

# 谷氨酸棒状杆菌高效发酵谷氨酸的关键分子机理研究进展

杨阳<sup>1,2</sup>, 张苗苗<sup>2,3</sup>, 高越<sup>2</sup>, 郭晓鹏<sup>2</sup>, 李文建<sup>2,3</sup>, 冷非凡<sup>1</sup>, 陆栋<sup>2,3,\*</sup>

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050;

2. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃兰州 730000;

3. 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 谷氨酸是世界上产量最大的氨基酸, 在食品、医药、工农业等领域具有广泛的用途。谷氨酸棒状杆菌是工业生产谷氨酸的主要菌株, 从发现谷氨酸棒状杆菌以来, 国内外在谷氨酸过量产生机理方面的研究已取得了一定的科研成果。本文就发酵过程中基因转录水平、关键酶酶活、细胞膜与运输蛋白的结构 3 个层面机理的研究进展做一综述。最后对谷氨酸过量产生的机理进行分析, 将来需从生理作用及调控因子等方面研究, 进一步完善谷氨酸过量产生机理, 以期对提高谷氨酸产量以及开发微生物合成其他生物产品提供参考和方向。

**关键词:** 谷氨酸棒状杆菌, 谷氨酸发酵, 分子机理

## Research Progress on Key Molecular Mechanism of High Yield Glutamic Acid Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*

YANG Yang<sup>1,2</sup>, ZHANG Miao-miao<sup>2,3</sup>, GAO Yue<sup>2</sup>, GUO Xiao-peng<sup>2</sup>, LI Wen-jian<sup>2,3</sup>, LENG Fei-fan<sup>1</sup>, LU Dong<sup>2,3,\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3. Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Glutamic acid has emerged as the largest amino acid product in the world, it has important applications in medicine, food and agriculture. *Corynebacterium glutamicum* is the most important strain for industrial production of glutamic acid. After the discovery of *C. glutamicum*, these are some achievements on the mechanism of glutamate overproduction at home and abroad. In this paper, the research progress of the three levels of mechanism, namely, gene transcription level, key enzyme activity, cell membrane and transport protein structure during fermentation was reviewed, the mechanism of glutamate overproduction was analyzed. In the future research, in order to complete the mechanism of glutamate overproduction, it is necessary to study the physiological effects and regulatory factors. If it's perfected, the research will provide a reference and direction for further improving the production of glutamic acid and research of developing microorganisms to synthesize other biological products.

**Key words:** *Corynebacterium glutamicum*; glutamic acid fermentation; molecular mechanism

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2019)05-0311-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.053

引用格式: 杨阳, 张苗苗, 高越, 等. 谷氨酸棒状杆菌高效发酵谷氨酸的关键分子机理研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 311-315, 321.

谷氨酸是食物蛋白质的重要组成, 在营养代谢、能量供应、免疫响应、氧化应激及信号通路调节等过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。因此, 谷氨酸作为一种重要氨基酸被广泛应用于食品、饲料、医药、化妆品等行业。谷氨酸是由  $\alpha$ -酮戊二酸与游离氨在谷氨酸脱氢酶的催化下发生还原氨基化而形成。已经证实大肠杆菌突变菌株 (*E. coli*) 及芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、节杆菌

属 (*Arthrobacter*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 中有许多菌株能生产谷氨酸, 其中谷氨酸棒状杆菌是研究和应用最多的谷氨酸生产菌<sup>[2]</sup>。

谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一种好氧型的、非致病革兰氏阳性菌, 它是一种重要的工业微生物, 用来发酵生产 L-谷氨酸, 其它氨

收稿日期: 2018-07-09

作者简介: 杨阳 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程, E-mail: 496825543@qq.com。

\* 通讯作者: 陆栋 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 辐射生物学, E-mail: ld@impcas.ac.cn。

基金项目: 中国科学院重点部署项目 (KFZD-SW-109); 中科院工研院两院合作项目 (CAS-ITRI 201801)。

基酸及各种有机酸<sup>[2]</sup>。谷氨酸产生菌大多为生物素缺陷型,因此在谷氨酸发酵时通过控制生物素亚适量,引起代谢失调,使谷氨酸得以积累<sup>[3]</sup>。在利用木质纤维素水解产物作为原料发酵生产谷氨酸时(如稻草、小麦秸秆、甘蔗渣),需要克服过量生物素对谷氨酸分泌产生的抑制作用,在发酵过程中适时适量添加吐温 40(Tween 40)或青霉素等诱导物可有效提高谷氨酸产量<sup>[4]</sup>。谷氨酸合成途径包含大量复杂的酶反应,包括糖酵解途径(glycolytic pathway, EMP)、磷酸己糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、乙醛酸循环(glyoxylic acid cycle, GAC)、伍德-沃克曼(Wood-Werkman cycle)反应等。由于谷氨酸合成分解代谢途径比较复杂,影响其合成和分解代谢的因素也会较多,对谷氨酸合成机理的研究造成了一定困难,一直以来在其合成代谢途径中的酶、基因等许多因素的作用和功能不明确。

近年来随着分子生物学的快速发展,分子生物学技术在谷氨酸研究领域的应用越来越广泛,大量合成谷氨酸的新机理被不断揭示,包括诱导物触发谷氨酸的分泌都伴同 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物( $\alpha$ -oxoglutarate dehydrogenase complex, ODHC)酶活的显著降低与细胞膜通透性的增加,从而引起代谢流的方向变化并激活谷氨酸运输蛋白,最终影响谷氨酸的合成。本文综述了近年来有关谷氨酸合成与分泌机理的研究进展,以期对未来开发微生物合成谷氨酸及其它生物产品提供参考和方向。

## 1 转录水平调控谷氨酸积累

### 1.1 中心代谢途径相关酶转录水平

合成谷氨酸的代谢途径至少有 16 步酶促反应,其中任意一个酶转录水平的变化都可能引起代谢流向的改变,影响谷氨酸的合成。Hirasawa 等<sup>[5]</sup>利用代谢组学和转录组学技术研究发现,在发酵途中添加青霉素后,10~360 min 细胞内含有的 20 种氨基酸的含量均下降,有四个可能与谷氨酸分泌相关的信号转导基因转录水平上调,戊糖磷酸途径相关基因转录水平下调,三羧酸循环与糖酵解途径中有关葡萄糖转化为 $\alpha$ -酮戊二酸的基因转录水平上调, $\alpha$ -酮戊二酸转化为草酰乙酸的基因与补给途径相关基因转录水平下调。此外,NCgl1221 与 odhI 分别编码谷氨酸运输蛋白与 ODHC 抑制蛋白,它们的转录水平上调。这些实验结果表明青霉素引起的细胞代谢变化和谷氨酸的分泌,是代谢途径中相关酶的转录水平改变触发的。曹艳<sup>[6]</sup>通过关键酶的转录水平分析,进一步阐明转录水平与谷氨酸大量积累的内在关系,生物素充足时,添加 Tween 40 能够提高胞内催化所有的代谢途径关键酶的转录水平,并诱导了细胞转型使细胞膜(壁)结构发生改变、通透性增加。胞内谷氨酸含量升高,运输蛋白的转录水平也大幅提高促使谷氨酸分泌,最终使发酵液中谷氨酸浓度达到正常水平。Kataoka 等<sup>[7]</sup>通过 DNA 芯片技术研究发现,生物素限量、初始生物素过量在发酵途中添加青霉素或 Tween 40,可以降低 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复

合物的活性,从而改变代谢流的流向使谷氨酸大量合成,该酶由 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶( $\alpha$ -ketoglutarate decarboxylase,  $E_1$ )、二氢硫辛酰转琥珀酰酶(dihydrolipoamide succinyltransferase,  $E_2$ )和二氢硫辛酰脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase,  $E_3$ )三种酶组成。 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物酶活性降低是由编码 $E_1$ 的基因 odhA 和 $E_2$ 的基因 sucB 转录水平下调所致。此外,还有 5 个目前未知功能的可能与谷氨酸大量合成相关的基因显著上调(NCgl0917、NCgl2944、NCgl2945、NCgl2946 和 NCgl2975),涉及 EMP、PPP 和 TCA 途径的大多数基因下调,这些结果表明,谷氨酸的大量产生与细胞中已有的酶密切相关。

### 1.2 能量代谢及分支菌酸缺失株基因转录水平

细胞内能量水平对糖代谢相关酶、ATP 依赖型的运输系统有调控作用,因此,能量代谢可能会影响谷氨酸的合成与积累。Sekine 等<sup>[8]</sup>发现一株带有自发新霉素突变的谷氨酸棒状杆菌,对葡萄糖的消耗比率较亲本菌株高 2 倍,但其生长率比亲本菌株低,且 $H^+$ -ATPase 活性降低了 25%。进一步研究发现,在 $H^+$ -ATPase 的 $\gamma$ 亚基基因序列中有一个点突变。后经发酵条件优化,该菌株的谷氨酸产量提高一倍以上<sup>[9]</sup>。利用 $H^+$ -ATPase 基因失活构建高产谷氨酸基因工程菌,证实了 $H^+$ -ATPase 基因失活对提高谷氨酸产量的作用<sup>[10]</sup>。Hirasawa 等<sup>[5]</sup>在转录组测序的基础上,通过差异基因功能富集分析,发现青霉素诱导谷氨酸分泌时与能量合成、转换的相关基因转录水平显著下调,编码 $F_1F_0$ -ATPase 的基因转录水平下调。以上结果表明,谷氨酸的大量分泌可能与细胞内能量合成与转化的基因转录水平下调有关系。

细胞壁对氨基酸的分泌具有渗透屏障的作用,同时分枝菌酸是谷氨酸棒状杆菌细胞壁非常重要的组分。为了探究分枝菌酸的功能和分支菌酸缺失对细胞造成的影响,高云飞<sup>[11]</sup>构建了*C. glutamicum* ATCC13869 的分支菌酸缺失株,发现其合成和分泌谷氨酸的能力显著提高;随后通过转录组对比分析分枝菌酸缺失株和原始株,共获得 2692 个差异表达基因,这些基因涉及细胞壁代谢、磷脂合成、脂肪酸合成与分解、肌醇代谢、细胞分裂、RNA 降解等。因此,分枝菌酸可以作为潜在的改造靶点提高谷氨酸产量,同时说明分枝菌酸的缺失还对细胞的多方面造成了影响。

转录水平在促进谷氨酸生产过程中起重要作用,优化中心代谢途径,抑制 ODHC 活力,使 $\alpha$ -酮戊二酸氧化能力降低,还参与细胞表面结构的改变,使细胞膜的渗透性增强,提高转运蛋白表达量,最终诱导谷氨酸的高产。

## 2 关键酶酶活调控谷氨酸的合成

### 2.1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的酶活调控

谷氨酸上游代谢途径的中间产物柠檬酸,是三羧酸循环起始步骤中的草酰乙酸与乙酰-CoA 通过碳原子之间的相互缩合而形成。因此这两种化合物的平衡供应对谷氨酸的高效生产非常重要。谷氨酸

棒状杆菌存在两条回补途径分别是:磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(phosphoenopyruvate carboxylase, PEPC)催化烯醇式丙酮酸转化为草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)和丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, PC)催化丙酮酸转化为OAA。Tomokazu等在谷氨酸发酵过程中添加Tween 40后,发现发酵液开始大量积累谷氨酸,此时PC催化反应途径的流量显著提高,PC活性显著升高<sup>[12]</sup>。因此,在Tween 40诱导谷氨酸生产中,PC催化的反应途径对谷氨酸合成至关重要。生物素限量诱导谷氨酸分泌时敲除PEPC的编码基因ppc会使谷氨酸棒状杆菌失去产生谷氨酸的能力,而敲除PC的编码基因pyc则不影响谷氨酸的合成。<sup>13</sup>C标记的代谢流分析发现pyc敲除后补给途径流量低于野生型,而过表达ppc则会提高pyc敲除和野生型补给途径的流量。因此,在生物素限量诱导谷氨酸生产中,PEPC催化的反应途径是合成谷氨酸的必要途径<sup>[13]</sup>。

PEPC是调节酶受产物和代谢中间物的反馈阻遏与反馈抑制(如谷氨酸、天冬氨酸、2-酮戊二酸、苹果酸),解除反馈作用能够增加补给途径对OAA的补充<sup>[14-15]</sup>。PEPC中的单个氨基酸替换(D299N)能够解除天冬氨酸对PEPC的抑制,使PEPC酶活提高,从而促进谷氨酸合成<sup>[16]</sup>。敲除丙酮酸激酶基因(pyruvate kinase, PYK)后细胞糖耗加快而生长率降低,PEPC酶活提高而磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶酶活下降,同样有助于谷氨酸的合成<sup>[17]</sup>。此外,在谷氨酸棒状杆菌ATCC13032中敲除pyk并解除天冬氨酸对PEPC的反馈抑制,能协同提高谷氨酸的产量<sup>[18]</sup>。Mizuno等<sup>[19]</sup>发现谷氨酸大量合成时涉及EMP、TCA及其他代谢途径的相关酶的琥珀酰化程度明显升高,而乙酰化程度明显降低,这可能是因为代谢物能够调控酶的酰化状态,使受到酰化修饰的酶的活性发生变化,从而调节谷氨酸合成。在Tween 40诱导的条件下,谷氨酸棒状杆菌的磷酸烯醇丙酮酸羧化酶中有八个赖氨酸残基发生乙酰化或琥珀酰化修饰,Nagano等<sup>[20]</sup>发现PEPC中K653残基的乙酰化修饰对谷氨酸合成至关重要。K653的乙酰化使谷氨酸分泌水平明显降低(1 g/L),而非乙酰化接近正常分泌水平(15 g/L),对PEPC的催化效率指数( $k_{cat}/K_m$ )进行测定,发现乙酰化后的PEPC催化效率指数比野生型降低了90倍,这表明K653的乙酰化在很大程度上降低了PEPC的活性。NCgl0616编码的一种去乙酰化酶,可以激活PEPC,其可能在谷氨酸合成过程中起激活PEPC的作用。这是因为PEPC受到细胞内大量积累的谷氨酸等产物和代谢中间物的反馈阻遏和抑制,NCgl0616可以去乙酰化,提高PEPC的比活性,从而维持PEPC酶活,使代谢流继续向着合成谷氨酸的方向进行。

## 2.2 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合物酶活调控

ODHC能够催化谷氨酸的前体物质 $\alpha$ -酮戊二酸形成琥珀酰-CoA,因此,ODHC活性的降低,能够改变代谢分布,使其集中流向谷氨酸合成方向,对谷氨酸的大量合成有重要作用。

研究表明,ODHC的酶活受OdhI的磷酸化状态调节,OdhI由含有两个磷酸化位点(Thr14和Thr15)的N端和C端结构域组成,蛋白激酶G(PknG)可以对OdhI进行磷酸化,磷酸化的OdhI结构发生改变并从OdhA上脱离下来,从而解除对ODHC的抑制,非磷酸化的OdhI通过C端FHA域与ODHA结合从而抑制ODHC的酶活,敲除pknG能够提高谷氨酸的产量<sup>[21-22]</sup>。Kim等<sup>[23]</sup>用蛋白质印迹法测定青霉素和Tween 40添加后谷氨酸生产阶段的蛋白含量,发现未磷酸化的OdhI含量明显高于磷酸化的OdhI,ODHC酶活测定表明,ODHC活性明显降低<sup>[24]</sup>,从而表明大量增加的未磷酸化的OdhI抑制了ODHC酶活。

ODHC存在多个赖氨酸位点,易进行乙酰化或琥珀酰化,可能会改变ODHC的活性<sup>[19]</sup>。进一步研究表明,OdhI的FHA结构域中两个赖氨酸残基Lys52和Lys132有乙酰化和琥珀酰化位点,Lys132的琥珀酰化降低OdhI对OdhA的亲和力,从而减弱OdhI对ODHC的抑制作用,使谷氨酸的产量降低,而K132R(非酰基化突变)能够消除亲和力的变化。Tween 40诱导的谷氨酸产生阶段伴随OdhI的琥珀酰化修饰,因此OdhI的琥珀酰化可能对谷氨酸的合成起负调控作用<sup>[25]</sup>。以上结果表明,磷酸化和琥珀酰化都能够调控谷氨酸的合成,可能通过这种酶活的调控方式,改变代谢流的分布,从而进一步增加谷氨酸的合成。

## 3 谷氨酸分泌的影响因素

### 3.1 细胞膜和细胞壁结构改变

细胞表面结构与功能方面的特异性变化是谷氨酸向胞外分泌的关键,对谷氨酸的大量分泌有重要影响。脂肪酸是细胞膜的重要组成部分,DtsR蛋白(乙酰辅酶A羧化酶)参与脂肪酸的合成<sup>[26]</sup>。生物素限量或添加Tween 40诱导谷氨酸产生时伴随DtsR蛋白含量减少,因此推测谷氨酸的合成与DtsR含量密切相关<sup>[27]</sup>。Kimura等<sup>[28]</sup>将dtsR敲除后发现即使在生物素过量的情况下,不添加任何诱导物也能观察到谷氨酸的分泌,过表达则会抑制分泌,同时生物素限量、添加Tween 40诱导或敲除dtsR基因都能引起ODHC酶活的降低。因此推论DtsR蛋白是通过影响ODHC活性间接影响谷氨酸合成途径的。

谷氨酸棒状杆菌细胞壁中含有大量分支菌酸,它是一类含60~90个碳原子的分支长链 $\beta$ -羟基脂肪酸。分支菌酸连接在由阿拉伯糖和半乳糖交替连接形成的杂多糖链上,并通过磷脂键与肽聚糖链相连接<sup>[29]</sup>。谷氨酸分泌时往往伴随分支菌酸的减少,其原因可能是青霉素能够抑制肽聚糖层的形成,而生物素限量和Tween 40抑制了脂肪酸的合成<sup>[30]</sup>。总之,分支菌酸的缺损一方面使细胞膜(壁)通透性增加,另一方面使细胞内渗透压发生变化从而激活了谷氨酸运输蛋白,促进了谷氨酸的分泌。

### 3.2 膜蛋白

细胞膜(壁)结构的改变和拥有谷氨酸运输载体是谷氨酸大量分泌不可欠缺的条件,谷氨酸的分泌

是利用细胞膜上的运输蛋白为介导的运输过程<sup>[6]</sup>。目前多见报道的谷氨酸运输蛋白有 NCgl1221 和 MscCG2 编码的细胞膜蛋白。

**3.2.1 NCgl1221 型运输蛋白** 研究表明谷氨酸主要运输蛋白具有机械敏感通道蛋白活性,位于细胞质膜上由 NCgl1221 编码,有 4 个跨膜结构域。谷氨酸通过该蛋白以被动扩散的方式穿过细胞膜<sup>[31-32]</sup>,这一方式适应于谷氨酸分泌这种较慢的运输过程,不适应于响应剧烈或损伤性的胁迫如渗透压冲击<sup>[33]</sup>。NCgl1221 的 N 端(1~286)与 *E.coli* 的 MscS 型机械敏感通道高度同源,主要差异是 NCgl1221 有额外的长为 247 个氨基酸的 C 端,包括位于细胞质内结构域的 287~401 氨基酸,402~419 氨基酸的跨膜螺旋与 420~533 氨基酸位于胞质外结构域<sup>[34]</sup>。生物素限量或 Tween 40、青霉素诱导时,NCgl1221 缺失丧失了大量分泌谷氨酸的能力,导致细胞内谷氨酸大量积累,过表达则会增加谷氨酸分泌<sup>[32]</sup>。Yamashita 等<sup>[34]</sup>通过构建一系列截短的 NCgl1221 的 C 端和 N 端区域突变体及大肠杆菌 MscS 和谷氨酸棒状杆菌 MscCG 的两种蛋白质的融合体,发现 NCgl1221 的 N 端是谷氨酸分泌的必要结构,用膜片钳电生理技术也证实了 N 端的分泌作用。用 3D 同源建模的方法,发现 NCgl1221 的 N 端 221~232 位的氨基酸残基形成一个回环结构,敲除该回环结构几乎会失去分泌谷氨酸的能力,大多数 MscS 型蛋白不具有该结构,因此该结构与谷氨酸的合成分泌密切相关。

NCgl1221 的 C 末端截短(420~533)是一种获得功能性突变,突变株可以在生物素过量而没有诱导物(青霉素或 Tween 40)添加时大量分泌谷氨酸。然而,当过表达 ODHC 抑制蛋白 OdhI 时,只有少量谷氨酸可以在生物素过量而没有诱导物添加时分泌;敲除 odhI 的突变株在诱导时基本不分泌谷氨酸<sup>[35]</sup>。这些结果表明,NCgl1221 调节谷氨酸分泌的作用优先于 OdhI。NCgl1221 的不同激活状态(如诱导物的不同)可能会影响 ODHC 酶活,ODHC 酶活受 OdhI 调节,对于 OdhI 与 NCgl1221 共同调节谷氨酸分泌的关系目前尚不清楚。此外,NCgl1221 的 C 末端有降低通道激活阈值与减缓通道关闭的作用,而且 C 端对 *E.coli* 的 MscS 通道有正调控作用<sup>[36]</sup>。

**3.2.2 MscCG2 型运输蛋白** 诱导谷氨酸分泌过程中,NCgl1221 缺失时仍可分泌少量谷氨酸;当胞内谷氨酸浓度低于胞外时,也能观察到谷氨酸的分泌。然而,NCgl1221 中并没有发现 ATP 结合位点,因此在谷氨酸棒状杆菌中除了 NCgl1221 系统外,可能还存在其他 ATP 依赖的谷氨酸运输系统或分泌通道<sup>[37-38]</sup>。Wang 等<sup>[39]</sup>发现了另一个能够分泌谷氨酸的小电导机械敏感型离子通道 MscCG2,它只存在于部分谷氨酸棒状杆菌中,在生物素限量或青霉素诱导时才能被激活。MscCG2 与 MscCG 具有较低的氨基酸序列同源性(23%),表明它们很可能具有不同的进化起源。MscCG2 分泌谷氨酸的能力弱于 MscCG。研究中将 MscCG2 与绿色荧光蛋白进行融合表达,确定该蛋白位于细胞质膜,其具有三个跨膜螺旋的 N-末端区域位于细胞质膜中,而 C 末端位于

细胞质膜内。总之,谷氨酸的分泌主要是通过细胞膜上的运输蛋白完成,诱导物能够改变细胞表面结构从而激活运输蛋白。正是谷氨酸运输蛋白具有的这种特殊结构,赋予了其能够大量释放细胞内谷氨酸的能力。

## 4 结论与展望

谷氨酸的大量合成是由多因子协同作用的,基因表达调控与蛋白质修饰作用在全局水平调控谷氨酸合成,关键酶酶活的改变促进代谢流流向谷氨酸的合成方向,细胞膜(壁)结构改变激活谷氨酸运输蛋白,使谷氨酸得以大量分泌。尽管很多报道已经证实转录水平能够有效调控谷氨酸分泌,但相关诱导物调控转录机理以及谷氨酸大量分泌对细胞的生理作用未见报道。尽管谷氨酸棒状杆菌的产酸能力伴随着谷氨酸发酵生产发展获得了很大的提高,但在高产谷氨酸棒状杆菌基础上进行基因工程技术研究以提高谷氨酸产量和糖酸转化率仍有相对难度。为更好的了解谷氨酸合成的分子机理,需要对蛋白质翻译后修饰及相互作用机理、诱导物对转录水平的相关调控机理、谷氨酸大量分泌对细胞的生理作用等进行深入研究,并在基因组范畴分析谷氨酸合成机理。谷氨酸生物合成涉及复杂的调控网络,生物内在因素和外界环境均可影响谷氨酸的合成,从分子的角度看,基因表达水平与蛋白质修饰均能够整体调控合成网络,其中的刺激因子和抑制因子还有待于深入研究。通过对相关机理的研究,为改造生物产品生产菌提供理论基础,从而实现产物的最大积累,满足我国对微生物产品的不断需求。

## 参考文献

- [1] 房凤玲,丁劲松.L-谷氨酸的胃肠道保护作用机制及药物开发[J].药学学报,2017,52(4):517-523.
- [2] 于信令.味精工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [3] 姚辉,张建华,毛忠贵.谷氨酸棒状杆菌的谷氨酸分泌模式初探[J].食品与发酵工业,2013,39(5):54-58.
- [4] Wen J, Xiao Y, Liu T, et al. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1):132.
- [5] Hirasawa T, Saito M, Yoshikawa K, et al. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome of *Corynebacterium glutamicum* during penicillin - induced glutamic acid production [J]. Biotechnology Journal, 2018.
- [6] 曹艳.利用代谢酶学和模型技术改善谷氨酸发酵的稳定性和糖酸转化率[D].无锡:江南大学,2013.
- [7] Kataoka M, Hashimoto K I, Yoshida M, et al. Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction [J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(5):471-476.
- [8] Sekine H, Shimada T, Hayashi C, et al. H<sup>+</sup> - ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production

- with enhancement of glucose consumption rate. [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2001, 57(4): 534-540.
- [9] Aoki R, Wada M, Takesue N, et al. Enhanced glutamic acid production by a  $H^+$  - ATPase - Defective mutant of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2005, 69(8): 1466-1472.
- [10] 张博, 李铁民, 杨智勇, 等. 谷氨酸棒杆菌  $H^+$  - ATPase 基因失活提高谷氨酸产生量 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(1): 35-39.
- [11] 高云飞. 分枝菌酸缺失对谷氨酸棒状杆菌 ATCC13869 的影响研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [12] Shirai T, Fujimura K, Furusawa C, et al. Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis [J]. Microbial Cell Factories, 2007, 6(1): 1-11.
- [13] Sato H, Orishimo K, Shirai T, et al. Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2008, 106(1): 51-58.
- [14] Delaunay S, Daranlapujade P, Engasser J M, et al. Glutamate as an inhibitor of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2004, 31(4): 183-188.
- [15] 吴新阳, 裴广胜, 郑小梅, 等. 不同抑制剂对谷氨酸棒状杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶酶活的影响 [J]. 生物技术通报, 2013(7): 172-178.
- [16] Wada M, Sawada K, Ogura K, et al. Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2015, 121(2): 172-177.
- [17] Sawada K, Zen-In S, Wada M, et al. Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 401-407.
- [18] Wada M, Sawada K, Ogura K, et al. Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2015, 121(2): 172-177.
- [19] Mizuno Y, Nagano - Shoji M, Kubo S, et al. Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction [J]. Microbiologyopen, 2016, 5(1): 152-173.
- [20] Nagano - Shoji M, Hamamoto Y, Mizuno Y, et al. Characterization of lysine acetylation of a phosphoenolpyruvate carboxylase involved in glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Molecular Microbiology, 2017, 104(4): 677-689.
- [21] Raasch K, Bocola M, Labahn J, et al. Interaction of 2-oxoglutarate dehydrogenase OdhA with its inhibitor OdhI in *Corynebacterium glutamicum*: Mutants and a model [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 191: 99-105.
- [22] 王楠楠, 倪亚兰, 史锋. 敲除 *pknG* 提高谷氨酸棒状杆菌 L-谷氨酸和 GABA 产量 [J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(2): 187-193.
- [23] Kim J, Hirasawa T, Saito M, et al. Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin - and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 91(1): 143-151.
- [24] Hasegawa T, Hashimoto K I, Kawasaki H, et al. Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* (microbial physiology and biotechnology) [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 105(1), 12-19.
- [25] Komine-Abe A, Nagano-Shoji M, Kubo S, et al. Effect of lysine succinylation on the regulation of 2 - oxoglutarate dehydrogenase inhibitor, OdhI, involved in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2017, 81(11): 2130-2138.
- [26] Kimura E, Abe C, Kawahara Y, et al. A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1): 157-161.
- [27] Kimura E. Triggering mechanism of L - Glutamate overproduction by *DtsR1* in coryneform bacteria [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2002, 94(6): 545-551.
- [28] Kimura E, Yagoshi C, Kawahara Y, et al. Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising *DtsR* and a biotin-containing subunit [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1999, 63(7): 1274-1278.
- [29] Lothar E, Hermann S. The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2001, 92(3): 201-213.
- [30] Hashimoto K, Kawasaki H, Akazawa K, et al. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate - overproducing *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2006, 70(1): 22-30.
- [31] Nakamura J, Hirano S, Ito H, et al. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L - glutamic acid production [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(14): 4491-4498.
- [32] Hashimoto K, Murata J, Konishi T, et al. Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2012, 76(7): 1422-1424.
- [33] Nakayama, Yoshitaka, Yoshimura, et al. Electrophysiological characterization of the mechanosensitive channel *MscCG* in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biophysical Journal, 2013, 105(6): 1366-1375.
- [34] Yamashita C, Hashimoto K, Kumagai K, et al. L - Glutamate secretion by the N - terminal domain of the *Corynebacterium* (下转第 321 页)

版社,1999.

[45]袁海波.茶叶膳食纤维的研究与应用[J].浙江农业科学,2010(5):1010-1014.

[46]王增盛,谭湖伟,张莹,等.茯砖茶制造中主要含氮、含碳水化合物化合物的变化[J].茶叶科学,1991,11(增刊):69-75.

[47] I Kriszbacher, M Koppán, J Bódis. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 352(16):429-430.

[48]袁野,章斌,陆小琴,等.雅安藏茶对脂质代谢紊乱大鼠减脂降脂作用研究[J].中药药理与临床,2016,32(2):161-164.

[49]袁野,章斌,姚永秀,等.雅安藏茶调脂保肝及抗氧化作用研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2017,38(1):40-44.

[50] Loftus TM, Jaorsky DE, Frehywot GL, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors [J]. Science, 2000, 288(5475):2379-2381.

[51] Kuhajda FP. Fatty acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology [J]. Nutrition, 2000, 16: 202-208.

[52]杨志秋,詹莉莉,傅正伟.脂肪酶抑制剂应用于抗肥胖的研究进展[J].现代生物医学进展,2011,11(21):4178-4181.

[53]孙世利,凌彩金,潘顺顺,等.茶叶抑制肥胖的生物化学与分子细胞生物学机制[J].中国农学通报,2011,27(2):373-377.

[54]姜波.四川边茶对脂肪酸合酶抑制作用的研究[D].雅安:四川农业大学,2007.

[55]徐甜.四川边茶茶褐素优化提取及降血脂活性研究[D].雅安:四川农业大学,2010.

[56]聂坤伦,何利,速晓娟,等.雅安藏茶抑制 $\alpha$ -淀粉酶的活性级分筛选与评价[J].食品科学,2013,34(9):74-79.

[57]边金霖,郭金龙,李品武,等.雅安藏茶对脂肪酶的抑制作用[J].食品科学,2015,36(3):23-28.

[58]唐皓迪,颜同文,罗晓琳,等.雅安藏茶水提物的降脂活性研究[J].中国测试,2018,44(2):62-66.

[59]朱佳妮,张天泉,李诗竹,等.藏茶降脂减肥作用的动物实验研究[J].食品科技,2015,40(4):151-154.

[60]郭金龙,王春梅,杜晓.雅安藏茶对氧自由基清除能力评价[J].四川农业大学学报,2009,27(2):189-192.

[61]艾小钰,高玮,黄霞,等.不同茶饮产品的抗氧化能力分析及其感官评价[J].食品工业科技,2015,36(20):164-167.

[62]杨新河,黄明军,马蔚,等.不同黑茶多糖的组成分析及

其抗氧化活性[J].食品工业科技,2017,38(20):16-20.

[63]刘宇,董平,梁兴国.胃蛋白酶的分离现状及其活性研究进展[J].生物学杂志,2016,33(3):75-79.

[64]边金霖,郭金龙,李品武,等.雅安藏茶对胃蛋白酶的促进作用[J].四川农业大学学报,2015,33(3):279-284.

[65]屠幼英,须海荣,梁惠玲,等.紧压茶对胰酶活性和肠道有益菌的作用[J].食品科学,2002,23(10):113-116.

[66]吕晓华,徐家玉,孙冉,等.藏茶保健作用的人体试饮研究[J].食品研究与开发,2017,38(4):168-171.

[67]李解,陈雪皎,郭承义,等.雅安藏茶和低聚木糖复配物润肠通便作用[J].食品科学,2015,36(1):220-224.

[68]周斌星,孔令波,陈军贤.普洱茶多糖的提取及降血糖的研究[J].中国农学通报,2009(15):55-59.

[69]樊怡欣.四种茶类对自发性2型糖尿病KKAY小鼠降糖作用的比较研究[D].北京:北京中医药大学,2011.

[70]赵仁亮,谢娇枚,黄建安,等.黑茶的作用及其饮料开发的探讨[A].经济发展方式转变与自主创新-第十二届中国科学技术协会年会(第二卷)[C],2010.

[71]王文蒙. $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的提取、分离及性质研究[D].天津:天津商业大学,2010.

[72]章蕾.PPAR $\gamma$ 2激动剂筛选模型的建立及其在黑茶提取物调节血糖功能评价中的应用[D].长沙:湖南农业大学,2011.

[73]Theeshan B, Amitabha LR, Teeluck K Gunness, et al. Black tea reduces uric acid and C-reactive protein levels in humans susceptible to cardiovascular diseases [J]. Toxicology, 2010, 278(1):68-74.

[74] Andrew JM, Kristen AB. Uric acid is closely linked to vascular nitric oxide activity: Evidence for mechanism of association with cardiovascular disease [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2001, 38(7):1850-1858.

[75]陶华君.茶叶与人体健康[J].中国食物与营养,2004(2):45-48.

[76]李解,林莉岚,谭晓琴,等.雅安藏茶对<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 辐射损伤小鼠的防护作用[J].营养学报,2017,39(4):395-399.

[77]李解,吴家乐,谭晓琴,等.雅安藏茶茶多糖对<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐照损伤小鼠抗氧化和造血功能的防护作用[J].核农学报,2017,31(8):1509-1514.

[78]许靖逸,李祥龙,李解,等.雅安藏茶茶褐素对<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 辐射损伤的防护作用[J].核技术,2017,40(4):7-14.

[79]岳随娟,刘建,龚加顺.普洱茶茶褐素对大鼠肠道菌群的影响[J].茶叶科学,2016(3):261-267.

(上接第315页)

*glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2013, 77(5):1008-1013.

[35]Schultz C, Niebisch A, Gebel L, et al. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(3):691-700.

[36]Nakayama Y, Becker M, Ebrahimi H, et al. The impact of the C-terminal domain on the gating properties of MscCG from *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biochimica Et Biophysica Acta,

2015, 1858(1):130-138.

[37] Gutmann M, Hoischen C, Krämer R. Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum*, under biotin limitation [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1112(1):115-123.

[38]Lubitz D, Wendisch V F. Ciprofloxacin triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Bmc Microbiology, 2016, 16(1):235.

[39]Wang Y, Cao G, Xu D, et al. A novel L-Glutamate exporter of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2018; AEM.02691-17.