乙酰羟基酸合酶的半理性设计、改造和初步应用

吴琳，侯欣怡，欧阳智林，章新宇，郑穗平*

（华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：为解除乙酰羟基酸合酶（AHAS）所受的 L- 异亮氨酸产物抑制，以提高 L-异亮氨酸的产量，本研究对该酶的反馈抑制解除机制进行了探索。通过结构预测、分子对接和保守性分析的生物信息学方法，获得可能解除产物抑制效应的 AHAS 关键残基位点；进一步结合虚拟饱和突变、酶学性质测定，筛选获得了解除反馈抑制的最优突变体 $AHAS^{R175L}$，其比酶活较野生型 AHAS 提高了 40%。随后通过过表达 $AHAS^{R175L}$ 编码基因 $ilvBN^{R175L}$ 和关键酶基因 *ilvA*，构建得到工程菌株 Cg.ILE 5-1。在 5 L 发酵罐中，该菌株 L-异亮氨酸积累量达到 27.84 $g \cdot L^{-1}$，产量较摇瓶水平提升 300%。研究结果表明，半理性改造得到的 $AHAS^{R175L}$ 能够有效解除其产物抑制，显著提升 L-异亮氨酸合成能力。该研究结果为支链氨基酸的生物合成提供了一定的理论基础。

关键词：乙酰羟基酸合酶；反馈抑制；谷氨酸棒状杆菌；L-异亮氨酸；代谢工程策略

文章编号：1673-9078(2026)10-47-58 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1165

Semi-rational Design, Modification, and Preliminary Application of Acetohydroxyacid Synthase

WU Lin, HOU Xinyi, OUYANG Zhilin, ZHANG Xinyu, ZHENG Suiping*

(School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To eliminate the feedback inhibition of acetohydroxyacid synthase (AHAS) by L-isoleucine and thereby improve L-isoleucine production, the mechanism by which feedback inhibition in AHAS is relieved was investigated. By adopting bioinformatic approaches, including structure prediction, molecular docking, and conservation analysis, key residue sites potentially involved in relieving product inhibition were identified. Virtual saturation mutagenesis and enzymological characterization were further used to select an optimal mutant, $AHAS^{R175L}$, which exhibited a 40% increase in specific activity compared to the wild-type enzyme. Subsequently, the engineered strain Cg.ILE-5-1 was constructed, which overexpressed the $AHAS^{R175L}$ coding gene $ilvBN^{R175L}$ and the key enzyme gene *ilvA*. In a 5 L fermenter, this strain accumulated 27.84 $g \cdot L^{-1}$ of L-isoleucine, representing a 300% increase over shake-flask cultivation. The results demonstrate that the semi-rational engineering of $AHAS^{R175L}$ effectively alleviated product inhibition and significantly enhanced L-isoleucine biosynthesis. This study provides a theoretical foundation for the biosynthesis of branched-chain amino acids.

Key words: acetohydroxyacid synthase; feedback inhibition; *Corynebacterium glutamicum*; L-isoleucine; metabolic engineering strategies

引文格式：

吴琳,侯欣怡,欧阳智林,等.乙酰羟基酸合酶的半理性设计、改造和初步应用[J].现代食品科技,2026,42(10):47-58.

WU Lin, HOU Xinyi, OUYANG Zhilin, et al. Semi-rational design, modification, and preliminary application of acetohydroxyacid synthase [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 47-58.

收稿日期：2025-08-15；修回日期：2025-09-23；接受日期：2025-09-26

基金项目：广东省重点领域研发项目（2024B1111150001）

作者简介：吴琳（2000-），女，硕士研究生，研究方向：谷氨酸棒状杆菌代谢工程，E-mail：1016334715@qq.com

通讯作者：郑穗平（1972-），男，博士，教授，研究方向：发酵工程、生物化工、微生物学、生化与分子生物学，E-mail：spzheng@scut.edu.cn

L-异亮氨酸，作为人体必需的8种氨基酸之一，在人体生命活动中发挥着不可或缺的作用。随着合成生物学的发展，L-异亮氨酸可以在大肠杆菌（*Escherichia coli*）和谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）中通过微生物发酵法合成[1-5]。微生物发酵法原料成本低，反应条件温和，对环境友好、且容易实现大规模生产，这些技术经济性优势使其在工业化生产中展现出强大的竞争力[6]。

谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌中L-异亮氨酸合成途径的酶及其编码基因表现出显著的多样性，如图1所示。乙酰羟基酸合酶AHAS（Acetohydroxyacid Synthase）作为支链氨基酸（BCAAs）生物合成网络中的核心限速酶，具备双功能催化活性：其一介导两分子丙酮酸脱羧形成2-乙酰乳酸；其二则催化*α*-氧代丁酸与丙酮酸缩合，产生2-乙酰基-2-羟基丁酸。这两种反应分别决定了三种支链氨基酸合成的相对碳代谢流分配。大肠杆菌表达三种AHAS同工酶，分别为AHAS I、AHAS II和AHAS III，其编码基因依次为*ilvBN*、*ilvGM*和*ilvIH*。这三种酶竞争共同底物丙酮酸。而在谷氨酸棒状杆菌中，仅发现一种乙酰羟基酸合酶AHASI，该酶的编码基因为*ilvB*和*ilvN*，这两个编码单元与另一个基因*ilvC*共同位于染色体上，构成*ilvBNC*操纵子[7]，其表达受到三种支链氨基酸的衰减调控[8]。虽然目前大多数研究集中在大肠杆菌底盘细胞上，但谷氨酸棒状杆菌作为微生物发酵合成L-异亮氨酸的底盘菌株更显天然优势。近些年来改造谷氨酸棒杆菌以生产L-异亮氨酸的案例研究成果斐然。朱福周等[9]在*Corynebacterium glutamicum* YI中过表达*pyc*，进而提高草酰乙酸表达量，使得L-异亮氨酸产量比出发菌株提高11.7%，达到24.8 g·L^{-1}。Yin等[10,11]在*Corynebacterium glutamicum* JHI3-156中过量表达TD^{F383A}、AHAS$^{P176S\text{-}D426E\text{-}L575W}$使得L-异亮氨酸产量由24.3 g·L^{-1}提高至30.7 g·L^{-1}。然而，以上研究的关键酶AHAS的产物抑制效应限制了L-异亮氨酸产量的进一步提升[12]。

该研究以谷氨酸棒状杆菌ATCC 14067为底盘菌株，为发挥谷氨酸棒状杆菌的天然优势，针对解除L-异亮氨酸合成途径的限速酶——乙酰羟基酸合酶AHAS的产物抑制效应进行研究。首先，通过一系列生物信息学手段，筛选得到解除L-异亮氨酸反馈抑制的最优突变体AHAS^{R175L}。在此基础上，通过在出发菌株Cg.ILE-3-4中上调其编码基因*ilvBN*^{R157L}和关键酶编码基因*ilvA*，获得菌株Cg.ILE 5-1。在5 L发酵罐中通过分批补料发酵，L-异亮氨酸的产量达27.84 g·L^{-1}，时空转化率为0.464 g·L^{-1}·h^{-1}，相比于摇瓶发酵条件下L-异亮氨酸的产量提高了300%。糖酸转化率$Y_{P/S}$为40.94%。该研究基本接近国内报道的利用谷氨酸棒状杆菌合成L-异亮氨酸的最高滴度水平（32 g·L^{-1}）[13,14]，且糖酸转化率较其提高了14%，其中对于乙酰羟基酸合酶的半理性设计和改造可为支链氨基酸的生物合成提供关键酶学基础，并有效推动其高效合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒与引物

本研究所用菌株和主要质粒见表1。

1.1.2 培养基

LB培养基（g·L^{-1}）：酵母粉5，蛋白胨10，氯化钠10，当配制固体培养基时，固体培养基中加入琼脂20。

BHISG培养基（g·L^{-1}）：脑心浸液37，山梨醇9.1，葡萄糖10，当配制固体培养基时，固体培养基中加入琼脂20。

LBHIS培养基（g·L^{-1}）：山梨醇91，酵母粉2.5，脑心浸液18.5，蛋白胨5，氯化钠5，固体恢复培养基中加入琼脂20。

谷氨酸棒状杆菌感受态培养基：脑心浸液37 g·L^{-1}，葡萄糖10 g·L^{-1}，山梨醇9.1 g·L^{-1}，甘氨酸4 g·L^{-1}，在进行转接操作时，需预先准备并分别过滤除菌的吐温80母液（体积分数为10%）及异烟肼母液（质量分数为20%）。以确保最终体系中异烟肼的质量浓度达到20 g·L^{-1}，同时吐温80的体积浓度维持在1 mL·L^{-1}。

二级摇瓶种子培养基：葡萄糖30 g·L^{-1}；玉米浆50 g·L^{-1}；磷酸二氢钾0.5 g·L^{-1}；酵母5 g·L^{-1}；碳酸30 g·L^{-1}；尿素1 g·L^{-1}；硫酸铵5 g·L^{-1}；磷酸氢二钾1.5 g·L^{-1}；七水硫酸镁0.5 g·L^{-1}；生物素50 μg·L^{-1}。

发酵培养基：葡萄糖120 g·L^{-1}；玉米浆40 g·L^{-1}；磷酸二氢钾1.5 g·L^{-1}；酵母粉3 g·L^{-1}；碳酸钙30 g·L^{-1}；尿素1 g·L^{-1}；硫酸铵35 g·L^{-1}；七水硫酸镁0.5 g·L^{-1}；生物素50 μg·L^{-1}；硫胺素1 mg·L^{-1}。

发酵培养基II（g·L^{-1}）：3-（N-吗啡啉）丙磺酸42；磷酸二氢钾0.7；碳酸钙30；蛋白胨10；硫酸镁0.5；葡萄糖80，尿素7.5，其中葡萄糖、碳酸钙需分别进行灭菌处理，而尿素则需通过过滤的方式来实现除菌。

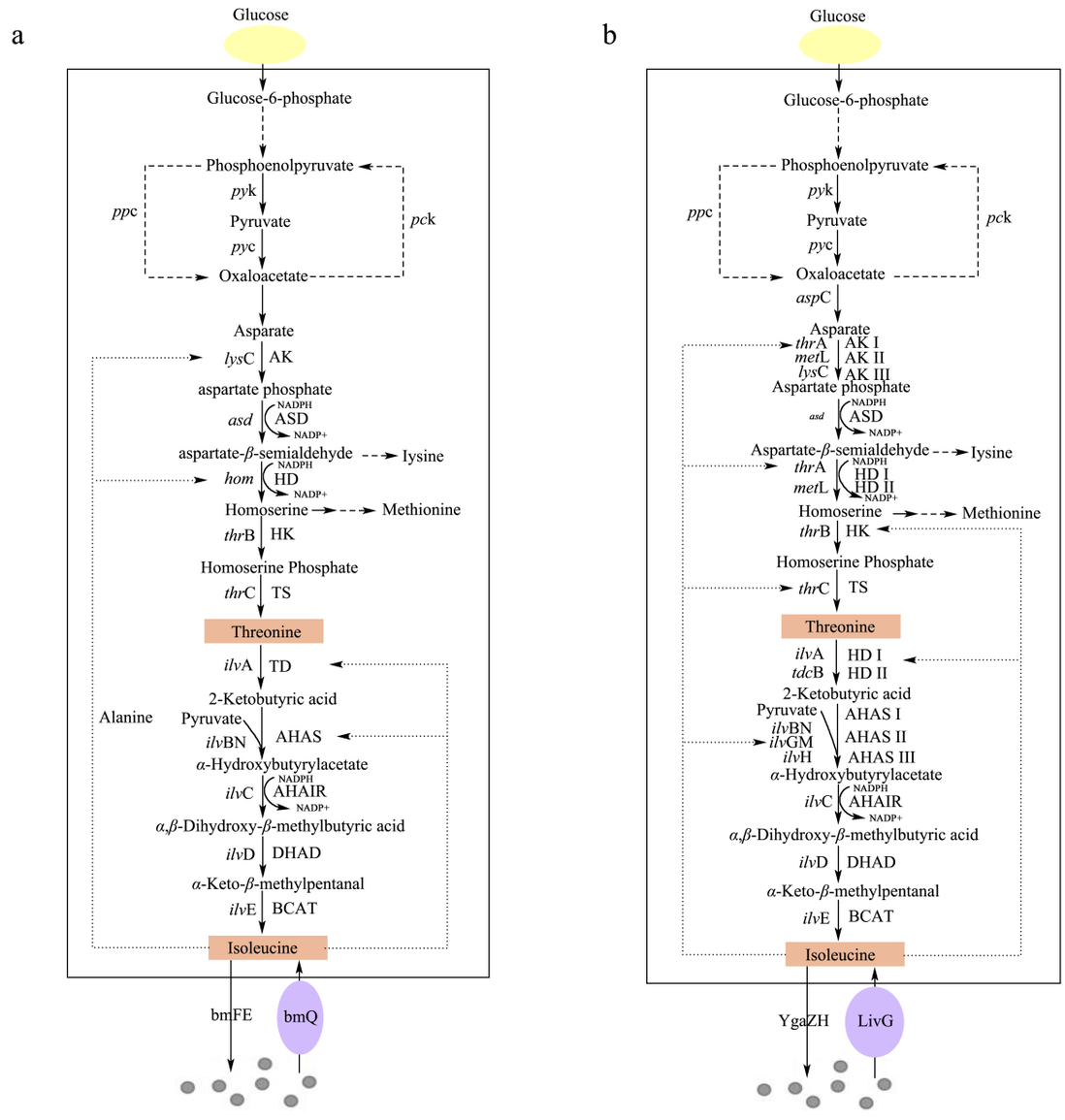


图 1 L-异亮氨酸的合成途径和代谢调控

Fig.1 Biosynthetic pathway and metabolic regulation of L-isoleucine

注：a：谷氨酸棒状杆菌的 L-异亮氨酸的合成途径和代谢调控；b：大肠杆菌的 L-异亮氨酸的合成途径和代谢调控绿色虚线和红色短划线分别表示反馈阻遏和反馈抑制。

分批补料上罐发酵培养基：葡萄糖 80 g·L^{-1}；玉米浆 40 g·L^{-1}；磷酸二氢钾 1.5 g·L^{-1}；酵母粉 3 g·L^{-1}；碳酸钙 30 g·L^{-1}；尿素 1 g·L^{-1}；硫酸铵 35 g·L^{-1}；七水硫酸镁 0.5 g·L^{-1}；生物素 50 μg·L^{-1}；硫胺素 1 mg·L^{-1}。

1.1.3 主要试剂

脑心浸液，美国 BD 公司；山梨醇、琼脂粉，北京博奥拓达科技有限公司；磷酸氢二钾、尿素、七水硫酸镁、碳酸钙、葡萄糖，天津大茂化学试剂厂；硫酸铵，美国 Sigma 公司；磷酸二氢钾、生物素、玉米浆，阿拉丁（上海）生化科技股份有限公司；硫胺素，美国 Sigma 公司；3-(N-吗啡啉）丙磺酸（MOPS），上海麦克林有限公司；5000 DNA Marker，广州东盛生物科技有限公司；5000 DNA Marker（不显示 1 500 bp），广州欣凯莱生物技术有限公司；2×KOD FX，东洋纺生物科技公司；2×Utaq PCR Mix，北京庄盟国际生物公司；质粒小量提取试剂盒，北京天根科技有限公司；PCR 产物微量回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒，广州美基生物公司；其余试剂，购置国产分析纯试剂。

表 1 本研究所用菌株与主要质粒

Table 1 Strains and main plasmid used in this study

	菌株 / 质粒	注释
菌株	*E. coli* TOP 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15Δ lacX74 recA1 araΔ139Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR)endA1 nupG- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15Δ lacX74 recA1 araΔ139Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR)endA1 nupG
	E.coli BL21	*E.coli* B F- dcm omp T hsdS(rB- mB-) gal [malB+]K-12(λS)
	Cg.ATCC 14067	Corynebacterium glutamicum ATCC 14067
	Cg.ILE 3-4	Kmr，Cg.ILE 1-6/Peftu-ZK-Lrp-brnFE，菌株 Cg.ILE 1-6 中过表达质粒 Peftu-ZK-Lrp-brnFE
	Cg.ILE 4-1	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L}
	Cg.ILE 4-2	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*
	Cg.ILE 4-3	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{S115W}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{S115W}
	Cg.ILE 4-4	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{K149F}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{K149F}
	Cg.ILE 4-5	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{K149W}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{K149W}
	Cg.ILE 4-6	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175V}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175V}
	Cg.ILE 4-7	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G177E}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G177E}
	Cg.ILE 4-8	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G177Q}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G177Q}
	Cg.ILE 4-9	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{D326R}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{D326R}
	Cg.ILE 4-10	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{A328E}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{A328E}
	Cg.ILE 4-11	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{A328Q}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{A328Q}
	Cg.ILE 4-12	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G329F}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G329F}
	Cg.ILE 4-13	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G329H}，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{G329H}
	Cg.ILE 5-1	Tet^r，Cg.ILE 3-4/pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L}-*ilvA*，菌株 Cg.ILE 3-4 中过表达质粒 /pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L}-*ilvA*
质粒	PET-28a-his-PAR	Kmr，PET-28a 的衍生质粒，是构建 PET28a-*ilvBN* 的载体
	PET28a-*ilvBN*	Kmr，PET-28a-his-PAR 的衍生质粒，用于谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 野生型 *ilvBN* 基因的表达、纯化
	PET28a-*ilvBN*^{R175L}	Kmr，PET28a-*ilvBN* 的衍生质粒，用于突变体 *ilvBN*^{R175L} 的表达、纯化
	pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L}	Tet^r，组成型强启动子 *sod* 表达 AHAS^{R175L}
	pEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{R175L}-*ilvA*	Tet^r，组成型强启动子 *sod* 表达 AHAS^{R175L} 和 TD

1.1.4 主要仪器与设备

Tanon 1600 凝胶成像分析系统，上海天能科技有限公司；ZQZY-CF8V 和 ZQZY-88AH 震荡培养箱，上海知楚仪器有限公司；GET3X-A 三槽独立 PCR 扩增仪，美国 Bio-Rad 公司；、Gene Pulser 399 经济款电穿孔仪，威尼德生物科技（北京）有限公司；GR85DA 立式自动蒸汽灭菌锅，厦门致微仪器有限公司；SW-CJ-1F 超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；DYY-6C 核酸电泳仪，北京六一生物科技有限公司；SPX-300 生化培养箱，浙江托普云农科技股份有限公司；DNP-9082 型电热恒温培养箱，广东环凯微生物科技有限公司；DK-8D 电热恒温水槽，上海精宏实验设备有限公司；UV-5120 型紫外可见分光光度计，上海尤尼柯仪器有限公司；5804R 高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；Waters 2695 HPLC 系统，美国 Waters 公司；ctP-B2002 电子天平，华志（福建）电子科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 AHAS蛋白结构的获取

利用 alphafold3 网络服务器（https://alphafoldserver.com/）生成 AHAS 的蛋白结构模型。

1.2.2 AHAS与BCAAs分子对接

利用 Autodock Vina 1.5.7 进行 AHAS 和 BCAAs 进行分子对接，首先准备蛋白受体：将 AHAS 的 cif 格式转换为 pdb 格式，经 AutoDockTools 加氢、计算电荷后保存为 pdbqt 格式。随后准备配体小分子：从 PubChem 获取 L-异亮氨酸、L-亮氨酸和 L-缬氨酸的 3D 结构，转换为 pdb 格式后加氢、计算电荷，并定义可旋转键，保存为 pdbqt 格式。接着设置对接参数：在蛋白活性位点设置格点盒子，确保完全包裹结合口

袋。最后执行对接：生成配置文件后运行 AutoDock Vina，获得包含结合构象和亲和力的 pdbqt 结果文件。该流程完成了三种氨基酸与 AHAS 的分子对接分析。

1.2.3 AHAS保守性分析

利用 SnapeGene 软件的比对功能执行多序列比对，WebLogo 网站（https://weblogo.berkeley.edu/）用于分析氨基酸的保守性。

1.2.4 虚拟饱和突变

Mutation energy 值利用 Discovery Studio 2018 计算，虚拟饱和突变步骤如下：首先对 AHAS 与 L-异亮氨酸的对接复合物进行结构预处理，去除结晶水分子、添加氢原子，并采用 CHARMm Polar H 力场进行能量最小化优化，获得稳定三维结构。随后在 Calculate Mutation Energy 协议中设置饱和突变参数：选择 AHAS 调节亚基（*ilvN*）的 26~33、67~74 区域和催化亚基（*ilvB*）的 107~116、146~151、169~179 及特定位点，将所有目标残基突变为除特殊残基外的 19 种标准氨基酸。运行计算后，通过 Mutation Energy Terms 表格分析突变能，按能量值排序并依据 Effect 评估（稳定化 / 不稳定化 / 中性）进行分类。最终筛选获得具有不稳定化效应（Destabilizing）的突变体用于后续研究。

1.2.5 AHAS突变体表达载体的构建

以 *C. glutamicum* ATCC 14067 基因组 DNA 为模板，利用引物 pET-28a-*ilvBN*-S/pET-28a-*ilvBN*-A 扩增得到 2 410 bp 野生型目的基因 *ilvBN*，以 pET-28a-*his*-PAR 为模板，利用引物 pET-28a-S/pET-28a-A 扩增得到 5 349 bp 的载体片段，然后分别将二个片段进行胶回收、同源重组，随后将同源重组产物转化至大肠杆菌感受态细胞中。转化后的菌株利用鉴定引物 pET-28a-*ilvBN*-mut-JD-S/pET-28a-*ilvBN*-mut-JD-A 进行 PCR 鉴定并完成质粒的提取，测序成功后获得质粒 pET-28a-*ilvBN*。以 pET-28a-*ilvBN* 为模板，利用引物 pET-MUT-S/*ilvBN*（S115W）-A 和 *ilvBN*（S115W）-S/pET-MUT-A 扩增分别得到 4 035 bp、3 717 bp 的片段载体，然后分别将二个片段进行胶回收、同源重组，随后将同源重组产物转化至大肠杆菌感受态细胞中。转化后的菌株利用鉴定引物 pET-28a-*ilvBN*-mut-JD-S/pET-28a-*ilvBN*-mut-JD-A 进行 PCR 鉴定并完成质粒的提取，测序成功后获得质粒 pET-28a-*ilvBN*^{S115W}。以此方法，获得其余 11 个单点突变 AHAS 突变体 pET-28a-*ilvBN*^{K149F}、pET-28a-*ilvBN*^{K149W}、pET-28a-*ilvBN*^{R175L}、pET-28a-*ilvBN*^{R175V}、pET-28a-*ilvBN*^{G177E}、pET-28a-*ilvBN*^{G177Q}、pET-28a-*ilvBN*D^{326R}、pET-28a-*ilvBN*^{A328E}、pET-28a-*ilvBN*A^{328Q}、pET-28a-*ilvBN*^{G329F}、pET-28a-*ilvBN*^{G329H}。

1.2.6 AHAS表达、破碎和纯化

将已成功构建的重组质粒导入至 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞内，随后置于 37 ℃恒温培养箱中培养 12~16 h。从培养后的平板中挑取阳性转化克隆，接种于含 200 μg·mL^{-1} 大观霉素的 LB 液体培养基中，于 37 ℃、250 r·min^{-1} 恒温摇床中振荡培养过夜。以初始 OD_{600} 为 0.1 的接种比例，将上述活化的菌液转接至装有 100 mL TB 培养基的 500 mL 锥形瓶中，在 37 ℃、250 r·min^{-1} 条件下继续振荡培养。当菌液 OD_{600} 达到约 0.6 时，向培养体系中加入终浓度为 0.5 mmol·L^{-1} 的 IPTG，随后将培养温度降至 16 ℃，诱导目标蛋白过夜表达。诱导结束后，收集沉淀的菌体。充分洗涤菌体并去除杂质。利用超声波细胞破碎仪进行破碎处理。超声波功率设定为 300 W，采用超声 3 s、间隔 3 s 的脉冲模式，持续破碎 45 min。破碎完成后，将菌液于 4 ℃、10 000 r·min^{-1} 条件下离心 30 min，取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤，以去除未破碎的细胞碎片及大分子杂质，获得澄清的目标蛋白溶液。将破碎、过滤后的上清液用 Hypur T Ni-IDA 6FF（His-Tag）预装重力柱进行亲和层析。

1.2.7 AHAS蛋白的SDS-PAGE分析

将 20 μL 酶溶液移入 1.5 mL 离心管，添加 5 μL 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，充分混合。随后，于沸水浴中处理 5 min。吸取 10 μL 上述处理液，注入市售聚丙烯酰胺凝胶加样孔内。在 1×SDS-PAGE 电泳缓冲液体系中，设定电压为 120 V，持续电泳 30 min 至终止。从电泳装置中取出含蛋白的凝胶，浸没于考马斯亮蓝染液。使用微波设备，染色 5 min。弃去染液后，用去离子水洗涤凝胶。加入脱色液，再以高功率微波处理进行脱色。该过程需重复更换脱色液 3~5 次，直至背景清晰。

1.2.8 AHAS酶活分析

AHAS 能够催化两分子丙酮酸生成乙酰乳酸，在高温条件下，乙酰乳酸进一步脱羧生成乙偶姻。乙偶姻可与肌酸和 α-萘酚的混合物反应，生成红色衍生物，随后使用酶标仪定量红色衍生物。乙酰羟基酸合酶酶活性测定参照[15,16]并稍做改动。酶活单位定义为：每毫克酶蛋白每分钟生成乙偶姻的 μmol 数，酶学反应产生的乙偶姻由标样定量。乙酰羟基酸合酶对支链氨基酸的耐受测定参照[15,16]并稍做改动。在 AHAS 酶活测定反应缓冲液中分别加入 L-异亮氨酸、L-亮氨酸和 L-缬氨酸，使其终浓度分别为 2、4、6、8、10、20、50、100、120、150、200 mmol·L^{-1}，测定每个浓度下 AHAS 的酶活力。相对酶活是指在特定条件下测定的

酶活力与初始酶活力之比。

1.2.9 过表达*ilvBN*和*ilvA*基因相关质粒的构建

以 pJYS2-*ilvBN* 为模板，利用引物 P*sod*T18-*ilvBN*-S/P*sod*T18-*ilvBN*-A 扩增得到 2 413 bp 目的基因 *ilvBN*，以 P*sod*-T18-mob2-MetY 为模板，利用引物 P*sod*T18-*ilvBN*-KJ-S/P*sod*T18-*ilvBN*-KJ-A 扩增得到 6 485 bp的载体片段，然后分别将二个片段进行胶回收、同源重组，取 5 μL 重组体系转化入 *E.coli* Top10 的感受态中，涂板于含有 50 μg·mL^{-1} 四环素的 LB 固体培养基上 37 ℃过夜培养，利用鉴定 T18-*ilvBN*-JD-S/T18-*ilvBN*-JD-A PCR 鉴定出正确的条带 4 983 bp 及测序后获得质粒 pEC-T18-P*sod*-*ilvBN*。以 pJYS2-*ilvBN* 为模板，利用引物 T18-*ilvBN*-S/T18-*ilvBN*-A 和突变引物进行扩增，然后分别将二个片段进行胶回收、同源重组，取 5 μL 重组体系转化入 *E.coli* Top10 的感受态中，涂板于含有 50 μg·mL^{-1} 四环素的 LB 固体培养基上 37 ℃过夜培养，平板送至广州市有康生物科技有限公司进行测序鉴定后获得质粒 PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{S115W}。以此方法，获得 PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{K149F}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{K149W}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{R175L}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{R175V}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{G177E}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{G177Q}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*D^{326R}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{A328E}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*A^{328Q}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{G329F}、PEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{G329H}。以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 基因组 DNA 为模板，利用引物 T18-*ilvA*-S/T18-*ilvA*-A 扩增得到 1 395 bp 目的基因 *ilvA*，以 pEC-T18-P*sod*-*ilvBN* 为模板，利用引物 T18-*ilvABN*-S/T18-*ilvABN*-A 扩增得到 8 898 bp 的载体片段，然后分别将二个片段进行胶回收、同源重组，取 5 μL 重组体系转化入 *E.coli* Top10 的感受态中，涂板于含有 50 μg·mL^{-1} 四环素的 LB 固体培养基上 37 ℃过夜培养。利用鉴定引物 T18-*ilvABN*-JD-S/T18-*ilvABN*-JD-A PCR 鉴定出正确的条带 5 020 bp 及测序后获得质粒 pEC-T18-P*sod*-*ilvBN* ^{S115W}-*ilvA*。

1.2.10 感受态制备及其转化

谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 感受态的制备及转化方法参照赵难难、黄园园[17,18]的方法。

1.2.11 摇瓶发酵

将正确的转化子接种于含适当的抗生素的 5 mL BHISG 培养基的 50 mL 三角瓶中，30 ℃、250 r·min^{-1} 过夜培养后转接种 2 mL 至含 30 mL 二级摇瓶种子培养基的 500 mL 三角瓶中，培养 24 h 后转接 5 mL 至含 30 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中摇瓶培养 72 h。

1.2.12 菌体生长测定

为避免培养基中碳酸钙的干扰，发酵液用 1 mol·L^{-1} 盐酸水溶液稀释适当倍数，测定 600 nm 波长下的 OD 值，使其数值在 0.2~0.8 之间。

1.2.13 分批补料发酵培养的条件

平板划线分离培养 48 h 后，挑选单克隆接种于装液量 10%（体积分数）的 250 mL 锥形瓶中，200 r·min^{-1} 30 ℃培养 24 h，按照 5%（体积分数）接种量接种于装液量 10%（体积分数）的 500 mL 锥形瓶中，200 r·min^{-1} 30 ℃培养 24 h，按照 5%（体积分数）接种量接种接种于装液量 3 L 的 5 L 发酵罐中。初始转速为 400 r·min^{-1} 及通风量为 1 vvm，培养 24 h 后，增大通风量至 2 vvm，转速调整为 600 r·min^{-1}，36 h 补入 200 mL 500 g·L^{-1} 的葡萄糖。

1.2.14 氨基酸含量的测定

L-异亮氨酸含量采用高效液相分析系统测定，色谱柱为 Gemini NX C18（5 μm×250 mm），乙腈水溶液与乙酸钠缓冲溶液进行梯度洗脱，洗脱条件参考王平[19]的方法，流动相流量 1 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃，紫外检测波长为 360 nm。

1.2.15 数据分析

数据处理分析和图表绘制主要通过 Excel 2013、OriginPro 2025、GraphPad Prism 9，每组样品设 3 次平行，± 用来表示数据的误差范围。显著性分析采用单因素方差分析，不显著：ns，*P＜0.05，**P＜0.01，***P＜0.001，误差条代表平均值 ± 标准差。

1.2.16 分子动力学模拟

分子动力学模拟使用 Gromacs 2023 软件包完成，AHAS 及 AHAS^{R175L} 突变体中蛋白残基的参数均采用 CHARMM36–jul2022.ff 力场描述。复合物置于充满 TIP3P 水分子的十二面体盒子中进行溶剂化，盒子边界距离蛋白质表面 10 Å，并通过添加钠离子使体系达到电中性。能量最小化采用最陡下降法执行 1 500 步，过程中通过“gmx genrestr”功能限制所有蛋白－配体原子的位置。能量最小化后，体系在 NVT 系综下经过 300 ps 升温至 313 K，再在 NPT 系综（313 K，1.0 atm）下进行 2 ns 的密度平衡。最后，进行三次无约束的生产性 MD 模拟，每次时长 250 ns。模拟中积分步长为 2 fs，CHARMM36 力场的其余参数设置遵循 GROMACS 2023.3 文档的默认推荐。涉及氢原子的共价键约束通过 SHAKE 算法处理，长程静电相互作用则采用 PME 方法）计算。

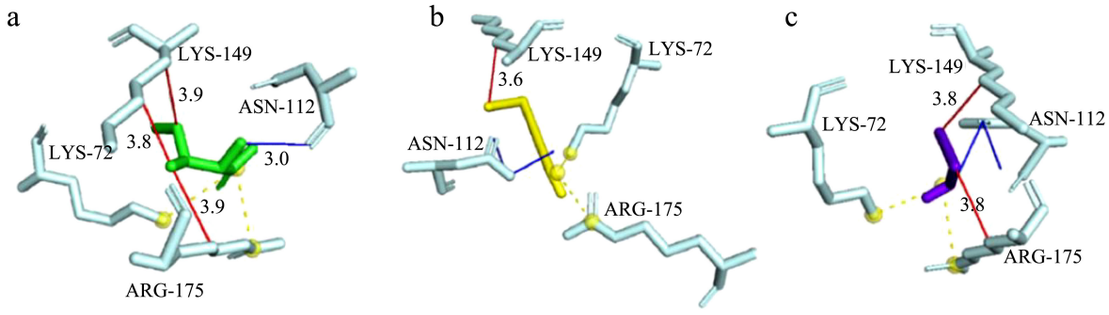


图 2 BCAAs 与 AHAS 的分子对接结果

Fig.2 Molecular docking results for the optimal conformations of BCAAs and AHAS

注：a：L-ILE，b：L-Leu，c：Val。蓝色实线为氢键；黄色虚线为盐桥；红色实线为疏水相互作用。

2 结果与分析

2.1 AHAS分子对接结果

AHAS 是三种支链氨基酸合成途径的共用关键限速酶，不同的支链氨基酸对其均有不同程度的反馈抑制作用。为了进一步明确 L-异亮氨酸和 AHAS 的作用位点，将 AHAS 与三种支链氨基酸（L-ILE、L-Leu、L-Val）进行分子对接，得到吉布斯自由能变化值分别为 −4.7、−4.6、−4.7 kcal·mol^{-1} 的最稳定的结合构象，并对其分别进行可视化分析（如图 2）。图 2a~2c 分别表明了三种支链氨基酸与 AHAS 之间形成的氢键、盐桥、疏水相互作用关系。根据对 L-异亮氨酸和其同类效应物 L-亮氨酸、L-缬氨酸与 AHAS 之间的作用力关系分析判断，最终获得可能解除 L-异亮氨酸对 AHAS 反馈抑制作用的结合位点有：Lys72、Asn112、Lys149、Arg175。

2.2 AHAS保守性分析

在生物学信息学中，保守性分析是一种通过比较不同物种或同一物种内不同成员的基因组、转录组或蛋白质序列，识别在进化中高度保守的氨基酸位点的方法。高度保守的氨基酸残基会介导变构信号传递，直接参与反馈抑制作用。樊占青等[20]通过保守性分析定位关键位点，结合定点突变技术成功获得解除反馈抑制的突变株 CpAK$^{T379N/A380C/G171I/S227D}$。为了拓展获得潜在的解除反馈抑制的调控区域，对 2.1 中结合位点（Lys72、Asn112、Lys149、Arg175）氨基酸残基 5Å 附近的位点与在 NCBI 数据库（National Center for Biotechnology Information）以 Cg.14067-*ilvB* 和 Cg.14067-*ilvN* 为探针 Blast 到的各 1 000 条 *ilvB* 和 *ilvN* 序列进行保守性分析。保守性阈值的选择直接影响定向突变后的酶蛋白功能，保守性得分大于 0.8 的位点通常是变构配体的结合残基及变构信号传导残基，对解除反馈抑制作用至关重要[21]。因此，择取保守性分析后得到的保守性得分大于 0.8 的位点，这些位点可分为两个区域：AHAS 调节亚基 *ilvN*：26-33、67-74；AHAS 催化亚基 *ilvB*：107~116、146~151、169~179、205、207、239、302、325、326、328、329、332，推测这两个区域的位点是解除 BCAAs 的反馈抑制作用的关键位点（图 3）。

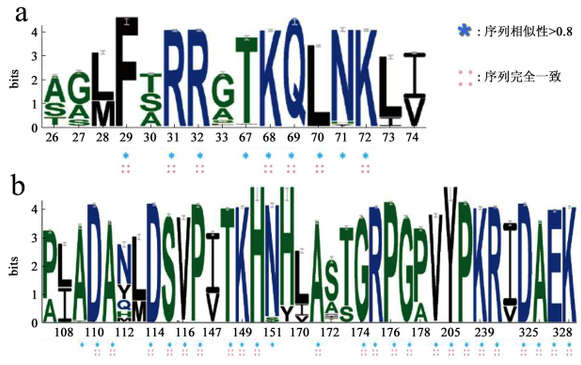


图 3 *ilvB* 和 *ilvN* 的保守性分析

Fig.3 Conservation analysis of *ilvB* and *ilvN*

注：（a）*ilvN* 的保守性分析；（b）*ilvB* 的保守性分析。

2.3 AHAS虚拟饱和突变

为了精准定位 2.2 调控区域中对别构调控起作用的关键氨基酸、量化突变对反馈抑制效应的影响、从而筛选出合理的解除反馈作用的突变位点；将 2.2 中得到的两个区域的位点进行虚拟饱和突变，结果发现：区域一的 216 种突变对于亲和力均没有影响。区域二的 625 种突变中有 63 种突变的作用为不稳定，以上突变或通过降低 AHAS 对支链氨基酸 BCAAs 的亲和力以改善产物抑制。选择其中 12 个突变体进行后续定点突变实验（表 2），验证是否能解除反馈抑制，提高 L-异亮氨酸产量。

表 2 突变能量靠前的12种不同的AHAS突变体

Table 2 12 different AHAS mutants with high mutation energy

序号	mutation	mutation energy
1	WT	—
2	SER115 > TRP	1.81
3	LYS149 > TRP	2.09
4	LYS149 > PHE	1.59
5	ARG175 > LEU	2.11
6	ARG175 > VAL	1.73
7	GLY177 > GLN	11.55
8	GLY177 > GLU	10.37
9	ASP326 > ARG	0.58
10	ALA328 > GLN	0.86
11	ALA328 > GLU	0.7
12	GLU329 > PHE	2.03
13	GLU329 > *HIS*	1.66

2.4 AHAS突变体表达载体的构建与鉴定

利用 1.2.5 所述方法构建 AHAS 及其突变体的表达载体（图 4a），并对重组质粒进行鉴定，由图 4b 可知，将重组质粒 pET28a-*ilvBN* 经引物 pET-28a-*ilvBN*-mut-JD-S/pET-28a-*ilvBN*-mut-JD-A PCR 鉴定，在 2 500 bp 附近存在目的基因片段条带，测序鉴定正确。随后，按照表 2 所述，对质粒 pET-28a-*ilvBN* 进行点突变，成功构建质粒 pET-28a-*ilvBN*^{S115W}、pET-28a-*ilvBN*^{K149F}、pET-28a-*ilvBN*^{K149W}、pET-28a-*ilvBN*^{R175L}、pET-28a-*ilvBN*^{R175V}、pET-28a-*ilvBN*^{G177E}、pET-28a-*ilvBN*^{G177Q}、pET-28a-*ilvBN*^{D326R}、pET-28a-*ilvBN*^{A328E}、pET-28a-*ilvBN*^{A328Q}、pET-28a-*ilvBN*^{G329F}、pET-28a-*ilvBN*^{G329H}。

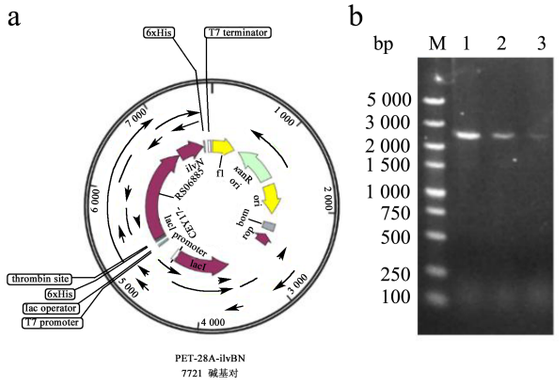


图 4 pET-28a-*ilvBN* 质粒结构及携带该质粒的重组菌株的 PCR 鉴定结果

Fig.4 Structure of pET-28a-*ilvBN* plasmid and PCR identification of recombinant strains carrying the plasmid

注：（a）重组质粒 pET-28a-*ilvBN* 图谱；（b）质粒 pET-28a-*ilvBN* 菌落 PCR 鉴定图。

2.5 AHAS的表达与纯化

将 2.4 中获得的突变体质粒快转到 *E.coli* BL21（DE3）中，并按照材料与方法所述进行蛋白表达。AHAS 蛋白在 70 kDa 以及 22 kDa 左右有两条蛋白条带，其分子量大小符合 AHAS 大小亚基理论值（66.8、18.7 kDa）。后续将所有的 12 个 AHAS 突变体均成功表达和纯化（图 5）。

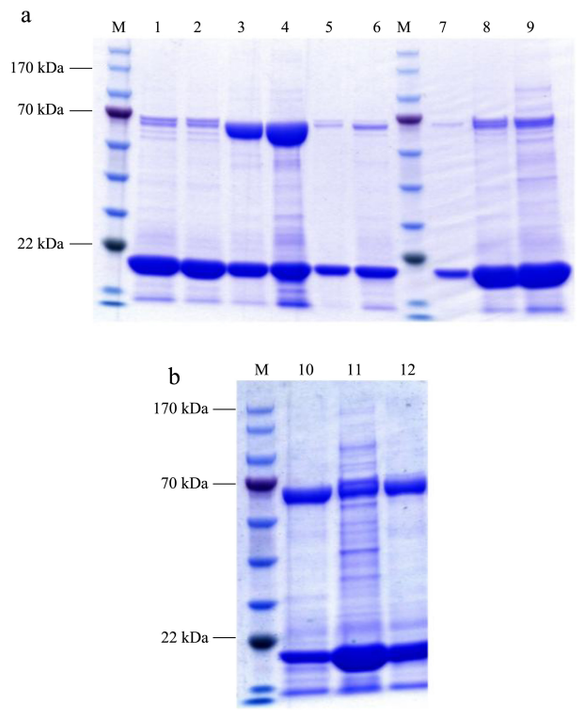


图 5 AHAS 的其他单点突变体 SDS-PAGE 电泳

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis of other single-point mutants of AHAS

注：（M）蛋白 marker；（1）PET28a-*ilvBN*^{S115W} 纯化的蛋白；（2）PET28a-*ilvBN*^{K149W} 纯化的蛋白；（3）PET28a-*ilvBN*^{A328Q} 纯化的蛋白；（4）PET28a-*ilvBN*^{A328E} 纯化的蛋白；（5）PET28a-*ilvBN*^{R175L} 纯化的蛋白；（6）PET28a-*ilvBN*^{D326R} 纯化的蛋白；（7）PET28a-*ilvBN*^{G329F} 纯化的蛋白液；（8）PET28a-*ilvBN*^{G177Q} 纯化的蛋白；（9）PET28a-*ilvBN*^{G177E} 纯化的蛋白；（10）PET28a-*ilvBN*^{K149F} 纯化的蛋白；（11）PET28a-*ilvBN*^{R175L} 纯化的蛋白；（12）PET28a-*ilvBN*^{G329H} 纯化的蛋白。

2.6 AHAS及其突变体的酶学性质分析

作为支链氨基酸生物合成途径中的关键酶，AHAS 的催化活性受到 BCAAs 的负反馈调控机制调节，这一过程在 L-异亮氨酸的生物合成中发挥重要作用。因此，以野生型 AHAS 为参照，对表 2 中的 12 种 AHAS 突变进行酶学性质研究，其突变位置如图 6 所示。

表 3 AHAS及其突变体特征分析

Table 3 Characterisation of AHAS variants and wild-type AHAS

酶	比酶活/(μmol·min^{-1}·mg^{-1})	IC_{50}(Val)/(mmol·L^{-1})	IC_{50}(Leu)/(mmol·L^{-1})	IC_{50}(Ile)/(mmol·L^{-1})
AHAS	0.90±0.01	4.57	4.9	6.17
AHAS^{S115W}	1.00±0.02	6.47	5.13	7.50
AHAS^{K149F}	0.60±0.01	4.54	3.92	6.05
AHAS^{K149W}	0.83±0.02	4.89	4.91	4.89
AHAS^{R175L}	1.26±0.01	83.3	>200	>200
AHAS^{R175V}	1.17±0.03	43.29	52.33	56.98
AHAS^{G177E}	0.99±0.04	5.53	6.221	5.12
AHAS^{G177Q}	0.71±0.01	5.36	4.70	5.78
AHAS^{D326R}	0.60±0.01	3.51	3.52	6.75
AHAS^{A328E}	0.86±0.01	6.0	5.75	6.46
AHAS^{A328Q}	0.74±0.01	7.43	5.59	5.10
AHAS^{G329F}	1.26±0.03	6.12	10.49	13.37
AHAS^{G329H}	1.60±0.02	8.12	9.23	9.03

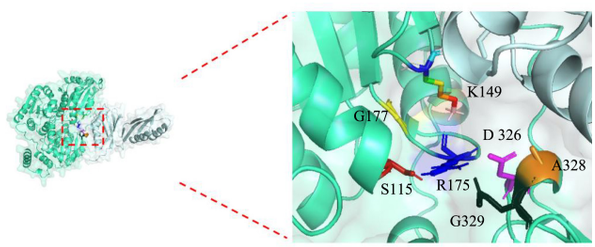


图 6 12 种突变体突变位点与 AHAS 结构示意图

Fig.6 Schematic representation of the mutation sites of the 12 mutants with the structure of Cg.AHAS

注：绿色为 *ilvB*，浅蓝色为 *ilvN*。

如表 3 所示，将野生型的 AHAS 进行定点突变后，在不添加抑制物的情况下，AHAS^{G177E}、AHAS^{S115W}、AHAS^{R175V}、AHAS^{R175L}、AHAS^{G329F}、AHAS^{G329H} 的比酶活较野生型有部分提高，分别提高了 10.0%、11.1%、30.0%、40.0%、70.3%、77.8%；随着三种支链氨基酸浓度的增加，AHAS 及其突变体的酶活均下降，其中，野生型 AHAS 分别在 L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸存在情况下，半抑制浓度分别为 4.57、4.9、6.17 mmol·L^{-1}。突变体中 AHAS^{S115W}、AHAS^{R175L}、AHAS^{R175V}、AHAS^{D326R}、AHAS^{A328E}、AHAS^{G329F}、AHAS^{G329H} 均可耐受更高比野生型更高浓度的 L-异亮氨酸。尤其是 AHAS^{R175L}，在 200 mmol·L^{-1} 高浓度的 L-异亮氨酸存在的条件下，相对酶活依然保持在 90% 以上，另外，在 200 mmol·L^{-1} L-亮氨酸存在的条件下，相对酶活依然保持在 80% 以上。突变体蛋白 AHAS^{R175L} 均解除了 L-异亮氨酸、L-亮氨酸的反馈抑制作用，且对 L-缬氨酸耐受的浓度提高至 83.3 mmol·L^{-1}。

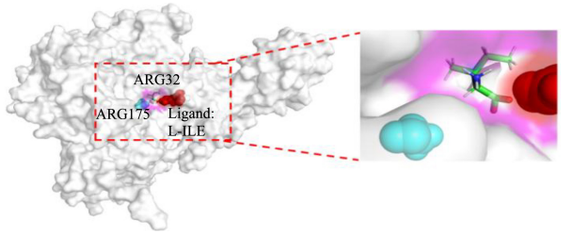


图 7 野生型 AHAS 中 L-异亮氨酸结合空腔

Fig.7 L-isoleucine-binding cavities in wild-type AHAS

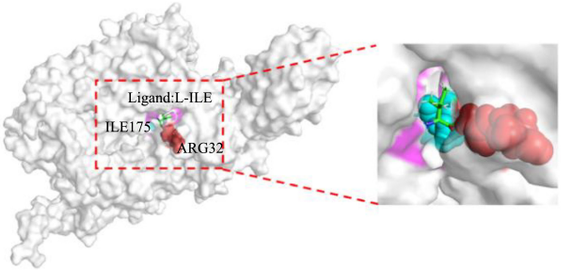


图 8 突变体 AHAS^{R175L} 中 L-异亮氨酸结合空腔

Fig.8 L-isoleucine-binding cavity in mutant AHAS^{R175L}

经过分子动力学模拟分析验证，突变体 AHAS^{R175L} 相较于野生型 AHAS 会减少 0.2 个氢键 / 帧的形成，氢键数量的减少导致抑制物 L-ILE 和突变体 AHAS^{R175L} 结合力显著降低，二者难以结合，不能使 AHAS 构象改变到抑制活性的状态，从而解除了反馈抑制。

另外，精氨酸的侧链含有胍基，具有较大的空间体积，在催化过程中会产生一定的空间位阻效应。而亮氨酸的侧链是异丁基，空间体积相对较小，175 号位点氨基酸由精氨酸到亮氨酸的突变，使得空间位阻效应变小，结合空腔变大。同时，每个精氨酸的胍基

可形成 5 条氢键（3 个 NH_2+2 个 NH），两个精氨酸之间通过水分子或极性基团就可间接形成氢键网络，而突变后，原 R175 和结合口袋内 AHAS 调节亚基 R32 胍基之间的氢键网络被打破，使得结合口袋体积也从 496.64 Å³ 扩大到 672.77 Å³（如图 7、8），导致别构效应的传递被阻断或减弱，而 AHAS 酶活性中心的构象基本保持不变，AHAS 依然能够维持较高的活性，达到解除反馈抑制的效果。综上所述，氢键数量减少和结合口袋变大使得突变体 $AHAS^{R175L}$ 的产物抑制效应得到解除。

2.7 谷氨酸棒状杆菌L-异亮氨酸合成途径的代谢工程改造

通过在出发菌株 Cg.ILE 3-4 中表达质粒 pEC-T18-P*sod*-*ilvBN*^{R175L}，构建可过量表达 *ilvBN*^{R175L} 基因的菌株 Cg.ILE 4-1。同时，为了对比 *ilvBN*^{R175L} 和 *ilvBN* 野生型及其他突变体对 L-异亮氨酸合成的影响，将野生型及其余 11 个突变质粒导入菌株 Cg.ILE 3-4 中，构建菌株 Cg.ILE 4-2 至 Cg.ILE 4-13。

摇瓶发酵 72 h 后，生物量和产酸情况如图 9a、9b 所示。菌株 Cg.ILE 4-1 至 Cg.ILE 4-13 的菌体生物量与野生型无异，表明过表达 *ilvBN* 相关基因后并未对菌体生长造成影响。L-异亮氨酸产量均高于出发菌株 Cg.ILE 3-4（4.29 g·L^{-1}），这说明 *ilvBN* 野生型和突变体的导入均能有效提高 L-异亮氨酸产量。其中产量高于导入野生型 *ilvBN*（Cg.ILE 4-2）的菌株有五株，分别是过表达 *ilvBN*^{R175L} 的 Cg.ILE 4-1、*ilvBN*^{S115W} 的 Cg.ILE 4-3、*ilvBN*^{R175V} 的 Cg.ILE 4-6、*ilvBN*^{G329F} 的 Cg.ILE 4-12、*ilvBN*^{G329H} 的 Cg.ILE 4-13，导入解除 L-异亮氨酸反馈抑制 *ilvBN*^{R175L} 的菌株 Cg.ILE 4-1 的 L-异亮氨酸积累量最高，为 6.6 g L^{-1}，较出发菌株 Cg.ILE 3-4（4.29 g·L^{-1}）提高了 35%。

由表 3 中数据，*ilvBN* 编码的系列蛋白 $AHAS^{S115W}$、$AHAS^{R175V}$、$AHAS^{G329F}$、$AHAS^{G329H}$ 比酶活和对 L-异亮氨酸的耐受浓度均高于野生型 AHAS，这可能是这 4 种突变体对应的构建菌株产量提高的重要原因。上述实验结果表明过表达 L-异亮氨酸合成途径的关键酶，尤其是过表达解除反馈抑制的关键酶能有效地提高靶标氨基酸的积累。

L-异亮氨酸的合成与其他支链氨基酸（L-缬氨酸、L-亮氨酸）共享部分代谢途径。*ilvA* 基因编码的苏氨酸脱氢酶催化 L-苏氨酸转化为 *α*-氧代丁酸，*α*-氧代丁酸是异亮氨酸的特异性前体，而缬氨酸和亮氨酸的合成前体为丙酮酸。通过强化 *ilvA* 表达，可特异性的促进 *α*-氧代丁酸的产生从而增加异亮氨酸合成。研究表明，若 *ilvA* 基因缺失或活性不足，异亮氨酸合成将被完全阻断，例如谷氨酸棒状杆菌 Δ*ilvA* 突变株无法自主合成异亮氨酸，必须依赖外源添加[22]，因此，强化 *ilvA* 表达或有望进一步促进 L-异亮氨酸的合成。

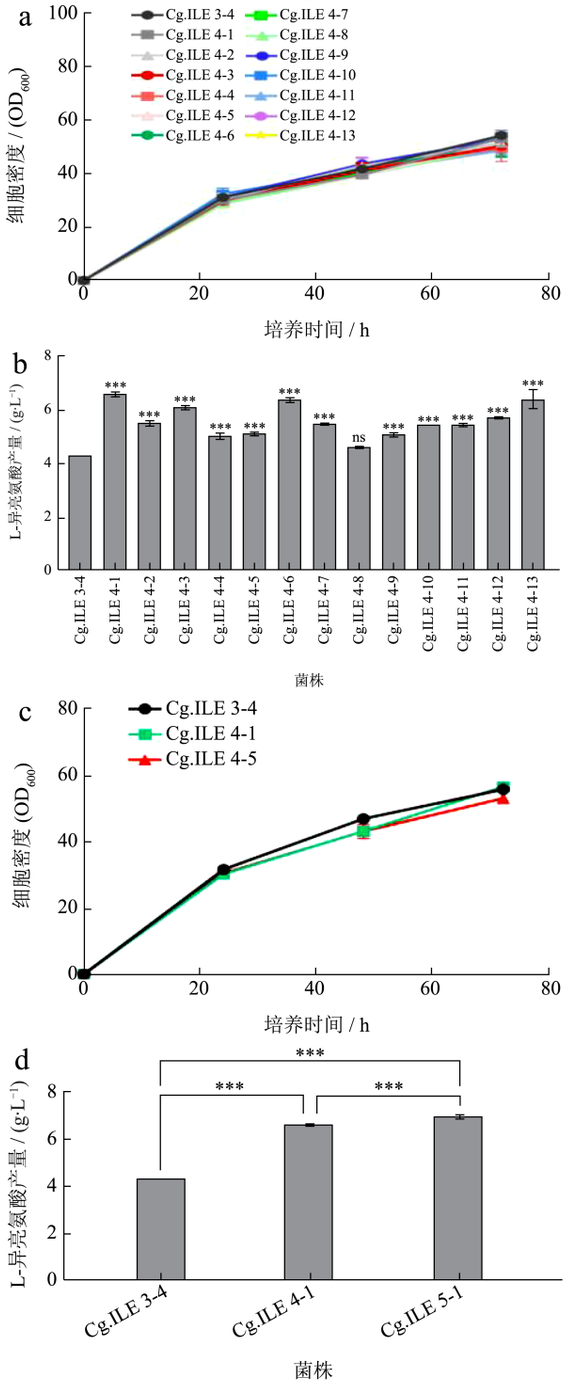


图 9 不同菌株的摇瓶发酵结果

Fig.9 Shake flask fermentation results of different strains

注：a、c：细胞生物量，b、d：L-异亮氨酸产量；显著性分析采用单因素方差分析，不显著：ns，***P＜0.001，误差条代表平均值 ± 标准差。

为强化 *ilvA* 表达，在质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L} 的基础上增加 *ilvA* 基因的拷贝数，构建质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{S175L}*-ilvA*，并转化入菌株 Cg.ILE 3-4 中，得到菌株 Cg.ILE 5-1，由图 9c、9d 可知，过量表达苏氨酸脱氢酶未对菌体生长造成影响（图 9c），与此同时，过量表达苏氨酸脱氢酶的菌株 Cg.ILE 5-1 的 L-异亮氨酸产量相比于 Cg.ILE 4-1 提高 5.3%，达到 6.95 g·L^{-1}（图 9d）。这表明苏氨酸脱氢酶的过量表达，使得 L-异亮氨酸合成的代谢流进一步增强，是提高支链氨基酸的产量的重要手段[23,24]。

2.8 菌株Cg.ILE 5-1的分批补料发酵

对经途径改造的重组菌株 Cg.ILE 5-1 进行 5 L 发酵罐的分批补料发酵，结果见图 10。发酵 12 h 菌株开始积累少量 L-异亮氨酸，60 h 后 L-异亮氨酸的产量可达 27.84 g·L^{-1}，时空转化率为 0.464 g·L^{-1}·h^{-1}，OD_{600} 达到 107 左右，相比于摇瓶发酵条件下 L-异亮氨酸的产量提高了 300%。糖酸转化率 $Y_{P/S}$ 为 40.94%。该研究基本接近国内报道的利用谷氨酸棒状杆菌合成 L-异亮氨酸的最高滴度水平（32 g·L^{-1}）[13,14]，且糖酸转化率较其提高了 14%。

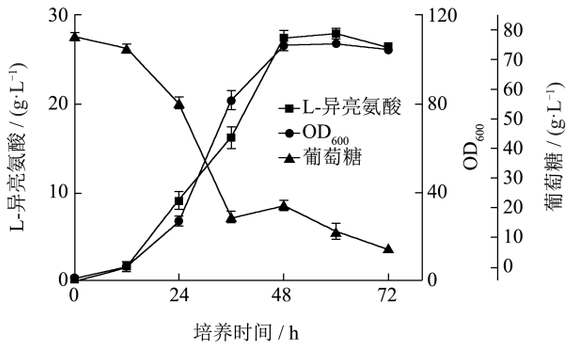


图 10 菌株 Cg.IE 5-1 的分批补料发酵

Fig.10 Fed-batch clutures of Cg.IE 5-1 strain using bench-scale bioreactors

3 结论

该研究对谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 来源的乙酰羟基酸合酶 AHAS 进行分析和改造，得到解除 L-异亮氨酸的反馈抑制作用突变体蛋白 AHAS^{R175L}。经过分子动力学模拟分析验证，氢键数量的减少和结合口袋的变大是 AHAS^{R175L} 解除反馈抑制的关键。过表达 AHAS^{R175L} 编码基因 *ilvBN*^{R175L} 于出发菌株 Cg.ILE 3-4，构建菌株 Cg.ILE 4-1。经摇瓶发酵 72 h 后，L-异亮氨酸积累量达到 6.6 g·L^{-1}。之后通过强化 *ilvA*，在菌株 Cg.ILE 3-4 中导入质粒 pEC-T18-P*sod-ilvBN*^{R175L}*-ilvA* 构建菌株 Cg.ILE 5-1，经 72 h 摇瓶发酵后，Cg.ILE 5-1 的 L- 异亮氨酸积累 6.95 g·L^{-1}，较出发菌 Cg.ILE 3-4（4.29 g·L^{-1}）提高 62%。将菌株 Cg.ILE 5-1 进行分批补料发酵培养，60 h 后，L- 异亮氨酸的产量增加至 27.84 g·L^{-1}，且糖酸转化率较其提高了 14%。该研究对乙酰羟基酸合酶的半理性设计和改造可为支链氨基酸的生物合成提供关键酶学基础，并有效推动其高效合成。

虽然该研究目前已实现 L-异亮氨酸的初步有效积累。但为进一步持续提升 L-异亮氨酸的合成效能，后续研究可基于合成生物学方法体系、整合代谢组学等[25-27]分析手段、引入精准调控元件，对基因调控网络的关键节点实施动态干预，从而构建生长速率与产物合成之间的协同平衡机制。

参考文献

[1] 林震,刘志远,张富洋,等.支链氨基酸与代谢性心血管疾病关系研究进展[J].空军军医大学学报,2025,46(2):266-272.

[2] SILVIA S, VIRGINIA A, AURORA T, et al. Deficiency in the essential amino acids L-isoleucine, L-leucine and L-histidine and clinical measures as predictors of moderate depression in elderly women: a discriminant analysis study [J]. Nutrients, 2021, 13(11): 3875.

[3] LI T, ZHAO L, LI Y, et al. PPM1K mediates metabolic disorder of branched-chain amino acid and regulates cerebral ischemia-reperfusion injury by activating ferroptosis in neurons [J]. Cell Death and Disease, 2023, 14(9): 634.

[4] 武赛男,刘喜泽,甄玉国,等.支链氨基酸的特点及生物学作用研究进展[J].经济动物学报,2023,27(2):151-156.

[5] ZHANG Y Q, ZHAN L Q, ZHANG L J, et al. Branched-chain amino acids in liver diseases: complexity and controversy [J]. Nutrients, 2024, 16(12): 1875-1875.

[6] 李光霞,李宗伟,陈林海,等.发酵法生产L-异亮氨酸的研究进展[J].食品与发酵工业,2006,1:57-61.

[7] BARAK Z, CHIPMAN D M, GOLLOP N. Physiological implications of the specificity of acetohydroxy acid synthase isozymes of enteric bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(8): 3750-3756.

[8] INUI M, VERTES A A, KOBAYASHI M, et al. Cloning and sequence determination of the acetohydroxy acid synthase genes from *Brevibacterium flavum* MJ233 by using the polymerase chain reaction [J]. DNA Sequence, 1993, 3(5): 303-310.

[9] 朱福周,芦楠,李宇虹,等.增强回补途径对谷氨酸棒状杆菌合成L-异亮氨酸的影响（英文）[J].食品与发酵工业,2020,46(2):11-17.

[10] YIN L H, HU X Q, XU D Q, et al. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(5): 542-550.

[11] YIN L H, ZHAO J X, CHEN C, et al. Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase L-isoleucine production in

Corynebacterium glutamicum [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2014, 19(1): 132-142.

[12] 孔帅,方应浩,周航,等.微生物发酵法生产L-异亮氨酸的研究进展[J].中国酿造,2020,39(9):30-36.

[13] ZHANG Y C, LIU Y D, ZHANG S Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve L-isoleucine production [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020, 68(3): 568-584.

[14] 张成林,龙辉,温冰,等.双底物指数流加和双阶段溶氧控制对谷氨酸棒状杆菌生产L-异亮氨酸的影响[J].食品与发酵工业,2014,40(4):1-6.

[15] 郭燕风.基于代谢工程由黄色短杆菌选育L-异亮氨酸高产菌[D].无锡:江南大学,2015.

[16] 尹良鸿.高产L-异亮氨酸谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造[D].无锡:江南大学,2013.

[17] 黄园园.谷氨酸棒状杆菌ATCC 14067中L-精氨酸合成途径的反馈抑制机制解析及其代谢工程改造[D].广州:华南理工大学,2018.

[18] 赵难难.谷氨酸棒状杆菌中二胺生物传感器的开发、设计及应用[D].广州:华南理工大学,2022.

[19] 王平.谷氨酸棒杆菌工程菌发酵代谢产物及过程分析[D].广州:华南理工大学,2017.

[20] 樊占青,刘晓婷,魏贞,等.新型天冬氨酸激酶突变株构建及酶学性质表征[J].食品科学,2022,43(2):62-69.

[21] LIU X, LIU J, LIU Z, et al. Engineering allosteric inhibition of homoserine dehydrogenase by semi-rational saturation mutagenesis screening [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1336215.

[22] 李坤.在乳糖发酵短杆菌中过表达NAD激酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因对NADPH供应和L-异亮氨酸合成的促进作用[D].无锡:江南大学,2013.

[23] GUILLOUET S, RODAL A A, AN G H, et al. Metabolic redirection of carbon flow toward isoleucine by expressing a catabolic threonine dehydratase in a threonine-overproducing *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(5-6): 667-673.

[24] 张炎潮.代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产L-异亮氨酸[D].无锡:江南大学,2020.

[25] XUE H, LI M, CUI Y, et al. Coordinated synthesis of aromatic amino acid derived pigments in yeast via global transcriptional engineering [J]. Microbial Cell Factories, 2025, 24(1): 174-174.

[26] GU Z, CHAI T, CHEN X. Evolutionary engineering of Pichia pastoris for α-farnesene biosynthesis from methanol [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2025, 5(3): 1-11.

[27] CHEN S X, LI X Q, XU X H, et al. Multilayer genetic circuits for dynamic regulation of metabolic pathways [J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(7): 1600-1610.