

• 工业生物技术 •

# 代谢工程改造大肠杆菌一碳模块高效合成 L-甲硫氨酸

张博<sup>1,2</sup>, 王莹<sup>1,2</sup>, 牛坤<sup>1,2</sup>, 柳志强<sup>1,2\*</sup>, 郑裕国<sup>1,2</sup>

1 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学生物工程学院 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

张博, 王莹, 牛坤, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造大肠杆菌一碳模块高效合成 L-甲硫氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3302-3317.

ZHANG Bo, WANG Ying, NIU Kun, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Efficient synthesis of L-methionine by engineering the one carbon module of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3302-3317.

**摘要:** L-甲硫氨酸又名 L-蛋氨酸, 是人体必需 8 种氨基酸之一, 在饲料、医药、食品领域具有重要应用。以实验室前期构建的 M2 (*Escherichia coli* W3110 ΔIJAHFEB/C/PAM) 为出发菌株, 以模块化代谢工程策略构建了一株 L-甲硫氨酸高产菌株。首先通过过表达亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylentetrahydrofolate reductase, MetF) 和筛选不同来源的丝氨酸羟甲基转移酶 (hydroxymethyltransferase, GlyA), 增强了一碳模块甲基供体的生成, 优化了一碳模块。随后针对一碳模块的前体供应, 过表达了胱醚裂解酶 (cysteamine lyase, MalY) 和半胱氨酸内运基因 (*fliY*), 有效地提高了 L-高半胱氨酸和 L-半胱氨酸的供应。最终摇瓶发酵 L-甲硫氨酸的产量由 2.8 g/L 提高至 4.05 g/L, 5 L 发酵罐中达到 18.26 g/L。研究表明, 一碳模块对 L-甲硫氨酸的生物合成具有十分重要的影响, 在细胞内通过优化一碳模块, 可以实现 L-甲硫氨酸的高效生物合成。本研究为进一步提高微生物发酵生产 L-甲硫氨酸的水平奠定了基础。

**关键词:** 生物合成; 基因协同表达; L-甲硫氨酸; 代谢工程; 发酵工程

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400); 国家自然科学基金(32070099, 31971342)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400) and the National Natural Science Foundation of China (32070099, 31971342).

\*Corresponding author. E-mail: microliu@zjut.edu.cn

Received: 2023-02-24; Accepted: 2023-05-23

# Efficient synthesis of L-methionine by engineering the one carbon module of *Escherichia coli*

ZHANG Bo<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>1,2</sup>, NIU Kun<sup>1,2</sup>, LIU Zhiqiang<sup>1,2\*</sup>, ZHENG Yuguo<sup>1,2</sup>

1 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** L-methionine, also known as L-aminomethane, is one of the eight essential amino acids required by the human body and has important applications in the fields of feed, medicine, and food. In this study, an L-methionine high-yielding strain was constructed using a modular metabolic engineering strategy based on the M2 strain (*Escherichia coli* W3110  $\Delta$ IJAHFEB/C/PAM) previously constructed in our laboratory. Firstly, the production of one-carbon module methyl donors was enhanced by overexpression of methylenetetrahydrofolate reductase (methylenetetrahydrofolate reductase, MetF) and screening of hydroxymethyltransferase (GlyA) from different sources, optimizing the one-carbon module. Subsequently, cysteamine lyase (hydroxymethyltransferase, MalY) and cysteine internal transporter gene (*fliY*) were overexpressed to improve the supply of L-homocysteine and L-cysteine, two precursors of the one-carbon module. The production of L-methionine in shake flask fermentation was increased from 2.8 g/L to 4.05 g/L, and up to 18.26 g/L in a 5 L fermenter. The results indicate that the one carbon module has a significant impact on the biosynthesis of L-methionine, and efficient biosynthesis of L-methionine can be achieved through optimizing the one carbon module. This study may facilitate further improvement of microbial fermentation production of L-methionine.

**Keywords:** biosynthesis pathway; coordinated gene expression; L-methionine; metabolic engineering; fermentation engineering

L-甲硫氨酸(L-methionine), 又名 L-蛋氨酸, 全称 2-氨基-4-甲硫基丁酸, 化学索引号(CAS)为 63-68-3, 分子式为  $C_5H_{11}O_2NS$ <sup>[1]</sup>, 最早于 1922 年由 Mueller 从酪蛋白中分离出来, 于 1928 年由 Barger 和 Coyne 确定其结构式并正式命名为 L-甲硫氨酸<sup>[2]</sup>。L-甲硫氨酸是一种必需的含硫氨基酸, 在人体的免疫、抗氧化和脂质代谢等方面发挥重要的作用<sup>[3-4]</sup>。与苏氨酸、赖氨酸等同属于天冬氨酸家族<sup>[1]</sup>。L-甲硫氨酸在坚果、肉类及部分植物中大量存在, 而在动物和人体内却不能自行合成。目前, L-甲硫氨酸

的生产方法主要有以下 3 种: 化学合成法<sup>[5-8]</sup>、酶催化法<sup>[9]</sup>和发酵法<sup>[10-22]</sup>。3 种生产方法各有优劣, 但由于目前酶催化法和发酵法的工艺尚不完善, 缺乏工业化生产的价值, 市场上 L-甲硫氨酸的生产方法主要以化学法为主。

发酵法相比于化学法和酶催化法, 其反应条件温和, 对环境影响较小。自 20 世纪起不断有学者在探索利用发酵法来生产 L-甲硫氨酸, 但由于 L-甲硫氨酸的合成途径复杂, 调控节点多, 以及 L-甲硫氨酸的生产会对菌体本身产生毒副作用等因素, 目前还没有一株适合于

大规模生产的 L-甲硫氨酸高产菌株。现已公开的生产 L-甲硫氨酸的底盘菌主要有大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等。具体研究结果如表 1 所示, Tang 等<sup>[20]</sup>引入参与同型半胱氨酸生成的关键酶, 并加强了甘氨酸裂解系统有效供应一碳单位, L-甲硫氨酸产量达到 3.96 g/L。Niu 等<sup>[21]</sup>对赖氨酸竞争途径进行调节, 并增强三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 的 *gltA* 基因, 在不外源添加氨基酸等情况下, 5 L 发酵罐中 L-甲硫氨酸产量达到 17.74 g/L。

大肠杆菌拥有明确的基因背景、清晰的代谢网络、较短的生长周期等特点, 已被用于多种医药化学品的发酵生产<sup>[10-22]</sup>。Huang 等<sup>[19]</sup>通过对 L-甲硫氨酸的代谢途径的分析, 将 L-甲硫氨酸的代谢过程分解成 3 个模块: 碳模块、硫模块和一碳模块, 如图 1 所示, 首先是碳模块, 碳模块的主要功能是提供构成 L-甲硫氨酸的碳骨架。体外葡萄糖进入细胞后通过糖酵解途径分解成 3-磷酸甘油酸, 然后氧化生成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环。三羧酸循环中生成的天冬氨酸 (aspartate, Asp) 会在天冬氨酸激酶 I、II 和 III (ThrA、LysC 和 MetL) 的作用下生成高丝氨酸 (homoserine, HS), HS 进一步在 O-琥珀酰转移

酶 (*metA*) 的作用下生成 O-琥珀酰高丝氨酸。碳模块的 3-磷酸甘油酸在磷酸甘油酸脱氢酶、磷酸丝氨酸磷酸酶和磷酸羟基苏氨酸氨基转移酶 (*serA*、*serB* 和 *serC*) 的作用下生成丝氨酸 (之后还将作为一碳模块的前体物质)。丝氨酸转化为 O-乙酰丝氨酸, O-乙酰丝氨酸与培养基的硫源相互作用转化为 L-半胱氨酸。硫源的吸收与转化是十分复杂的过程, 有硫酸盐途径和硫代硫酸盐途径, 2 个代谢途径能量消耗差异较大, 硫酸盐途径需要消耗 3 个腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 和 4 个还原型辅酶 II (tetracyclohexanamine, NADPH), 而硫代硫酸盐途径只需要消耗 1 个 ATP 和 1 个 NADPH<sup>[23-27]</sup>。因此, 硫代硫酸盐途径在细胞生物能学方面更具吸引力。硫模块的 L-半胱氨酸与碳模块的 O-琥珀酰高丝氨酸作用产生 L-高半胱氨酸。最后是一碳模块, 硫模块中生成的丝氨酸作为一碳循环的前体<sup>[19]</sup>, 既可以在 *glyA* 的作用下生成甘氨酸 [通过甘氨酸裂解途径 (glycine cleavage system, GCV) 生成 CH<sub>2</sub>-THF], 也可以在半胱氨酸合酶 A (cysteine synthase A, CysK) 的作用下生成 L-半胱氨酸。CH<sub>2</sub>-THF 在 MetF 的帮助下转化为甲基四氢叶酸 (CH<sub>3</sub>-THF), 为 L-甲硫氨酸生成的最后一步提供甲基, L-高半胱氨酸在

表 1 代谢工程改造产 L-甲硫氨酸微生物

Table 1 Metabolic engineering of microorganisms for L-methionine production

Strains	Genotype	L-methionine titer (g/L)	Year
Usuda <sup>[13]</sup>	<i>E. coli</i> W3110 $\Delta metJ$ , $\Delta thrBC$ , <i>metKM</i> , <i>HTS<sup>Fbr</sup></i>	0.24	2005
Guo <sup>[16]</sup>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>metJ</i> , <i>metA<sup>+</sup></i> , <i>cysE<sup>+</sup></i> , <i>yeaS<sup>+</sup></i>	0.395	2014
Qin <sup>[17]</sup>	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 <i>thrB</i> , <i>mcbR</i> , <i>hom<sup>Fbr+</sup></i> , <i>lysC<sup>Fbr+</sup></i> <i>brnFE<sup>+</sup></i>	6.30	2015
Li <sup>[18]</sup>	<i>E. coli</i> W3110 $\Delta metJ$ , $\Delta thrBC$ , $\Delta lysA$ , <i>metK<sup>M</sup></i> , <i>metA<sup>Fbr+</sup></i> , <i>metB<sup>+</sup></i> <i>maly<sup>+</sup></i> , <i>metH<sup>+</sup></i>	5.62	2017
Huang <sup>[19]</sup>	<i>E. coli</i> W3110 derivative, $\Delta metJ$ , $\Delta metI$ , $\Delta lysA$ , <i>Trc-metH</i> , <i>Trc-metF</i> , <i>Trc-cysE</i> , <i>Trc-serB</i> , <i>Trc-serC</i>	2.80	2018
Tang <sup>[20]</sup>	<i>E. coli</i> W3110 $\Delta metJ$ , $\Delta metI$ , $\Delta lysA$ , <i>Trc-metH</i> , <i>Trc-metF</i> , <i>Trc-cysE</i> , <i>Trc-serB</i> , <i>Trc-serC</i> , <i>Trc-gcvTHP</i> , <i>metA<sup>Fbr+</sup></i> , <i>yjeH<sup>+</sup></i> , <i>serA<sup>Fbr+</sup></i> , <i>metZ<sup>+</sup></i>	3.96	2020
Niu <sup>[21]</sup>	<i>E. coli</i> W3110 derivative, $\Delta metJ$ , $\Delta metI$ , <i>Trc-metH</i> , <i>Trc-metF</i> , <i>Trc-cysE</i> , <i>Trc-serB</i> , <i>Trc-serC</i> , <i>PlysA::PfliA</i>	17.74	2023

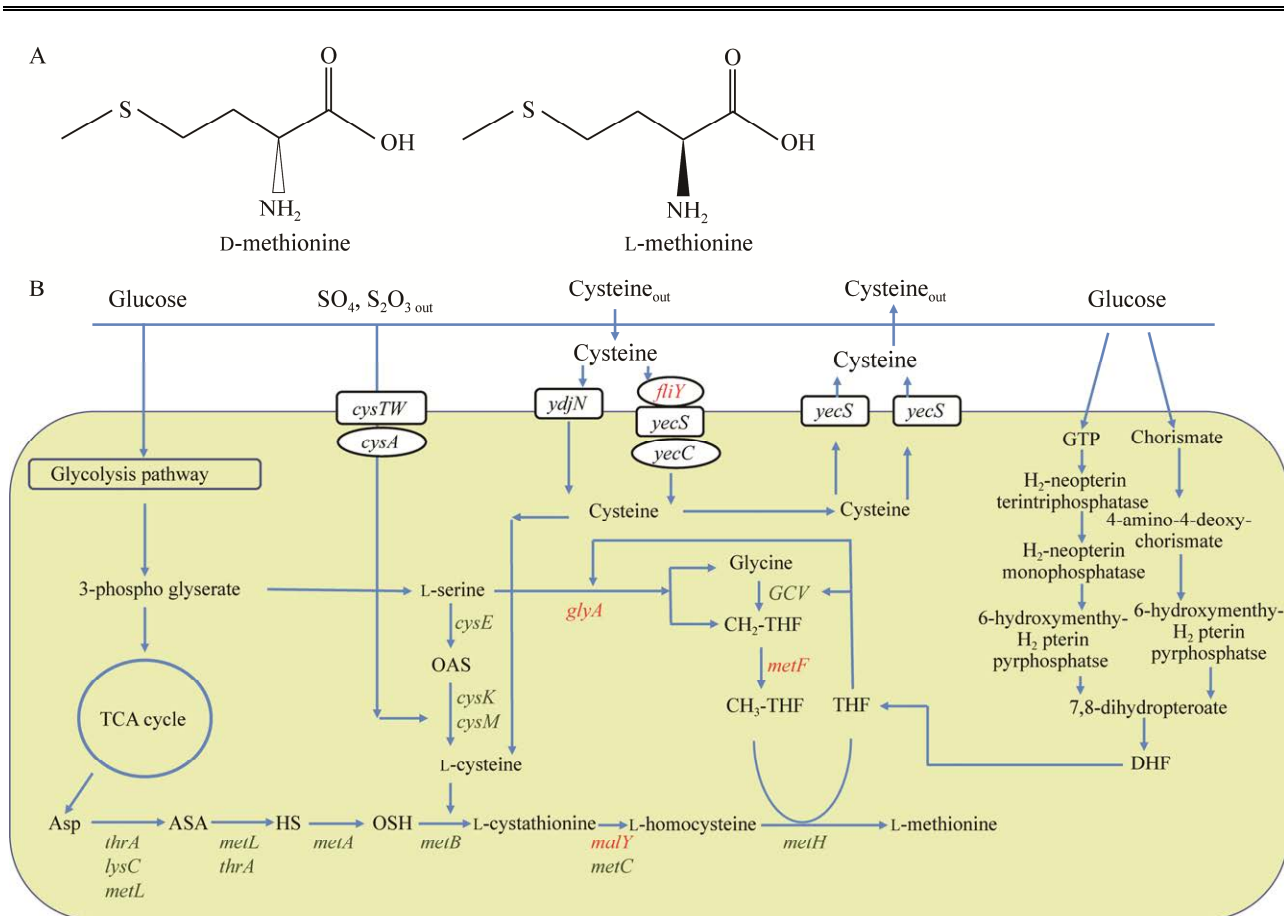


图1 甲硫氨酸结构式(A)以及 L-甲硫氨酸高产菌株 M4 构建策略(B)

Figure 1 Structure formula of methionine (A) and the strategy for constructing methionine high-yield strain M4 (B). The red genes represent that the genes are overexpressed. The genes involved are as follow: *thrA* encoding aspartate kinase I; *lysC* encoding aspartate kinase II; *metL* encoding aspartate kinase III; *metA* encoding homoserine O-succinyltransferase; *metB* encoding O-succinyl homoserine (thiol)-lyase; *metC* encoding L-cysteine desulfhydrase; *metH* encoding L-methionine synthase; *serABC* encoding phosphoserine phosphatase; *cysKM* encoding cysteine synthase A/B; *glyA* encoding serine hydroxymethyl transferase; *metF* encoding 5,10-methylenetetrahydrofolate; *fliY* encoding cysteine aminotransferase.

L-甲硫氨酸合酶(L-methionine synthase, *metH*)的帮助下转化为 L-甲硫氨酸。提供甲基后的 CH<sub>3</sub>-THF 又再次参与进 CH<sub>2</sub>-THF 的生成。L-甲硫氨酸的生物途径中甲基的供体是 CH<sub>3</sub>-THF, 一碳途径通量大小对 L-甲硫氨酸的合成具有重要影响。

本研究以实验室前期构建的 M2 (*E. coli* W3110 ΔIJAHFBC/PAM) 为出发菌株, 使用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术针对 L-甲硫氨酸生

物合成途径的一碳模块关键限速节点进行筛选优化。首先, 在质粒 PAM 上耦联过表达基因 *metF* 和基因 *glyA24* [反硝化假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas denitrificans*) ATCC 13867], 增加了一碳模块的甲基供体 CH<sub>3</sub>-THF。之后向上游探索, 将 *malY* 的天然启动子替换为 Trc 启动子, 增强了一碳模块前体 L-高半胱氨酸生成的同时解除了 L-甲硫氨酸产物抑制。最后过表达了 L-半胱氨酸转运系统的关键基因 *fliY*, 为

L-甲硫氨酸合成提供了更多可利用的硫源，与一碳模块的加强结合后有效地提高了 L-甲硫氨酸产量。最终摇瓶发酵 L-甲硫氨酸产量提升至 4.05 g/L，5 L 发酵罐中产量达到 18.26 g/L。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

本研究以 *E. coli* W3110  $\Delta$ IJAHFEB/C/PAM

作为出发菌株，*E. coli* DH5 $\alpha$  用于质粒的克隆，所有的菌株和质粒见表 2。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.000, 酵母粉 5.000, 氯化钠 10.000。

MS 摇瓶葡萄糖发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.000, 硫酸铵 16.000, 磷酸二氢钾 1.000, 五水硫代硫酸钠 2.000, 七水硫酸镁 0.500, 八水硫酸锰 0.005, 碳酸钙 10.000, 酵母粉 2.000。

表 2 本研究中使用的具有特定基因型的菌种和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study with specific genotypes

Strains or plasmids	Genotype	Source
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F-, <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> , $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ), $\lambda^-$	TSINGKE
<i>E. coli</i> W3110	F-, L-, IN ( <i>rrnD-rrnE</i> ) 1, <i>rph-1</i>	CGSC <sup>a</sup>
M2	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i>	Lab storage
M2G	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-GCV</i>	This study
M2 $\Delta$ <i>glyA</i>	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> $\Delta$ <i>glyA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i>	This study
M2 <i>Trc-glyA</i>	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-glyA</i>	This study
M2 <i>rglyA</i>	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> ATG $\rightarrow$ TTG <i>glyA</i>	This study
M2Y	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-malY</i>	This study
M2 <i>ydjN</i>	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-ydjN</i>	This study
M2 <i>fliY</i> (M3)	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-fliY</i>	This study
M2 <i>yecS</i>	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-yecS</i>	This study
M2 <i>yecC</i>	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-yecC</i>	This study
M4	W3110 $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>metI</i> $\Delta$ <i>lysA</i> <i>Trc-GCV</i> <i>Trc-metH</i> <i>Trc-metF</i> <i>Trc-cysE</i> <i>Trc-serB</i> <i>Trc-serC</i> <i>Trc-fliY</i> <i>Trc-malY</i>	This study
PAM	plasmid derived from pTrc99A carrying <i>metA</i> <sup>fbr</sup> <i>yjeH</i> and <i>serA</i> <sup>fbr</sup> ; Kan <sup>R</sup>	Lab storage
PAMF	PAM containing <i>metF</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
PAMH	PAM containing <i>metH</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
PAMG	PAM containing <i>glyA</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 21	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> ); Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 22	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>Arthrobacter</i> sp. FB24); Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 23	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>Streptococcus thermophilus</i> . JIM 8232); Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 24	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867); Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 22 <i>metF</i>	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>A</i> sp. FB24) and <i>metF</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 23 <i>metF</i>	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>S thermophilus</i> . JIM 8232) and <i>metF</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
PAM- <i>glyA</i> 24 <i>metF</i>	PAM containing <i>glyA</i> ( <i>P denitrificans</i> ATCC 13867) and <i>metF</i> ; Kan <sup>R</sup>	This study
pCas	repA101 (Ts) <i>kan</i> pCas-Cas9 ParaB-Red <i>lacI</i> <sup>f</sup> P <trc>-sgRNA-pMB1</trc>	Lab storage
pTarget	pMB1 <i>aadA</i> sgRNA	Lab storage
pTrc99a	Trc-promo, <i>kan</i> , <i>lacI</i> , ori	Lab storage

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, 二水氯化钙 0.08, 七水硫酸镁 1.00, 柠檬酸 1.17, 三水磷酸氢二钾 1.38, 六水氯化铁 0.12, 硫酸铵 3.30, 硫代硫酸钠 3.95, 七水硫酸锌 8.50, 二水氯化锰 7.50, 二水氯化铜 0.75, 六水氯化钴 0.75, 硼酸 3.00, 铝酸钠 2.50, 维生素 B12 10.00, 维生素 B1 5.00, 赖氨酸 200.00。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 摇瓶发酵

从活化平板中将单菌落接种于 10 mL LB 试管, 并在 37 °C、180 r/min 条件下培养 12 h, 获得一级种子液。取 1 mL 种子液, 转接到 20 mL MS 发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 48 h。发酵 48 h 后收集 1 mL 细胞培养液, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清测定 L-甲硫氨酸浓度, 细胞颗粒用超纯水冲洗一次后, 测定细菌  $OD_{600}$ 。

### 1.2.2 发酵罐发酵

取 1 mL 一级种子液, 转接到 100 mL MS 发酵培养基中, 在 30 °C、180 r/min 条件下培养 12 h 获得二级种子液。将 100 mL 二级种子液接种于 5 L 发酵罐中(装液量 1.5 L)。用 50% (体积分数)  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  自动控制 pH 至 7.0, 培养温度 30 °C、通气量为 5 L/min。

### 1.2.3 重组质粒的构建

本研究中使用的质粒详见表 2。用于构建粒的引物详见表 3。构建质 pTrc99a, 用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增需要过表达的目的基因和载体, 然后用 CloneExpress 一步克隆试剂盒将基因克隆到载体 pTrc99a 上。

### 1.2.4 基因敲除与启动子替换

编码 Cas9 蛋白的质粒 pCas9 和含有 sgRNA 的 pTarget 质粒<sup>[28-29]</sup>由上海植物生理生态研究所捐赠。所使用引物详见表 3。

表 3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pTarget-glyA-F	TAATACTAGTGAATTTGTTGATCACCGTACGTTTGTAGAGCTAGAAATAGC
pTarget-glyA-R	GCTCTAAAACGTACGGTGATCAACAAATTCAGTAGTATTATACCTAGGAC
<i>glyA</i>	Donor-glyA-F1 CGGTGCTTTTTTTGAATTCTCTAGAGCTTTGTCCCTGTGGTAGTG
	Donor-glyA-R2 TTGCTGGCGATGCTGGAAAAACCTTGTTGA
	Donor-glyA-F3 TTTTCCAGCATCGCCAGCAAAAATAACTGG
	Donor-glyA-R4 GGGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGACGGCAGATTTACAGTCTGC
pTarget-ΔglyA-F	TAATACTAGTCAAATATGCTGAAGGTTATCGTTTGTAGAGCTAGAAATAGC
ΔglyA	pTarget-ΔglyA-R GCTCTAAAACGATAACCTTCAGCATATTTGACTAGTATTATACCTAGGAC
	Donor-ΔglyA-F1 CGGTGCTTTTTTTGAATTCTCTAGAAACAGGGCTTCACGTTGATC
	Donor-ΔglyA-R2 ACCGTTTCGCCCCGCATCTCCTGACTCAGCT
	Donor-ΔglyA-F3 GGAGATGCGGGCGAAACGGTGATTTGCTGT
	Donor-ΔglyA-R4 CTGCAGAAGCTTAGATCTATTACCCTGGCAAAGTGGAGAACCGTG
pTarget-fliY-F	TAATACTAGTCAAACAGACATAACAACATTGTTTTGTAGAGCTAGAAATAGC
	pTarget-fliY-R GCTCTAAAACAATGTTGTTATGTCTGTTGACTAGTATTATACCTAGGAC
	Donor-fliY-F1 CGGTGCTTTTTTTGAATTCTCTAGATCGAGATTTCCCGCCTGGAC
<i>fliY</i>	Donor-fliY-R2 CCGCTCACAATTCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAATTCACCCCGAAT GTTGTTA

(待续)

(续表 3)

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Donor- <i>fliY</i> -F3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGAAATTAGCA CATCTGGG
Donor- <i>fliY</i> -R4	GGGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGGCACATCGACGCCCTGAACA
GCV pTarget-GCV-F	TAATACTAGTGCAAAAGAGAACGATTGCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pTarget-GCV-R	GCTCTAAAACACGCAATCGTTCTCTTTTGCCTAGTATTATACCTAGGAC
Donor-GCV-F1	GGATTCCGCGATCTGTTTTC
Donor-GCV-R2	GTGACCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAACCGAAACAGACTGTAAACC
Donor-GCV-F3	ATCCGGCTCGTATAATGTGTGGTCACAAAGGAGATATACATGGCACAACAGACTCCTTT
Donor-GCV-R4	GAACGGTTTCATCCCTTCCA
<i>malY</i> pTarget- <i>malY</i> -F	TAATACTAGTATGCATACTGTCCAGGCATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pTarget- <i>malY</i> -R	GCTCTAAAACATATGCCTGGACAGTATGCATACTAGTATTATACCTAGGAC
Donor- <i>malY</i> -F1	CGGTGCTTTTTTTGAATTCTCTAGACTGTGCTCGGCGTCACCATC
Donor- <i>malY</i> -R2	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATTATGCCTGGACA GTATGCA
Donor- <i>malY</i> -F3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGTTTCGATTTT TCAAAGGT
Donor- <i>malY</i> -R4	GGGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGGCACACCAAAGGTGCGGCAA
<i>ydjN</i> pTarget- <i>ydjN</i> -F	TAATACTAGTAAATAATAAGATCAGGAGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pTarget- <i>ydjN</i> -R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTCTCCTGATCTTATTATTTACTAGTATTA
Donor- <i>ydjN</i> -F1	CGGTGCTTTTTTTGAATTCTCTAGATTTTGGGCATCGTGGTTTTA
Donor- <i>ydjN</i> -R2	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACCCCGTTCTCCTG ATCTTAT
Donor- <i>ydjN</i> -F3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGAACTTTCCA TTAATTGC
Donor- <i>ydjN</i> -R4	GGGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGCTTGTCTTTATCCCGAAAA
<i>yecC</i> pTarget- <i>yecC</i> -F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGTATTGATGCATACCATCCTG
pTarget- <i>yecC</i> -R	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATT AATTGTCAAAGCAAAGCCCCATTCGTAT
Donor- <i>yecC</i> -F1	AGGGCTTACTGTACATCTC
Donor- <i>yecC</i> -R2	GTGACCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAACCGCTTAACACTTCTGCA
Donor- <i>yecC</i> -F3	ATCCGGCTCGTATAATGTGTGGTCACAAAGGAGATATACATGCGTGGAGAATTTTATCA
Donor- <i>yecC</i> -R4	GCTTCTTTCAGACGTGCTTC
<i>yecS</i> pTarget- <i>yecS</i> -F	TAATACTAGTTATACGCTGCAACTCAGTATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pTarget- <i>yecS</i> -R	GCTCTAAAACATACTGAGTTGCAGCGTATAACTAGTATTATACCTAGGAC
Donor- <i>yecS</i> -F1	CGGTGCTTTTTTTGAATTCTCTAGAGTTATGTGGAGAGTGCGCT
Donor- <i>yecS</i> -R2	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAGAGCGTTTCCGGA GCTAAAC
Donor- <i>yecS</i> -F3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGCAAGAAAG TATACAACT
Donor- <i>yecS</i> -R4	GGGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGGACGGAACAGCTCCGGCACC

### 1.2.5 代谢产物和菌体量检测

利用高效液相色谱来检测发酵液中的 L-甲硫氨酸浓度,取发酵液 1 mL 于 12 000 r/min 离心 5 min 后分离上清和沉淀。将沉淀用水进行冲洗并离心分离后使用 20%的乙酸悬浮去除沉淀中的碳酸钙。最后用 1 mL 水悬浮后用分光光度计于 600 nm 处测定  $OD_{600}$  值作为单位时间的菌体量。取发酵上清液用水稀释至 0.5–2.0 g/L 进行衍生化反应。衍生化反应为 100  $\mu$ L 样品+300  $\mu$ L 衍生化试剂[0.189 4 g 4-氯-3,5-二硝基-三氟甲基苯 (3,5-dinitro-4-chloro-trifluoromethylbenzene, CNBF)溶于 10 mL 乙腈]+500  $\mu$ L 硼酸钠缓冲液 (0.2 mol/L 硼酸+0.05 mol/L 硼砂)在 60  $^{\circ}$ C 避光反应 1 h。使用赛默飞世尔科技有限公司超高压液相色谱仪检测,色谱柱为 C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m), 设置参数为检测波长 260 nm, 进样量 10  $\mu$ L, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 流速 0.8 mL/min。流动相 A: 纯乙腈; 流动相 B: 50 mmol/L 乙酸钠缓冲溶液(820 mL 蒸馏水+170 mL 乙腈+2 mL 三乙胺, 乙酸调节 pH 为 4.9)。反应进程如表 4 所示。

## 2 结果与分析

### 2.1 *malY* 基因和一碳模块关键基因的强化表达

根据前期实验室对 M2 的研究总结,一碳模块通量对 L-甲硫氨酸的合成十分重要<sup>[17]</sup>。一碳模块的关键基因主要为 *glyA*、*metF*、*metH* 和 *GCV*。一碳模块中,丝氨酸在 *GlyA* 的作用下,生成甘氨酸和  $CH_2$ -THF, 其中生成的甘氨酸可以进一步通过 *GCV* 生成  $CH_2$ -THF, 大肠杆菌生长所需的一碳单位主要由 *glyA* (75%) 和 *GCV* (25%) 提供<sup>[30-31]</sup>。之后  $CH_2$ -THF 在 *MetF* 的作用下生成  $CH_3$ -THF, 为 L-甲硫氨酸的合成提供甲基,  $CH_3$ -THF 与 L-高半胱氨酸在钴胺依

表 4 L-甲硫氨酸高效液相色谱梯度洗脱程序

Table 4 HPLC gradient elution procedure for L-methionine

Time (min)	A (%)	B (%)
0	18	82
5	20	80
7	35	65
15	35	65
20	50	50
24	50	50
25	80	20
30	70	30
35	18	82
45	18	82

赖性甲硫氨酸合酶 *MetH* (由 *metH* 编码)的作用下发生甲基化反应生成 L-甲硫氨酸和四氢叶酸 (tetrahydrofolate, THF)。反应后的 THF 将会再次参与到下一次的  $CH_2$ -THF 的生成, 由此形成循环。L-高半胱氨酸由 L-半胱氨酸和 OSH 在琥珀酰高丝氨酸裂解酶 *MetB* (由 *metB* 编码)和胱硫醚裂解酶 *MetC* (由 *metC* 编码)的作用下经 2 步反应生成, 反应过程如图 2A 所示。*metC* 受到 L-甲硫氨酸的负反馈调节, 如何解除 L-甲硫氨酸的反馈抑制是一个重要的研究方向。*MetC* 会表现出 L-半胱氨酸裂解酶活性, *metC* 的过表达可能会导致胞内 L-半胱氨酸(L-甲硫氨酸合成的硫源)减少<sup>[32]</sup>, 从而导致 L-甲硫氨酸产量的下降。单纯的过表达 *metC* 是不可行的, 选择同样拥有将胱硫醚转化为 L-高半胱氨酸能力的 *MetC* 的同工酶 *MalY* 减少 L-甲硫氨酸带来的产物抑制。

将 *malY* 和 *GCV* 的天然启动子替换为 *Trc* 启动子, 得到菌株 M2Y/PAM 和 M2G/PAM; 在质粒上过表达基因 *metF*、*metH* 和 *glyA*, 得到菌株 M2/PAMF、M2/PAMH 以及 M2/PAMG。发酵结果如图 2B、2C 所示。



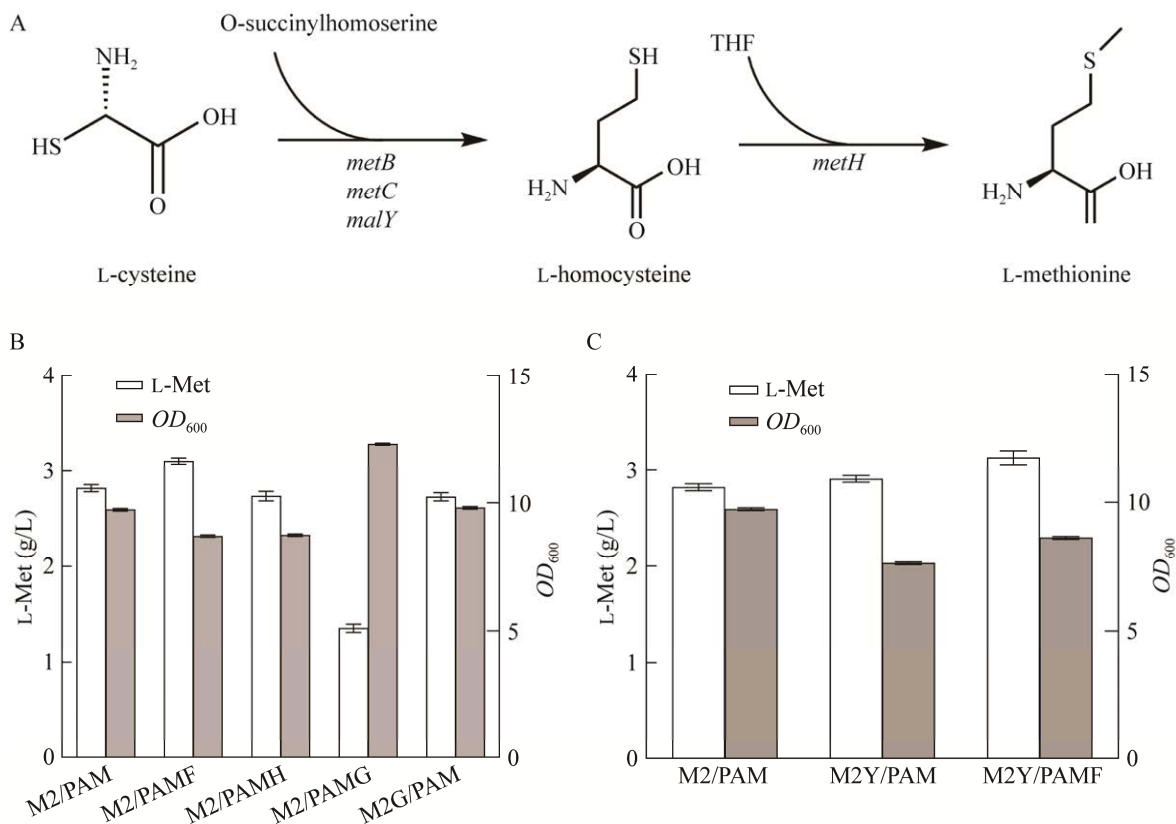


图2 L-甲硫氨酸合成代谢途径(A)以及一碳模块关键基因的增强(B)、*malY* 基因的增强(C)对 L-甲硫氨酸合成的影响

Figure 2 The L-methionine biosynthesis pathway (A) and the effect of enhancement of one-carbon module key genes (B), strengthening *malY* gene (C) on L-methionine synthesis. The white bars: L-methionine yield; The grey bars:  $OD_{600}$ . The data represent the results of three independent experiments.

如图 2C 所示, 单独过表达基因 *malY* 时, L-甲硫氨酸产量为 2.91 g/L, 相较于 M2/PAM 没有显著提高, 菌体量有轻微下降。由图 2B 可知, 过表达一碳模块的关键基因 *metF* 可以提升 L-甲硫氨酸合成, L-甲硫氨酸产量由 2.83 g/L 提高至 3.12 g/L, 菌体量有轻微下降。因此尝试过表达 *malY* 的同时加强一碳模块, 将质粒 PAMF 导入 M2Y/PAM, 得到菌株 M2Y/PAMF。发酵结果如图 2C 所示, 同时强化一碳模块和 *malY* 时, L-甲硫氨酸产量显著上升, 从 2.8 g/L 提升至 3.2 g/L。说明过表达 *malY* 可以加强前体 L-高半胱氨酸的生成, 且不受 L-甲硫氨酸的产物抑制, 与一碳模块的增强结合可以有效地

提高 L-甲硫氨酸产量。

由图 2B 可知, *metH*、GCV 的强化对 L-甲硫氨酸的合成影响不明显, 菌体量变化也不明显。结合过表达 *metF* 后 L-甲硫氨酸产量提升的结果, 从  $CH_3$ -THF 的角度分析, *metH*、GCV 的强化对 L-甲硫氨酸的合成影响不明显可能与甲基供体  $CH_3$ -THF 不足有关。*glyA* 的强化对 L-甲硫氨酸的合成有负面影响, L-甲硫氨酸产量从 2.83 g/L 降至 1.38 g/L。可能的原因是, *glyA* 编码的丝氨酸羟甲基转移酶主要催化丝氨酸与甘氨酸和 THF 之间的相互转化, 反应过程如图 3A<sup>[33-34]</sup>所示。由于其反应的可逆性, 猜想单纯地增强 *glyA* 的表达可能有助于反应趋向

丝氨酸合成的方向。为明确 *glyA* 对 L-甲硫氨酸合成影响, 对 *glyA* 进行进一步研究。

## 2.2 *glyA* 基因的调节

为明确基因 *glyA* 对 L-甲硫氨酸产量的影响, 在基因组上对 *glyA* 进行增强、削弱和敲除, 分别获得菌株 M2 *glyA*/PAM、M2 *rglyA*/PAM 和 M2  $\Delta$ *glyA*/PAM, 摇瓶发酵结果如图 3B 所示。

*glyA* 的增强、削弱和敲除均对 L-甲硫氨酸合成有负面影响, 产量和菌体量都出现明显下降。敲除 *glyA* 后, L-甲硫氨酸产量只有 0.35 g/L,  $OD_{600}$  只有 2.75。可能的原因为 *glyA* 是细胞生产一碳单位的主要调节基因, 细胞本身的一碳单位 75% 由 *glyA* 生产, 故敲除大肠杆菌本身的 *glyA* 会导致菌体与产量急剧降低。增强和削弱 *glyA* 的表达都使菌株的菌体量和 L-甲硫氨酸产

量有所下降, 为了更好地调节 *glyA* 的表达, 使反应向 L-甲硫氨酸合成有利的方向进行, 尝试引入合适的外源 *glyA*。

目前国内外对于 *glyA* 的研究主要集中于加强 L-丝氨酸的合成, 而对 L-甲硫氨酸合成而言要寻找平衡偏向于甘氨酸的外源基因型。筛选 4 个合适的外源 *glyA* 基因, 分别为 *glyA21* (*C. glutamicum*)、*glyA22* [金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) FB 24<sup>[35]</sup>]、*glyA23* [嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) JIM 8232]、*glyA24* (*P. denitrificans*) ATCC 13867<sup>[36]</sup>。在质粒 PAM 上过表达 4 种外源 *glyA* 基因, 导入 M2 中, 得到菌株 M2/PAM-*glyA21*、M2/PAM-*glyA22*、M2/PAM-*glyA23*、M2/PAM-*glyA24*, 摇瓶发酵结果如图 3C 所示。

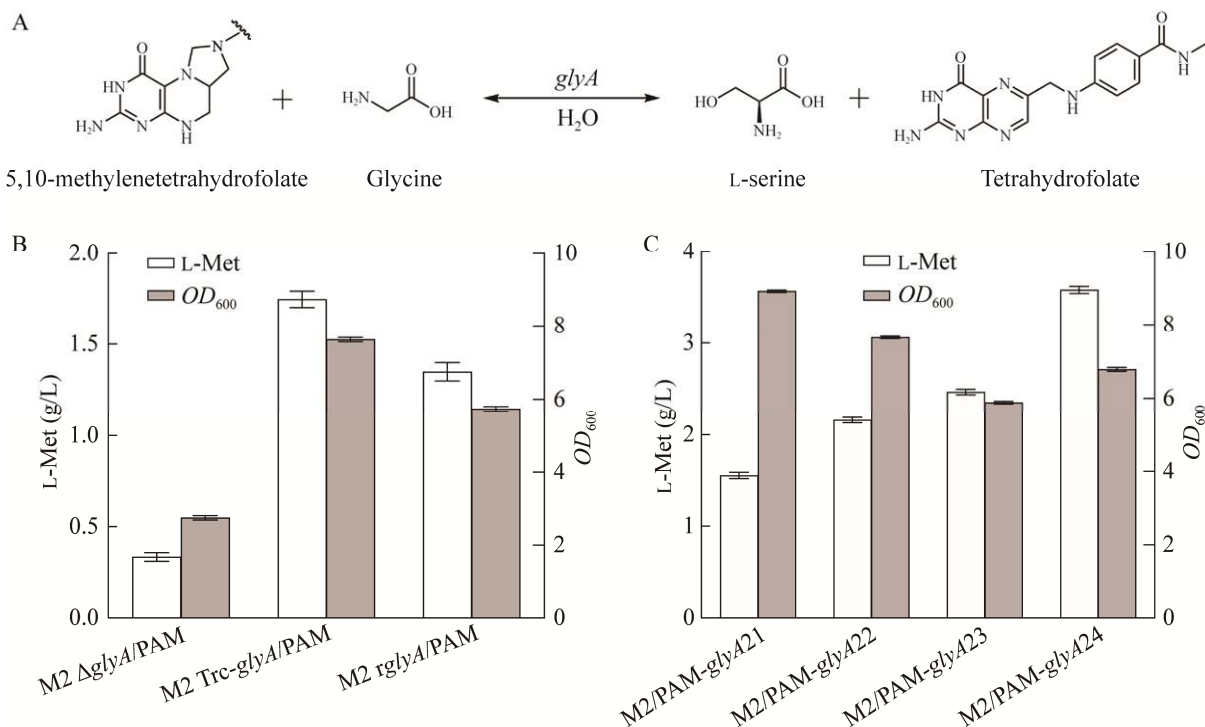


图 3 *glyA* 调控的代谢反应(A)以及 *glyA* 的调节(B)、异源 *glyA* 的表达(C)对 L-甲硫氨酸合成的影响

Figure 3 Metabolic reaction regulated by *glyA* (A) and the effect of *glyA* gene regulation (B) and expression of heterologous *glyA* genes (C) on L-methionine synthesis.  $\Delta$ : Gene knock out; *rglyA*: Down-regulating expression of *glyA*; Trc: Overexpression of *glyA* with P<sub>trc</sub> promoter. The white bars: L-methionine yield, the grey bars:  $OD_{600}$ . The data represent the results of three independent experiments.

结果表明, *glyA* 为一碳模块的关键基因, 通过引入合适的外源 *glyA* 可以有效调节丝氨酸与甘氨酸之间的转化, 使反应向有利于 L-甲硫氨酸合成的方向进行。不同来源的 *glyA* 在大肠杆菌中对 L-甲硫氨酸产量的影响差异明显, 过表达来源于 *P. denitrificans* ATCC 13867 的 *glyA* 可以使 L-甲硫氨酸产量提升至 3.58 g/L。

### 2.3 L-半胱氨酸转运系统的增强

前两小节通过优化一碳模块成功地提高了 L-甲硫氨酸产量, 硫模块作为一碳模块的前体模块, 对 L-甲硫氨酸的合成也具有十分重要的影响。硫模块的重要前体是 L-半胱氨酸, L-半胱氨酸对细胞的毒副作用决定了其不能在细胞体内大量存在, 这是细胞对自身的一种保护作用<sup>[26-27]</sup>。为解决由于 L-半胱氨酸毒副作用导致胞内 L-半胱氨酸浓度不足的问题, 尝试改造 L-半胱氨酸的转运系统。

图 4A 是 L-半胱氨酸转运系统<sup>[27]</sup>。L-半胱氨酸有 2 套不同的内运系统, 分别是同源转运蛋白(*ydjN*)和 ATP 盒蛋白(*fliY-yecSC*)。 *ydjN* 通过同化作用将胱氨酸/半胱氨酸从膜间转运到细胞内, *fliY-yecSC* 需要通过消耗更多的 ATP 和 NADPH 来进行转运, 胱氨酸/半胱氨酸先与 *fliY* 结合, 之后通过膜蛋白 *yecSC* 消耗 3 个 ATP 来转运<sup>[37]</sup>。

在基因组上过表达 4 个转运系统的关键基因(*ydjN*、*fliY*、*yecS*、*yecC*)增强 L-半胱氨酸内运, 得到菌株 M2 *ydjN*/PAM、M2 *fliY*/PAM、M2 *yecS*/PAM 和 M2 *yecC*/PAM。在此基础上加强一碳供给, 导入质粒 PAMF 后得到菌株 M2 *ydjN*/PAMF、M2 *fliY*/PAMF、M2 *yecS*/PAMF 和 M2 *yecC*/PAMF。发酵结果如图 4B 所示。

未加强一碳模块时, 加强 L-半胱氨酸转运系统后菌体量均显著下降, 此时 L-半胱氨酸内

运加强, 胞内 L-半胱氨酸浓度上升后抑制菌株生长, 进而对 L-甲硫氨酸产量造成负面影响。其中 *ydjN* 的强化可以有效地提高 L-甲硫氨酸产量, L-甲硫氨酸产量从 2.8 g/L 提高至 3.07 g/L, 分析原因可能为 *ydjN* 内运能力较弱, 此时内运进胞内的 L-半胱氨酸正好被转化利用, L-半胱氨酸对 L-甲硫氨酸合成的促进作用大于对细胞的毒副作用。

加强了一碳模块后, 菌株的菌体量恢复正常, 此时 *fliY-yecSC* 转运蛋白系统中 *fliY* 的强化使 L-甲硫氨酸产量从 2.8 g/L 提高至 3.45 g/L。由实验结果分析, 胞内 L-半胱氨酸的不足是 L-甲硫氨酸合成的一个重要代谢瓶颈, 一碳模块的加强非常关键, 保持胞内半胱氨酸浓度的平衡可以有效提高 L-甲硫氨酸产量。

已经确定增强 L-半胱氨酸内运系统对 L-甲硫氨酸的合成有正向效果, 进一步探究不同 L-半胱氨酸添加量对 L-甲硫氨酸产量的影响, 实验结果如图 4C。在一碳模块未加强的情况下, 添加 L-半胱氨酸后 L-甲硫氨酸产量有明显的下降趋势; 加强一碳模块后, 添加半胱氨酸后 L-甲硫氨酸产量有小幅上升, 菌株 M2 *fliY*/PAMF 的 L-甲硫氨酸产量从 3.45 g/L 提高到 3.53 g/L。

综合以上结果分析, 硫模块对 L-甲硫氨酸的合成具有重要的影响, L-半胱氨酸转运系统关键基因的过表达可以加强半胱氨酸的内运, 提高胞内的半胱氨酸量浓度, 在没有加强一碳模块时, L-半胱氨酸对细胞的毒副作用使菌株生长受到抑制, L-甲硫氨酸的产量下降。强化一碳模块后, L-半胱氨酸内运进胞内后可以被及时利用, 促进 L-甲硫氨酸产量提高。菌株 M2 *fliY*/PAMF 产量提升最显著, 在添加 2 g/L L-半胱氨酸的条件下 L-甲硫氨酸产量为 3.53 g/L。

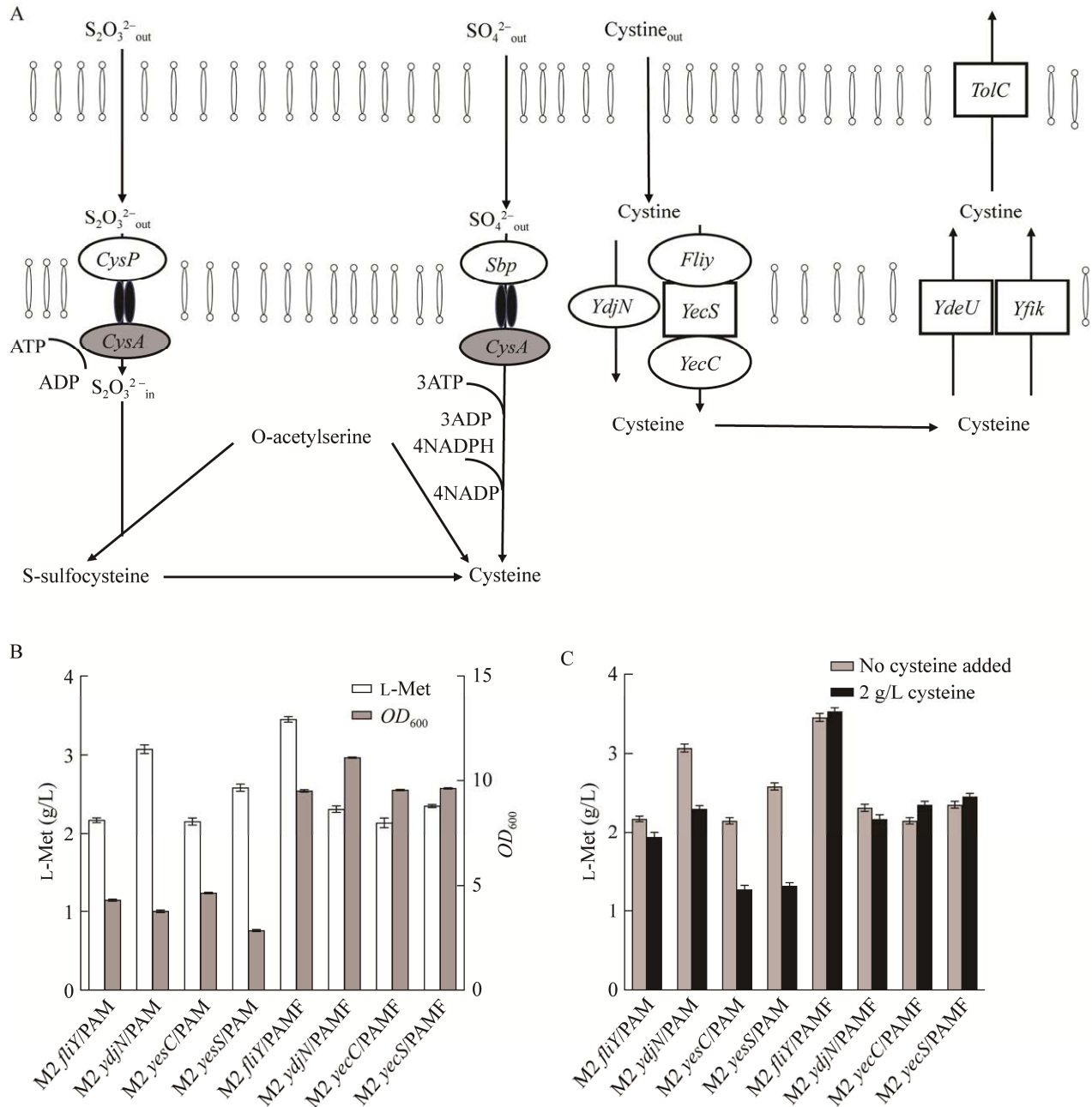


图 4 L-半胱氨酸转运系统<sup>[27]</sup> (A)以及半胱氨酸转运系统的强化(B)、加强半胱氨酸转运系统后添加半胱氨酸(C)对 L-甲硫氨酸合成的影响

Figure 4 Effect of L-cysteine transport system<sup>[27]</sup> (A) and strengthening of cysteine transport system (B) on L-methionine synthesis. The white bars: L-methionine yield; The grey bars:  $OD_{600}$ . C: The effect of adding cysteine on the synthesis of L-methionine after strengthening the cysteine transport system. The grey bars: No cysteine added; The black bars: Cysteine added. The data represent the results of three independent experiments.

## 2.4 高产菌株 M4 的构建

通过以上研究,一碳模块为 L-甲硫氨酸合成的代谢瓶颈,确定一碳模块的关键基因为 *glyA* 和 *metF*,在质粒 PAM 上过表达 *metF* 和 4 种异源 *glyA*,获得菌株 M2/PAM *glyA22 metF*、M2/PAM *glyA23 metF* 和 M2/PAM *glyA24 metF*。结果如图 5 所示,M2/PAM *glyA24 metF* 的 L-甲硫氨酸产量提升至 3.83 g/L。

随后过表达 *malY*,增强了一碳模块前底物 L-高半胱氨酸的生成的同时解除了 L-甲硫氨酸的底物抑制。最后过表达 L-半胱氨酸转运系统的关键基因 *fliY*,解决了由于 L-半胱氨酸毒副作用造成的胞内 L-半胱氨酸浓度不足问题,构建菌株 M4 (*E. coli* W3110  $\Delta$ IJAHFEBCTrc-*fliY* Trc-*malY*/PAM *glyA24 metF*)。摇瓶发酵结果如图 6A 所示,L-甲硫氨酸产量由 2.8 g/L 提升至 4.05 g/L,5 L 发酵罐中达到 18.26 g/L (图 6B)。

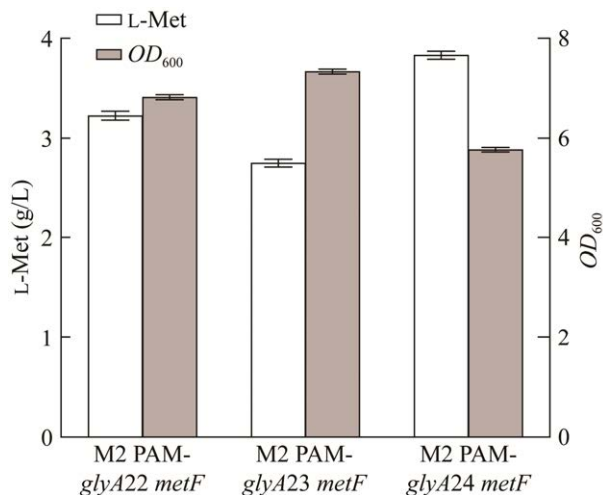


图 5 异源 *glyA* 基因和 *metF* 基因耦联对 L-甲硫氨酸合成的影响

Figure 5 Effect of heterogenous *glyA* gene and *metF* gene on L-methionine synthesis. The white bars: L-methionine yield; The grey bars:  $OD_{600}$ .

## 3 讨论与结论

本研究在菌株 M2 (*E. coli* W3110 $\Delta$ IJAHFEBCTrc-PAM)的基础上,通过代谢模块途径工程逐步探索大肠杆菌高效合成 L-甲硫氨酸的限制性因素,为进一步构建 L-甲硫氨酸高产菌株奠定基础。本研究首先对 L-甲硫氨酸一碳模块的关键基因(*glyA*、*GCV*、*metF* 和 *metH*)进行研究,通过在质粒上过表达基因 *metF* 可以观察到 L-甲硫氨酸的产量提高至 3.12 g/L。推断 L-甲硫氨酸的一碳模块的关键限速节点为甲基供体  $CH_3$ -THF。同时 *glyA* 调控的代谢反应是一个可逆反应,对大肠杆菌 *glyA* 的调节无法有效提高 L-甲硫氨酸产量。通过筛选引入外源 *glyA* 基因,成功加强了  $CH_3$ -THF 前体甘氨酸的生成,进而加强了 L-甲硫氨酸的合成。通过在质粒 PAM 上耦联过表达基因 *metF* 和 *glyA24* 将 L-甲硫氨酸的产量提高至 3.83 g/L。

L-甲硫氨酸生物合成中的硫源主要来自 L-半胱氨酸,硫模块的通量对 L-甲硫氨酸合成具有重要影响,因此 L-半胱氨酸对细胞的毒副作用是 L-甲硫氨酸合成的限制因素之一。根据已有文献,大肠杆菌体内有一套独特的 L-半胱氨酸转运系统,单独加强 L-半胱氨酸的内运对 L-甲硫氨酸的合成没有正向效果,但当同时加强一碳模块和半胱氨酸内运时可使胞内 L-半胱氨酸达到平衡,提高 L-甲硫氨酸产量。进一步证明 L-甲硫氨酸的合成主要的代谢阻力存在于一碳模块。同时过表达不受 L-甲硫氨酸反馈抑制的 *malY*,增强了一碳模块的前体 L-高半胱氨酸的合成,最后得到菌株: M4 (*E. coli* W3110  $\Delta$ IJAHFEBCTrc-*fliY* Trc-*malY*/PAM *glyA24 metF*),发酵结果为 4.05 g/L。

本研究发现一碳模块通量对 L-甲硫氨酸产量非常重要,且一碳模块的关键限速节点为甲

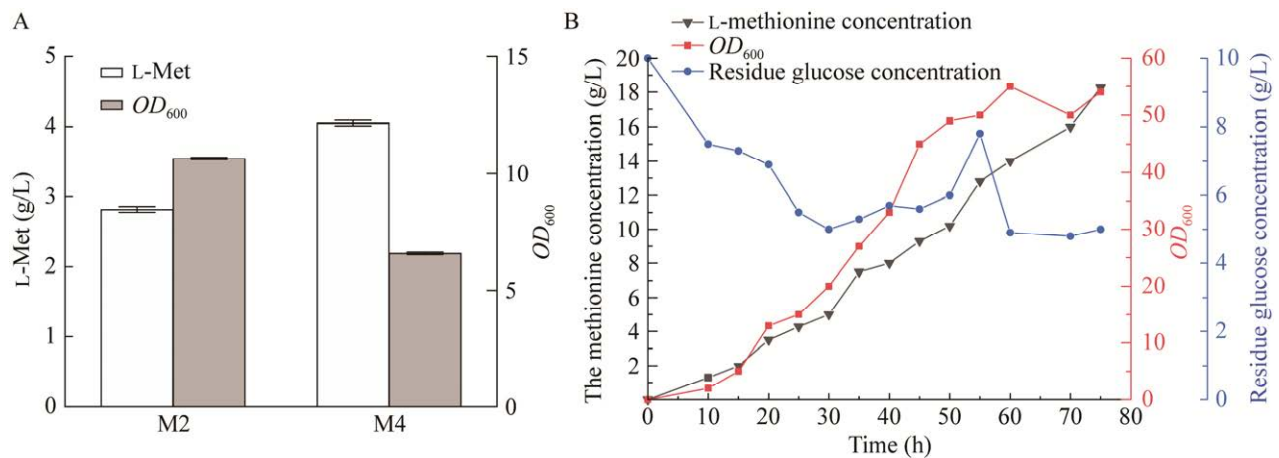


图 6 M4 的发酵情况

Figure 6 Fermentation of M4. Comparison of the L-methionine synthesis by strains M2 and M4. The white bars: L-methionine yield; The grey bars:  $OD_{600}$ . The data represent the results of three independent experiments (A). The continuous fed fermentation of L-methionine by strain M4 (B).

基供体  $CH_3$ -THF。此外，胞内 L-半胱氨酸浓度的不足也是 L-甲硫氨酸合成的代谢瓶颈之一。本研究采用的策略对于合理设计用于类似氨基酸生物合成的细胞工厂具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] KRÖGER H, DIETRICH A, OHDE M, LANGE R, EHRlich W, KURPise M. Protection from acetaminophen-induced liver damage by the synergistic action of low doses of the poly (ADP-ribose) polymerase-inhibitor nicotinamide and the antioxidant N-acetylcysteine or the amino acid L-methionine[J]. *General Pharmacology: the Vascular System*, 1997, 28(2): 257-263.
- [2] MUELLER JH. A new sulphur-containing amino acid isolated from casein[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1922, 19(4): 161-163.
- [3] TOWNSEND DM, TEW KD, TAPIERO H. Sulfur containing amino acids and human disease[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2004, 58(1): 47-55.
- [4] GEORGE J, PERA N, PHUNG N, LECLERCQ I, YUN HJ, FARRELL G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis[J]. *Journal of Hepatology*, 2003, 39(5): 756-764.
- [5] GEIGER F, HALSBERGHE B, HASSELBACH HJ, HENTSCHEL K, HUTHMACHER K, KORFER M, MANNSFELD SP, TANNER H, THEISSEN F, VANROBAEYS J, WILLIGERODT K. Process for the preparation of D, L-methionine or the salt thereof: US5770769[P]. 1998-06-23.
- [6] HASSEBERG HA, HUTHMACHER K, RAUTENBERG S, PETSCH H, WEIGEL H. Method for the continuous preparation of methionine or methionine derivatives: US5672745[P]. 1997-09-30.
- [7] HSU YC, BLACKBURN TF, PELLEGRIN PF, KRANZ AH, WILLOCK JM. Continuous hydrolysis process for preparing 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or salts thereof: US6268531[P]. 2001-07-31.
- [8] RUEST DA, TAKANO M, WOLF LR. Liquid 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid and process for the preparation thereof: US4524077[P]. 1985-06-18.
- [9] JIN LQ, LI ZT, LIU ZQ, ZHENG YG, SHEN YC. Efficient production of methionine from 2-amino-4-methylthiobutanenitrile by recombinant *Escherichia coli* harboring nitrilase[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(10): 1479-1486.
- [10] 张博, 姚臻豪, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-高丝氨酸[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1287-1297.

ZHANG B, YAO ZH, LIU ZQ, ZHENG YG. Production of L-homoserine from *Escherichia coli* by

- metabolic engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(4): 1287-1297 (in Chinese).
- [11] FERLA MP, PATRICK WM. Bacterial methionine biosynthesis[J]. Microbiology, 2014, 160(8): 1571-1584.
- [12] MORINAGA Y, TANI Y, YAMADA H. Formation of L-methionine by methanol-utilizing bacteria. Part V. Homocysteine transmethylation in methanol-utilizing bacteria and its application to L-methionine production[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1984, 48(1): 143-148.
- [13] USUDA Y, KURAHASHI O. Effects of deregulation of methionine biosynthesis on methionine excretion in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3228-3234.
- [14] MIN WH, LIN XQ, FENG Q. Screening of mutants resistant to methionine analogues[J]. Journal of Jilin University (Science Edition), 2009, 47(4): 840-845.
- [15] USUDA Y, KURAHASHI O. Method for producing L-methionine by fermentation[P]. US7611873(B1), 2009.
- [16] 郭谦. 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-蛋氨酸[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014.
- GUO Q. Metabolic engineering transformed *E. coli* to produce L-methionine[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [17] QIN TY, HU XQ, HU JY, WANG XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032 to produce L-methionine[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(4): 563-573.
- [18] LI H, WANG BS, LI YR, ZHANG L, DING ZY, GU ZH, SHI GY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(1): 75-88.
- [19] HUANG JF, SHEN ZY, MAO QL, ZHANG XM, ZHANG B, WU JS, LIU ZQ, ZHENG YG. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [20] TANG XL, DU XY, CHEN LJ, LIU ZQ, ZHENG YG. Enhanced production of L-methionine in engineered *Escherichia coli* with efficient supply of one carbon unit[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(3): 429-436.
- [21] NIU K, FU Q, MEI ZL, GE LR, GUAN AQ, LIU ZQ, ZHENG YG. High-level production of L-methionine by dynamic deregulation of metabolism with engineered nonauxotroph *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(2): 492-501.
- [22] KUMAR D, GARG S, BISARIA VS, SREEKRISHNAN TR, GOMES J. Production of methionine by a multi-analogue resistant mutant of *Corynebacterium lilium*[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(8): 1165-1171.
- [23] LODDEKE M, SCHNEIDER B, OGURI T, MEHTA LTI, XUAN ZY, REITZER L. Anaerobic cysteine degradation and potential metabolic coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(16):1-16.
- [24] CHONOLES LMLAY KR, KORSHUNOV S, IMLAY JA. Physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(23): 3629-3644.
- [25] TAKUMI K, NONAKA G. Bacterial cysteine-inducible cysteine resistance systems[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(9): 1384-1392.
- [26] KOHL JB, MELLIS AT, SCHWARZ G. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism[J]. British Journal of Pharmacology, 2019, 176(4): 554-570.
- [27] OHTSU I, KAWANO Y, SUZUKI M, MORIGASAKI S, SAIKI K, YAMAZAKI S, NONAKA G, TAKAGI H. Uptake of L-cystine via an ABC transporter contributes defense of oxidative stress in the L-cystine export-dependent manner in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0120619.
- [28] JIANG FG, ZHOU KH, MA LL, GRESSEL S, DOUDNA JA. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition[J]. Science, 2015, 348(6242): 1477-1481.
- [29] JIANG FG, DOUDNA JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 30: 100-111.
- [30] ZHANG Y, KANG P, LIU S, ZHAO YJ, WANG ZW, CHEN T. *glyA* gene knock-out in *Escherichia coli* enhances L-serine production without glycine addition[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(4): 390-396.
- [31] ZHANG XM, XU GQ, SHI JS, KOFFAS MAG, XU ZH. Microbial production of L-serine from renewable feedstocks[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(7): 700-712.

- [32] AWANO N, WADA M, KOHDOH A, OIKAWA T, TAKAGI H, NAKAMORI S. Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(2/3): 239-243.
- [33] PLAMANN MD, STAUFFER GV. Characterization of a *cis*-acting regulatory mutation that maps at the distal end of the *Escherichia coli glyA* gene[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 161(2): 650-654.
- [34] LORENZ E, STAUFFER GV. Characterization of the *MetR* binding sites for the *glyA* gene of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(14): 4113-4120.
- [35] 姚琴, 金霞, 宗义强, 屈伸. 两种菌株来源的 *glyA* 基因的克隆、表达及酶活性检测[J]. 氨基酸和生物资源, 2006(1): 1-9
- [36] YAO Q, JIN X, ZONG YQ, QU S. Cloning, expression and enzyme activity detection of *glyA* gene from two strains[J]. Amino Acids and Biological Resources, 2006(1): 24-26 (in Chinese).
- [37] JIANG W, CHEN L, HU N, YUAN SH, LI B, LIU ZD. A novel serine hydroxymethyltransferase from *Arthrobacter nicotianae*: characterization and improving catalytic efficiency by rational design[J]. BMC Biotechnology, 2014, 14(1): 1-9.
- [38] SABRIALABE S, YANG JG, YARIV E, BEN TN, LEWINSON O. Substrate recognition and ATPase activity of the *E. coli* cysteine/cystine ABC transporter *YecSC-fltY*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(16): 5245-5256.

(本文责编 郝丽芳)