransferase activity on L-ornithine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016, 63(1): 15–21.
- [19] Zhang B, Yu M, Zhou Y, Ye BC. Improvement of L-ornithine production by attenuation of *argF* in engineered *Corynebacterium glutamicum* S9114. *AMB Express*, 2018, 8: 26.
- [20] Zhang B, Ren LQ, Yu M, Zhou Y, Ye BC. Enhanced L-ornithine production by systematic manipulation of L-ornithine metabolism in engineered *Corynebacterium glutamicum* S9114. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 60–68.
- [21] Xu JZ, Yang HK, Zhang WG. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(7): 1061–1076.
- [22] Wang ZH, Chan SHJ, Sudarsan S, Blank LM, Jensen PR, Solem C. Elucidation of the regulatory role of the fructose operon reveals a novel target for enhancing the NADPH supply in *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 344–357.
- [23] Bommareddy RR, Chen Z, Rappert S, Zeng AP. A *de novo* NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Metabolic Engineering*, 2014, 25: 30–37.
- [24] Xu JZ, Ruan HZ, Chen XL, Zhang F, Zhang WG. Equilibrium of the intracellular redox state for improving cell growth and L-lysine yield of *Corynebacterium glutamicum* by optimal cofactor swapping. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18: 65.
- [25] Wu WJ, Zhang Y, Liu DH, Chen Z. Efficient mining of natural NADH-utilizing dehydrogenases enables systematic cofactor engineering of lysine synthesis pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 77–86.
- [26] Zhan ML, Kan BJ, Dong JJ, Xu GC, Han RZ, Ni Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved

- L-arginine synthesis by enhancing NADPH supply. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(1): 45–54.
- [27] Hentschel E, Will C, Mustafi N, Burkovski A, Rehm N, Frunzke J. Destabilized eYFP variants for dynamic gene expression studies in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(2): 196–201.
- [28] Wang Y, Cao GQ, Xu DY, Fan LW, Wu XY, Ni XM, Zhao SX, Zheng P, Sun JB, Ma YH. A novel *Corynebacterium glutamicum* L-glutamate exporter. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(6): e02691-17.
- [29] Dong XY, Zhao Y, Hu JY, Li Y, Wang XY. Attenuating L-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on L-threonine and L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93–94: 70–78.
- [30] Lubitz D, Jorge JMP, Pérez-García F, Taniguchi H, Wendisch VF. Roles of export genes *cgmA* and *lysE* for the production of L-arginine and L-citrulline by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8465–8474.
- [31] Xu MJ, Rao ZM, Yang J, Dou WF, Xu ZH. The effect of a LYSE exporter overexpression on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *Current Microbiology*, 2013, 67(3): 271–278.
- [32] Bellmann A, Vrljic M, Pátek M, Sahn H, Krämer R, Eggeling L. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 2001, 147(7): 1765–1774.
- [33] Man ZW, Rao ZM, Xu MJ, Guo J, Yang TW, Zhang X, Xu ZH. Improvement of the intracellular environment for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium glutamicum* by inactivation of H₂O₂-forming flavin reductases and optimization of ATP supply. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 310–321.
- [34] Guo J, Man ZW, Rao ZM, Xu MJ, Yang TW, Zhang X, Xu ZH. Improvement of the ammonia assimilation for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(3): 443–451.
- [35] Shu QF, Xu MJ, Li J, Yang TW, Zhang X, Xu ZH, Rao ZM. Improved L-ornithine production in *Corynebacterium crenatum* by introducing an artificial linear transacetylation pathway. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(6): 393–404.
- [36] Zhang XM, Xu GQ, Shi JS, Koffas MAG, Xu ZH. Microbial production of L-serine from renewable feedstocks. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(7): 700–712
- [37] Lee YJ, Cho JY. Genetic manipulation of a primary metabolic pathway for L-ornithine production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(22): 1849–1856.
- [38] Li SJ, Li YN, Smolke CD. Strategies for microbial synthesis of high-value phytochemicals. *Nature Chemistry*, 2018, 10(4): 395–404.
- [39] Lian JZ, Mishra S, Zhao HM. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 85–108.
- [40] Meadows AL, Hawkins KM, Tsegaye Y, Antipov E, Kim Y, Raetz L, Dahl RH, Tai A, Mahatdejkul-Meadows T, Xu L, Zhao LS, Dasika MS, Murarka A, Lenihan J, Eng D, Leng JS, Liu CL, Wenger JW, Jiang HX, Chao L, Westfall P, Lai J, Ganesan S, Jackson P, Mans R, Platt D, Reeves CD, Saija PR, Wichmann G, Holmes VF, Benjamin K, Hill PW, Gardner TS, Tsong AE. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production. *Nature*, 2016, 537(7622): 694–697.
- [41] Qin JF, Zhou YJ, Krivoruchko A, Huang MT, Liu LF, Khoomrung S, Siewers V, Jiang B, Nielsen J. Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables high-level production of L-ornithine. *Nature Communications*, 2015, 6: 8224.
- [42] Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 2018, 361(6405): 866–869.
- [43] Plateau P, Moch C, Blanquet S. Spermidine strongly increases the fidelity of *Escherichia coli* CRISPR Cas1-Cas2 integrase. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(29): 11311–11322.
- [44] Tao S, Qian Y, Wang X, Cao WJ, Ma WC, Chen KQ, Ouyang PK. Regulation of ATP levels in *Escherichia coli* using CRISPR interference for enhanced pinocembrin production. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 147.
- [45] Radovčić M, Killelea T, Savitskaya E, Wettstein L, Bolt EL, Ivančić-Baće I. CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 10173–10183.
- [46] Tarasava K, Oh EJ, Eckert CA, Gill RT. CRISPR-enabled tools for engineering microbial genomes and phenotypes. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1700586.
- [47] Zhang YP, Wang J, Wang ZB, Zhang YM, Shi SB, Nielsen J, Liu ZH. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, 2019, 10: 1053.
- [48] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, Liu YM, Dong F, Xu CM, Sun BB, Chen B, Xu XS, Li Y, Wang RX, Yang S. CRISPR-Cpf1

- assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nature Communications*, 2017, 8: 15179.
- [49] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, Shin JH, Yang D, Jang J, Lee SY. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 157–167.
- [50] Wang Y, Liu Y, Liu J, Guo YM, Fan LW, Ni XM, Zheng XM, Wang M, Zheng P, Sun JB, Ma YH. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 200–210.
- [51] Westbrook AW, Ren X, Moo-Young M, Chou CP. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for L-valine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(11): 2778–2792.
- [52] Cleto S, Jensen JV, Wendisch VF, Lu TK. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(5): 375–385.
- [53] Lim HG, Jang S, Jang S, Seo SW, Jung GY. Design and optimization of genetically encoded biosensors for high-throughput screening of chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 54: 18–25.
- [54] Mahr R, Gätgens C, Gätgens J, Polen T, Kalinowski J, Frunzke J. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 184–194.

Advances in metabolic engineering of L-ornithine producing strains

Xinyi Xu¹, Bin Zhang^{1*}, Xiaoyu Wu¹, Yan Jiang¹, Xuelan Chen²

¹Jiangxi Engineering Laboratory for the Development and Utilization of Agricultural Microbial Resources, College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi Province, China

²Key Laboratory of Functional Small organic molecule, Ministry of Education, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi Province, China

Abstract: L-ornithine is a non-protein amino acid involved in urea metabolism and polyamines biosynthesis. Due to the positive functions in treating liver diseases and enhancing immunity, L-ornithine is widely used in medicine and food industry. Currently, L-ornithine production mainly depends on chemosynthesis, enzymatic catalysis and microbial fermentation. Among them, microbial fermentation has gradually become the focus for L-ornithine production owing to its superiority in cost and environmental protection. In this article, recent progress in the development of high L-ornithine producing strains through genetic engineering is summarized, the metabolic engineering strategies for improving L-ornithine production in *Corynebacterium glutamicum* are discussed, and the future direction is predicted.

Keywords: L-ornithine, metabolic engineering, *Corynebacterium glutamicum*, molecular breeding

(本文责编: 李磊)

Supported by the Doctoral Research Foundation of Jiangxi Agricultural University and by the National Natural Science Foundation of China (31660019)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-791-83813459; E-mail: zhangbin2919@163.com

Received: 2 June 2019; Revised: 3 August 2019; Published online: 6 December 2019