

生物法合成戊二胺研究进展

李东霞, 黎明, 王洪鑫, 王舒雅, 路福平

天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 国家工业酶工程实验室 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457

李东霞, 黎明, 王洪鑫, 等. 生物法合成戊二胺研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(2): 161-174.

Li DX, Li M, Wang HX, et al. Progress in biosynthesis of diaminopentane. Chin J Biotech, 2014, 30(2): 161-174.

摘 要: 随着经济快速发展, 大气污染和全球变暖的趋势日益恶化。世界上每年消耗大量石化资源来源的聚酰胺, 戊二胺作为聚酰胺的重要组成单体, 生物法合成戊二胺具有经济学和生态学双重意义。目前, 生物法合成戊二胺的工程菌主要有谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌, 文中从微生物中戊二胺的代谢、戊二胺合成途径的关键酶和转运蛋白、戊二胺生产最佳代谢途径和戊二胺产量的预测、代谢工程研究进展等方面综述了生物法合成戊二胺的最新研究现状和进展, 并对其前景进行了展望。

关键词: 戊二胺, 谷氨酸棒状杆菌, 大肠杆菌, 赖氨酸脱羧酶, 尸胺转运蛋白

Received: May 18, 2013; **Accepted:** August 20, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21176190), Key Technology Research and Development Program of Tianjin, China (No. 11ZCKFSY00900), Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (No. 11JCYBJC09600), Changjiang Scholars and Innovative Research Team (No. IRT1166).

Corresponding author: Ming Li. Tel: +86-22-60601958; Fax: +86-22-60602298; E-mail: liming09@tust.edu.cn

国家自然科学基金(No. 21176910), 天津市科技支撑计划 (No. 11ZCKFSY00900), 天津市应用基础及前沿技术研究计划(No. 11JCYBJC 09600), 长江学者与创新团队项目(No. IRT1166) 资助。

Progress in biosynthesis of diaminopentane

Dongxia Li, Ming Li, Hongxin Wang, Shuya Wang, and Fuping Lu

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Air pollution and global warming are increasingly deteriorating. Large amounts of polyamides derived from fossil fuel sources are consumed around the world. Cadaverine is an important building monomer block of bio-based polyamides, thus biotechnological processes for these polymers possess enormous ecological and economical potential. Currently, the engineered strains for biological production of cadaverine are *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. We review here the latest research progress of biosynthesis of cadaverine including metabolism of cadaverine in microorganisms, key enzymes and transport proteins in cadaverine synthesis pathway, optimum pathways and cadaverine yields.

Keywords: cadaverine, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, lysine decarboxylase (LDC), cadaverine-lysine antiporter (CadB)

戊二胺 (Diaminopentane), 又名尸胺 (Cadaverine)、1,5-二氨基戊烷、五亚甲基二胺或尸毒素, 是生物胺类 (包括腐胺、精胺、亚精胺和尸胺等) 中的一种^[1]。1885 年, 德国柏林的医师 Ludwig Brieger 在腐败的尸体中首次发现该胺类, 并以此得名尸胺^[2]。在细胞内, 戊二胺是赖氨酸合成途径的延伸反应产物, 是赖氨酸脱羧酶 (E.C.4.1.1.18) 催化赖氨酸脱羧产生的 (图 1)。戊二胺具有许多重要的生理功能, 如戊二胺是微生物细胞内调节铁离子浓度的“铁亲和系统”和一些严格厌氧的革兰氏阴性菌肽聚糖的主要组成成

分^[3-5]; 戊二胺在关闭孔蛋白通道和保护大肠杆菌免受氧的毒害方面也起着重要的作用^[6-8]; 内源性戊二胺的分泌以及胞内高浓度戊二胺积累可导致外膜渗透性降低, 抑制某些抗生素如头孢霉素类抗生素的作用^[9-11]。

戊二胺在农业、医学和工业上具有广泛的应用。在农业上, 外源施加戊二胺可以改善坐果和促进果实发育, 提高果实的产量^[12-13]; 在医学上, 它也可作为一种有效治疗痢疾的药物^[14]; 在工业上, 戊二胺与二元酸进行聚合反应可合成优质高分子材料——新型尼龙^[15]。

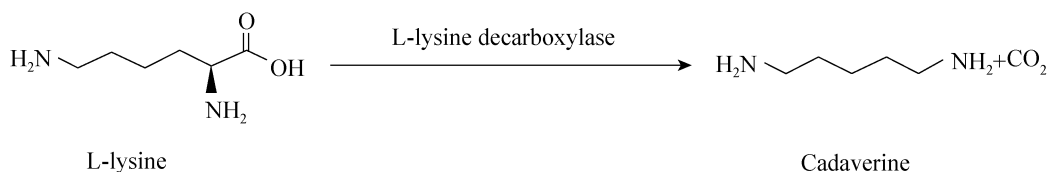


图 1 赖氨酸脱羧反应

Fig. 1 Reaction of lysine decarboxylate.

每年全球约生产 600 万 t 聚酰胺, 其中尼龙 6.6 (即聚酰胺 6.6, Polyamide 6.6, PA 6.6) 是聚酰胺类产品中开发最早、产量最大、应用最广的产品之一, 被广泛应用于航空航天、汽车部件、机械零部件、电子电器和包装材料领域中, 在胶粘剂及化妆品领域也得到了广泛应用^[16]。尼龙 6.6 是由己二酸和己二胺按摩尔比 1:1 聚合的产物。目前, 己二酸可利用生物催化技术合成, 但己二胺的合成仍然依赖于石油化工产品^[17]。随着国际油价的飙升和石油资源的枯竭以及石油资源的大量消耗导致大气 CO₂ 含量的迅速升高和环境污染, 人们试图寻找一种能利用生物方法生产己二胺的替代物, 从而用一种可再生资源替代石油来生产尼龙^[18]。戊二胺是赖氨酸脱羧的产物, 与己二胺互为同系物, 可代替己二胺用来合成新型尼龙 (图 2)。在工业上, 戊二胺可以分别与己二酸、琥珀酸和癸二酸等二元酸聚合形成新型材料聚酰胺 5.6 (Polyamide 5.6, PA 5.6)、聚酰胺 5.4^[19-21]和聚酰胺 5.10^[22]。PA 5.6 具有重要的工业用途, 与 PA 6.6 一样具有良好的机械强度、较高的熔点和耐各种有机溶剂的特性, 可以替代 PA 6.6 使用^[23]。聚酰胺 5.10 材料性能极佳, 具有高熔点(215 °C)、低吸水率(1.8%)、低密度(1.07 g/cm³)等优点。由于己二酸、琥珀酸已经可以通过微生物合成, 癸二酸也可以从蓖麻油来制取。因此, 戊二胺的生物合成成为合成新型材料聚酰胺的一个关键问题, 下文将阐述生物法合成戊二胺的最新研究进展。

1 微生物中戊二胺的代谢

微生物中戊二胺的代谢包括戊二胺的合成、降解、吸收和分泌。微生物中存在两种完全不同的赖氨酸合成途径: 一种是始于 α -酮戊二酸和乙酰-CoA 的 α -氨基己二酸途径 (AAA), 另一种是始于天冬氨酸的二氨基庚二酸途径 (DAP)。第一种途径主要存在于高等真菌和古生菌中, 某些细菌如嗜热栖热菌属中也存在该途径; 第二种途径主要存在于细菌和植物中, 而且这两个途径没有直接的进化关系^[24]。

1.1 大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中戊二胺的代谢途径

戊二胺是通过赖氨酸脱羧酶催化赖氨酸脱羧形成的。大肠杆菌能够直接合成戊二胺, 谷氨酸棒状杆菌虽然不能直接合成戊二胺, 但它能高效合成戊二胺的前体, 即赖氨酸脱羧酶的底物赖氨酸, 并且二者合成赖氨酸的途径类似 (图 3)^[25]。如果在谷氨酸棒状杆菌中表达赖氨酸脱羧酶, 谷氨酸棒状杆菌也能像大肠杆菌一样直接合成戊二胺^[26]。大肠杆菌中赖氨酸的合成途径从 TCA 循环的中间代谢物草酰乙酸 (Oxaloacetate) 开始, 需要连续十步的酶反应。前 3 步生成代谢的节点中间物天冬氨酸半醛 (Aspartic acid semialdehyde), 由它进一步合成 L-甲硫氨酸、L-苏氨酸、L-异亮氨酸和 L-赖氨酸。L-赖氨酸经赖氨酸脱羧酶的催化脱羧生成戊二胺。在大肠杆菌中, 存在 3 种天冬氨

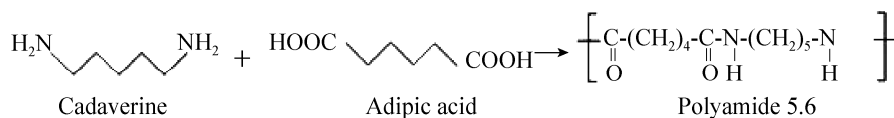


图 2 PA 5.6 反应方程式

Fig. 2 Chemical structure and production of polyamide 5.6 using cadaverine and adipic acid from renewable resources.

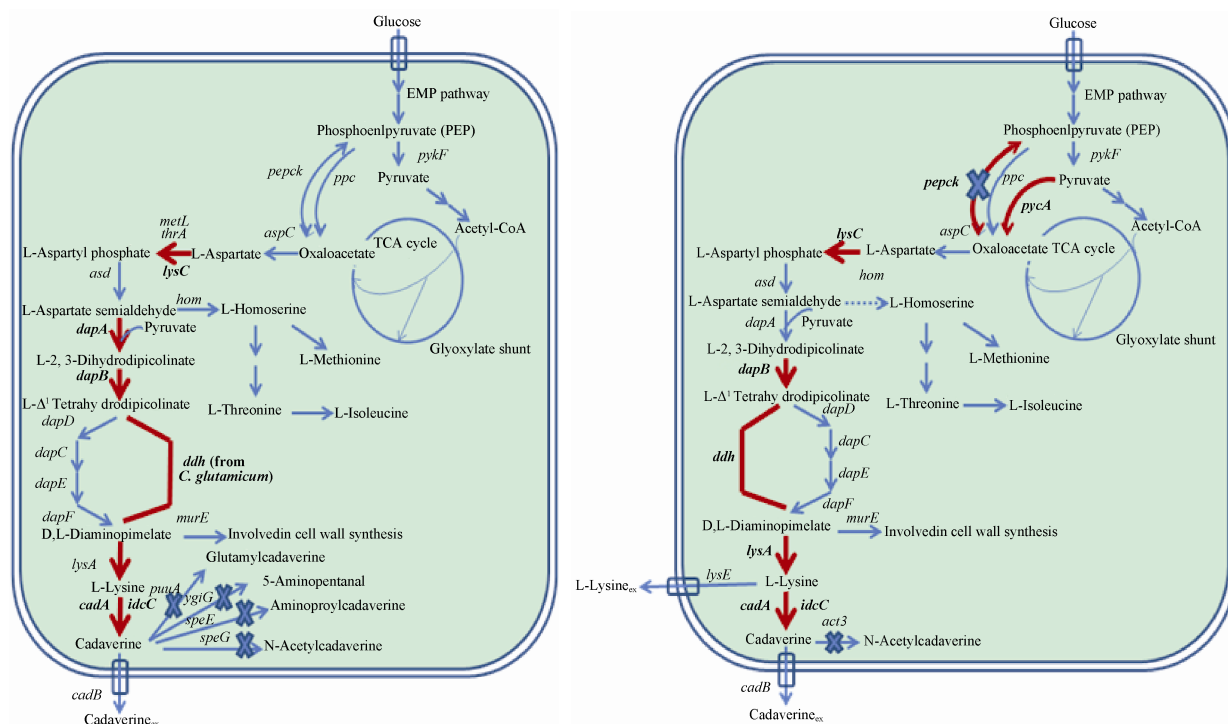


图 3 大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中尸胺的代谢途径 (左图为大肠杆菌中, 右图为谷氨酸棒状杆菌中。粗体箭头表示基因过表达活性增强, 箭头上带有 X 表示该基因被删除, 虚线表示该途径被弱化)

Fig. 3 Metabolic pathway of cadaverine in *E. coli* and *C. glutamicum*. The left is in *E. coli* and the right is in *C. glutamicum*. Thick arrows indicate increased activity by overexpression, arrows with blue X's indicate genes that are knocked out, dashed line indicates attenuation.

酸激酶(EC 2.7.2.4): LysC、ThrA 和 MetL, 它们是催化天冬氨酸磷酸化成天冬氨酰磷酸的同工酶。

其中天冬氨酸激酶 I (ThrA)^[27]、天冬氨酸激酶 II (MetL)^[28]是双功能酶, 它们同时也具有高丝氨酸脱氢酶活性, 能催化分支中间产物天冬氨酸半醛生成高丝氨酸, 从而使碳流流向合成苏氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸的分支途径。天冬氨酸激酶 III (LysC) 是赖氨酸合成途径中的特异关键酶^[29]。而在谷氨酸棒状杆菌中, 只有一种天冬氨酸激酶 (LysC)。此外, 谷氨酸棒状杆菌中既可以通过二氨基庚二酸脱氢酶 (Ddh, EC 1.4.1.16) 直接催化四氢二吡啶二羧酸转化为二氨基庚二酸, 也可以通

过 DapDCEF 四步催化完成转化, 而在大肠杆菌中该过程要经历 DapDCEF 四步催化才能完成。大肠杆菌中赖氨酸合成的各个步骤都受赖氨酸调控, 既包括对天冬氨酸激酶 III 基因 (*lysC*)、天冬氨酸半醛脱氢酶基因 (*asd*)、二氢吡啶二羧酸还原酶基因 (*dapB*)、四氢二吡啶琥珀酸酶基因 (*dapD*) 和二氨基庚二酸脱羧酶基因 (*lysA*) 的转录阻遏, 又包含对天冬氨酸激酶 III (LysC) 和二氢甲基吡啶酸合成酶 (DapA) 催化的反馈抑制作用^[30]。

除了戊二胺合成途径, 戊二胺的代谢还受其降解和转运的调控^[31]。尸胺-赖氨酸反向转运蛋白 CadB 既可以依靠离子动力势摄取戊二胺, 又可以

分泌戊二胺。大肠杆菌中戊二胺的利用和降解途径除了编码腐胺/尸胺氨基转移酶的 SpeE 催化戊二胺为氨基戊二胺之外,精胺乙酰转移酶 SpeG 催化戊二胺为 N-乙酰戊二胺,戊二胺转氨酶 YgjG 催化戊二胺为氨基戊醛,腺嘌呤脱氨酶 PuuA 催化戊二胺的谷氨酰基化^[32]。在假单胞菌中,戊二胺通过氨基转换作用代谢为 5-吡啶,进一步氧化为 5-氨基戊酸 (AMV)^[25]。在谷氨酸棒状杆菌中,戊二胺也可以和乙酰-CoA 作用生成乙酰戊二胺。在一些物种中,戊二胺也是氨基丙酸化和乙酰化的底物^[33]。

1.2 大肠杆菌中戊二胺诱导合成的调控机制

大肠杆菌中有两种赖氨酸脱羧酶:诱导型酶 CadA^[34-35]和组成型酶 LdcC^[36-37],它们都需要磷酸吡哆醛作为辅助因子。Fritz 等建立了大肠杆菌中戊二胺诱导合成的戊二胺操纵子调控机制(图 4)^[38]。

戊二胺操纵子包括诱导型启动子 *Pcad*、赖氨酸脱羧酶基因 *cadA* 和赖氨酸-尸胺反向转运蛋白基因 *cadB*,戊二胺操纵子上游是其调节基因 *cadC*^[34]。戊二胺的合成受 pH 值和赖氨酸浓度调节。在低 pH 值、高赖氨酸浓度条件下,*cadC* 基因被激活,其产物作用于 *Pcad*,启动 *cadA*、*cadB* 基因表达合成赖氨酸脱羧酶 CadA 和赖氨酸-尸胺反向转运蛋白 CadB^[31]。CadA 利用细胞内的质子和赖氨酸合成戊二胺和 CO₂,同时将合成的戊二胺转运至细胞外。*cadC* 基因上游有编码赖氨酸渗透酶的基因 *lysP*,赖氨酸渗透酶基因 *lysP* 并不是戊二胺操纵子的组成成分,但它编码的蛋白 LysP 能抑制 CadC 的活性。高浓度的赖氨酸可以抑制 LysP 蛋白对 CadC 活性的抑制作用^[37]。高浓度戊二胺对 *cadC* 基因表达具有抑制作用,还可导致细胞膜孔蛋白的关闭^[9],影响细菌的正常生长。

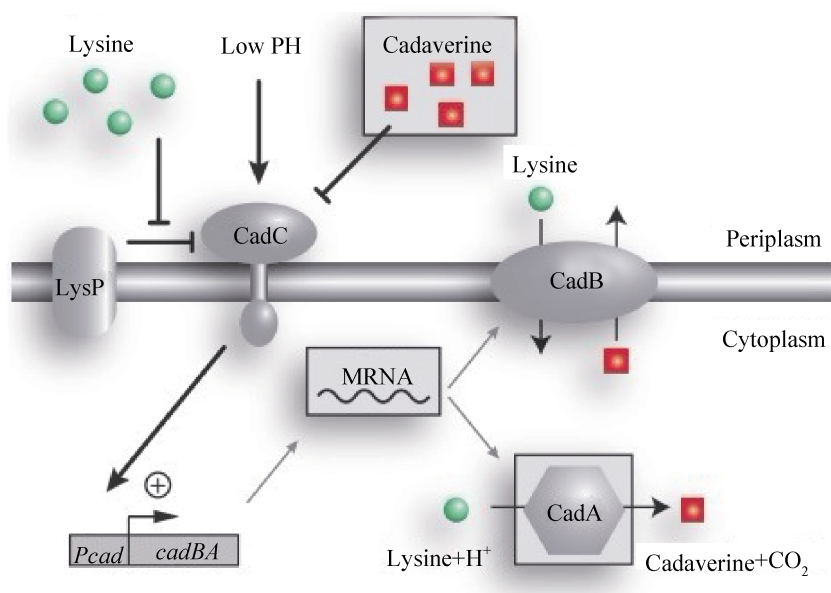


图 4 大肠杆菌中 Cad 系统的调控模型^[38]

Fig. 4 Regulation Model of the Cad System in *E. coli* (simplified)^[38].

2 戊二胺合成途径的关键酶和转运蛋白

2.1 赖氨酸脱羧酶

赖氨酸脱羧酶催化赖氨酸脱羧形成戊二胺,是戊二胺合成途径中最关键的酶。赖氨酸脱羧酶存在于大肠杆菌 *Escherichia coli*、蜂房哈夫尼菌 *Hafnia alvei*、耐碱芽胞杆菌 *Bacillus halodurans*、蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus*、尸杆菌 *Bacterium cadaveris*、伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia vietnamensis*、青紫色素杆菌 *Chromobacterium violaceum*、霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*、毛链霉菌 *Streptomyces posolus* 等^[36,39-43]大多数微生物中。赖氨酸脱羧酶也存在于高等植物中,例如黄瓜、家山黧豆等^[43]。目前,已经分别从大肠杆菌、蜂房哈夫尼菌、反刍动物月形单胞菌 *Selenomonas ruminantium*、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 和鲷爱德华氏菌 *Edwardsiella ictaluri* 等细菌中克隆出赖氨酸脱羧酶基因^[44]。其中对来自于大肠杆菌中的两种脱羧酶的特性研究较为清楚。

大肠杆菌中有两种赖氨酸脱羧酶:诱导型酶 CadA^[34-35]和组成型酶 LdcC^[36-37],它们都需要磷酸吡哆醛作为辅助因子。CadA 的最适 pH 是 5.5,在 pH 8.0 时完全失活;LdcC 的最适 pH 是 7.6,在广泛的 pH 范围内均有活性^[36-37]。在它们各自的最适 pH 条件下,LdcC 的酶活性高于 CadA,尽管 LdcC 和 CadA 的最适温度都是 52 °C,但是,CadA 在高温下比较稳定,在 70 °C 时仍能保持稳定,而 LdcC 从 37 °C 开始,随着温度升高而逐步失活^[37]。厌氧环境下 *cadA* 在赖氨酸存在的情况下通过低 pH (5.5) 诱导,表达达到最高水平,尸胺的分泌中和了胞外培养基的 pH^[34-35]。多数文献认为 *ldcC* 是组成型表达,且在菌体中其表达水平很低^[36];但也有文献认为,*ldcC* 不是组成型表达,而是被某种因子抑制,正常条件下转录很弱,mRNA 不稳定^[37]。蜂房哈夫尼菌的赖氨酸脱羧酶基因 *ldc*

为组成型表达,虽然文献中没有直接来自于蜂房哈夫尼菌的赖氨酸脱羧酶的最适温度和最适 pH 值,但是,固定化法产该酶的细胞制备 1, 5-戊二胺时使用的温度为 37 °C, pH 为 5.0^[45]。不同来源的赖氨酸脱羧酶的氨基酸序列一致性比较高,大肠杆菌的 *ldcC* 与 *cadA* 以及来自于蜂房哈夫尼菌和鼠伤寒沙门氏菌的 *ldc* 基因编码的氨基酸序列相比,相似性分别为 69.4%、68.6%和 68.9%。大肠杆菌的 CadA 和蜂房哈夫尼菌的 Ldc 氨基酸序列相似性为 80%,然而只有 41% 序列具有相同的密码子。而且它们都表现出特定的底物专一性,只能对赖氨酸进行脱羧反应^[44]。

来自于反刍动物月形单胞菌的 *ldc* 基因的 ORF 长 1 182 bp,编码 393 个氨基酸,形成的赖氨酸脱羧酶由两个相同的单体构成^[46]。该基因编码的赖氨酸脱羧酶能够同时催化赖氨酸和鸟氨酸脱羧,而且对这两个底物具有相似的 K_m 和 V_{max} 值。但是在该酶的催化结构域里,催化赖氨酸脱羧和催化鸟氨酸脱羧的比率是 0.83。该酶和其他已经报道的细菌来源的赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶几乎没有氨基酸序列的相似性,但与真核生物的鸟氨酸脱羧酶的氨基酸序列大约有 60% 的相似性^[4]。

目前已经克隆的赖氨酸脱羧酶序列很多,尽管缺乏与它们的酶学性质有关的报道,但从构建的系统进化树来看,赖氨酸脱羧酶分属于两个大的类群,其中来源于蜂房哈夫尼菌和大肠杆菌 K12 的赖氨酸脱羧酶属于一个大的类群,其余来源的赖氨酸脱羧酶来源于另一个大的类群(图 5)。

2.2 赖氨酸-尸胺反向转运蛋白

赖氨酸-尸胺反向转运蛋白 CadB (Cadaverine-lysine antiporter) 是一种转运戊二胺和赖氨酸的跨膜蛋白,与 PotE(腐胺-鸟氨酸反向转运蛋白)^[47-50]和 AdiC(胍丁胺-精氨酸反向转运蛋白)^[51-52]一样,

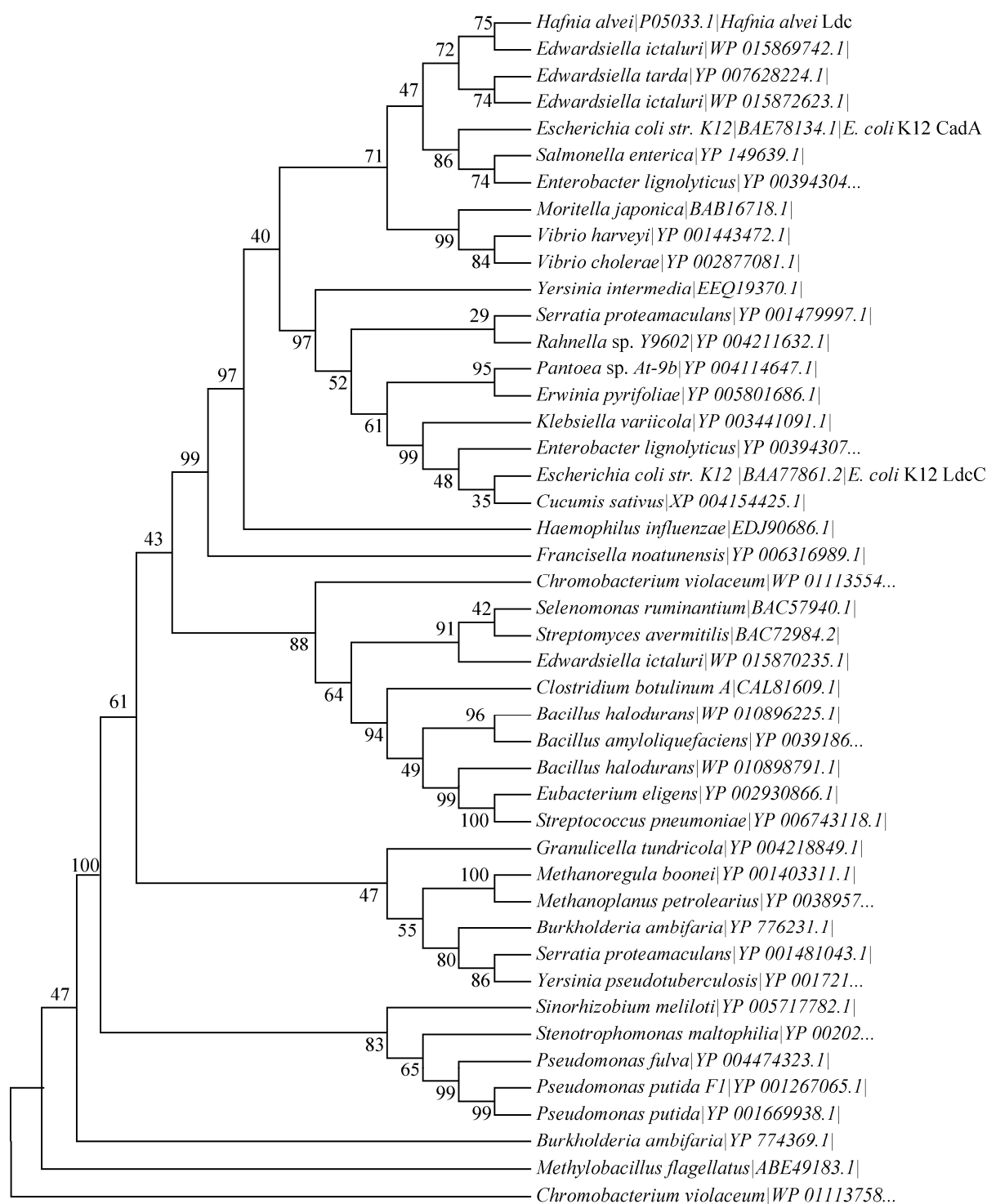


图 5 赖氨酸脱羧酶系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of lysine decarboxylase.

都属于 APC 超家族转运蛋白 (Amino acid/polyamine/organocation superfamily of transporters)^[53],对菌体生长具有重要影响。*cadB* 基因长 1 335 bp,与 *cadA* 组成 *cad* 操纵子,编码 444 个氨基酸^[34]。大肠杆菌中戊二胺的浓度不只是通过生物合成来维持,也可以通过摄取、分泌、降解进行调节^[31]。由于赖氨酸脱羧酶是胞内酶,合成的戊二胺若在细胞内积累,对细胞具有毒性^[54]。Soksawatmaekhin 等^[31]对 CadB 的功能进行了详细研究,表明 CadB 在细胞中同时具有分泌和吸收功能,既可以经过质子动力摄取戊二胺,也可以进行赖氨酸-戊二胺的逆向转运,从而分泌戊二胺。尸胺吸收和分泌的 K_m 值分别为 20.8、303 $\mu\text{mol/L}$ 。在中性 pH 值下,如果细胞内多胺不足,细胞可以通过 CadB 少量摄入戊二胺;在酸性 pH 值下,CadA 催化赖氨酸形成戊二胺,CadB 将合成的戊二胺转运到细胞外,维持细胞内外戊二胺的平衡。CadB 和 CadA 对于细胞在酸性 pH 值下的生长和对酸性的耐受方面具有重要作用。

Soksawatmaekhin 等^[54]还进一步鉴定出 CadB 上与戊二胺吸收和分泌相关的氨基酸残基: Tyr⁷³、Tyr⁸⁹、Tyr⁹⁰、Glu²⁰⁴、Tyr²³⁵、Asp³⁰³ 和 Tyr⁴²³ 强烈影响戊二胺的吸收和分泌; Trp⁴³、Tyr⁵⁷、Tyr¹⁰⁷、Tyr³⁶⁶ 和 Tyr³⁶⁸ 主要影响戊二胺的吸收; Arg²⁹⁹ 主要影响戊二胺的分泌,说明 Arg²⁹⁹ 涉及赖氨酸羧基的识别; Cys³⁷⁰ 的巯基不仅对戊二胺的氨基识别是必需的,可能还涉及 H⁺ 的识别。而且,同时涉及戊二胺吸收和分泌、或者仅涉及戊二胺分泌的氨基酸残基都位于细胞膜的细胞质一侧,而仅涉及尸胺吸收的氨基酸残基位于细胞膜的周质空间一侧。Tomitori 等^[55]还利用已知的 AdiC 晶体模型模拟了 CadB 与 PotE 的结构,三者结构极其相似,只是与底物结合位点的宽度因底物大小而不同。这些研究为 CadB 的功能改造奠定了基础。

谷氨酸棒状杆菌不能合成戊二胺,因此不存在专一的戊二胺转运蛋白,转运赖氨酸的转运蛋白 LysE 也不能转运戊二胺。Kind 等^[56]研究表明,当在谷氨酸棒状杆菌中合成戊二胺时,有 35 种候选基因的表达量上升,其中编码一种渗透酶的 *cg2893* 基因的表达量增加了 2.6 倍。当该基因被删除时,戊二胺的分泌降低了 90%,而过表达该基因时,戊二胺的产量可提高 20%。因此,渗透酶 Cg2893 可能具有转运戊二胺的功能。*cg2893* 基因长 1 485 bp,编码 494 个氨基酸,其核苷酸序列和 *cadB* 的相似性为 69.42%,其氨基酸序列与 CadB 的相似性为 67%。该基因的发现为在谷氨酸棒状杆菌中研究戊二胺的合成和转运提供了理论依据。

3 戊二胺生产最佳代谢途径和产量的预测

计量网络模型可以通过模拟预测谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌生产戊二胺的潜力,该模型以两种微生物的基因组序列为基础进行评估^[57]。使用基础通量模型分析可以推导出生产戊二胺的最大理论产量、最佳途径、最有前途的目的基因^[58]。谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌利用不同的代谢途径优化戊二胺的生产^[57]。谷氨酸棒状杆菌大量利用戊糖磷酸途径,而此途径在大肠杆菌中几乎未参与戊二胺的合成。合成赖氨酸时,谷氨酸棒状杆菌利用特异性的脱氢酶分支途径,而流向三羧酸循环的通量为零,相反,大肠杆菌中只使用需要大量通量流向三羧酸循环的琥珀酰途径。预测的谷氨酸棒状杆菌生产戊二胺最高产量是 0.43 g/g (0.75 mol/mol),大肠杆菌则是 0.49 g/g (0.84 mol/mol)。这些数值远远超过了目前所达到的生产水平,说明我们仍有很大的优化空间去生产戊二胺。大肠杆菌中,转氢酶 (EC 1.6.1.1-2) 催化 NAD⁺ 和 NADPH 与 NADH 和 NADP⁺ 之间相互转化的线粒

体酶,在网络模型上删除转氨酶时预测产量降低至 0.40 g/g。反之,在网络模型中添加转氨酶时,预测的谷氨酸棒杆菌最高产量则增加为 0.49 g/g。因此,转氨酶在两种微生物戊二胺合成途径中扮演重要的角色。

4 戊二胺代谢工程研究进展

大肠杆菌的遗传背景清楚,戊二胺的合成机制明确,是研究戊二胺合成的理想宿主之一。研究者或者利用大肠杆菌的静息细胞合成戊二胺,或者根据大肠杆菌中戊二胺的代谢途径,对大肠杆菌进行代谢工程改造,利用糖类发酵直接合成戊二胺。Nishi 等利用强启动子 *Plac* 构建过表达 *cadA* 的大肠杆菌工程菌,工程菌发酵后投入底物赖氨酸,戊二胺产量达到 69 g/L 发酵液^[59]。为了直接利用糖类合成戊二胺,Qian 等^[32]利用大肠杆菌 K12 W3110 作为宿主,对戊二胺代谢途径进行了改造:1) 删除编码降解戊二胺的 *speE*、*speG*、*ygiG*、*puuA* 和 *puuP* 基因,使戊二胺降解和利用途径失活;2) 利用强启动子 *Plac* 过表达 *cadA*;3) 通过强启动子 *P_{trc}* 替换原启动子过表达 *lysC*、*dapA*、*dapB* 和 *lysA* 来增加底物赖氨酸的合成;4) 把 *ddh* 整合到染色体的 *iclR*(异柠檬酸裂合酶)调节基因位点增加草酰乙酸的供给。结果表明:对赖氨酸合成途径的修饰以及野生型 *lysC* 的过表达没有使戊二胺产量提高,而草酰乙酸的供给是个潜在的瓶颈。最终,大肠杆菌工程菌 XQ56 合成戊二胺的产量为 0.13 g/g 葡萄糖。

谷氨酸棒状杆菌是生产赖氨酸的高产菌株,赖氨酸是合成戊二胺的前体物质。因此,研究者也选择谷氨酸棒状杆菌作为宿主菌株进行代谢工程改造,从而利用糖类发酵来合成戊二胺。Mimitsuka 等^[26]首次利用谷氨酸棒杆菌工程菌发酵葡萄糖来生产戊二胺,将 *cadA* 插入谷氨酸棒杆

菌的高丝氨酸脱氢酶基因(*hom*)位点,*cadA* 在卡那霉素抗性基因启动子调控下表达,发酵液上清中积累了 2.6 g/L 戊二胺;研究还表明,由于谷氨酸棒杆菌缺乏戊二胺转运蛋白,导致戊二胺在细胞内积累,抑制了赖氨酸脱羧酶的活性和戊二胺的合成。Tateno 等^[60]将淀粉酶基因 *amyA* 和 *cadA* 同时克隆到谷氨酸棒状杆菌中共表达,构建成可直接利用可溶性淀粉生产戊二胺的谷氨酸棒状杆菌工程菌,尸胺产量达到 23.4 mmol/L。本实验室利用蜂房哈夫尼菌中赖氨酸脱羧酶基因 *ldc*,以大肠杆菌/谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pXMJ19 为载体,构建工程菌株 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc*。工程菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 合成的戊二胺产量为 0.96 g/L^[61]。

构建戊二胺高产菌株需要对代谢途径的不同节点进行改造或修饰,包括中心碳代谢中前体和辅因子优化、产物的转运以及戊二胺合成代谢流无关的分支代谢途径的解除或弱化^[62]。Kind 等^[63]对谷氨酸棒状杆菌中戊二胺代谢途径进行了改造:1) 在天冬氨酸激酶和丙酮酸羧化酶引入点突变 *lysC311* 和 *pycA458*,解除了该酶受到的反馈调节;2) 过表达回补酶(Anaplerotic enzyme) 丙酮酸羧化酶基因(*pyc*),删除催化草酰乙酸消耗的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(*pepck*),保证重要前体草酰乙酸的供给;3) 过表达天冬氨酸激酶基因(*aspC*)、二氢吡啶二羧酸还原酶基因(*dapA*)、二氨基庚酸脱氢酶基因(*ddh*)和二氨基庚酸羧化酶基因(*lysA*),保证生物合成流流向赖氨酸;4) 高丝氨酸脱氢酶在 59 位点(*hom59*)渗漏突变,实现对分支丝氨酸途径的弱化。5) 利用强启动子 *P_{tuf}* 调控和密码子优化过表达 *ldcC*,最终戊二胺产量达到 200 mmol(0.11 g/g 葡萄糖),该菌株命名为 DAP-3c。若加入赖氨酸脱羧酶的辅酶磷酸吡哆醛,戊二胺产量达到 300 mmol(0.17 g/g 葡萄糖)。此外,

该过程中检测到副产物 N-乙酰戊二胺, 约占总产物的 25%。N-乙酰尸胺是以乙酰-CoA 作为乙酰基供体, 经 NCgl1469 催化戊二胺合成的产物^[63]。敲除该基因戊二胺产量增加了 11%, 葡萄糖向戊二胺的摩尔转换率达到 30%。然而, 副产物的代谢流没有全部流向戊二胺, 这可能是受到戊二胺转运的限制造成的。通过全局转录分析 (Global transcription profiling), 从 35 种候选基因中鉴定出 *cg2893* 编码的渗透酶可能具有转运戊二胺的功能^[64]。敲除该基因戊二胺的分泌降低了 90%, 而过表达该基因时, 戊二胺的产量可提高 20%, 副产物减少 75%。说明增强戊二胺的分泌可以降低戊二胺对赖氨酸脱羧酶的竞争抑制作用, 从而提高戊二胺的产量。本实验将 *cadB* 克隆至谷氨酸棒杆菌中, 与蜂房哈夫尼菌的 *ldc* 基因共表达, 在谷氨酸棒杆菌合成戊二胺的同时, 帮助戊二胺转运至细胞外, 解除戊二胺的反馈抑制作用。工程菌合成戊二胺的分泌率较 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 提高了 27%^[65], 戊二胺的产量也提高了 30%。说明 *CadB* 可以在谷氨酸棒状杆菌中表达, 且可以将戊二胺转运至胞外, 进而提高戊二胺的产量。

Volkert 等通过对代谢途径进行改造, 构建了能利用葡萄糖发酵生产戊二胺谷氨酸棒状杆菌工程菌 DAP, 戊二胺产量达到 72 g/L, 并从发酵液中分离纯化戊二胺, 纯度达到 99%以上^[66]。

Buschke 等利用谷氨酸棒状杆菌共表达木糖异构酶基因 *xyIA* 和木酮糖激酶基因 *xyIB* 并在 HCE (High constitutive expression) 启动子调控下过表达 *cadA*, 工程菌利用木糖发酵合成戊二胺, 戊二胺产量为 13.9 mmol/L 发酵液, 转化率为每 mol 木糖转化 (164.5±6.9) mmol 戊二胺, 对应每 mol 碳转化 (32.9±1.4) mmol 戊二胺^[67]。碳源转化为戊二胺的转化率比较低, 可能是碳源转化成二氧化碳损失过多, 以及木糖的转运机制还不太清楚。为了提高

木糖的转化效率和提高戊二胺产量, Buschke 等将木糖合成途径中的 *tkt* 操纵子过表达并删除戊二胺分解代谢中的 *lysE* 和 *act* 基因, 构建高产戊二胺的谷氨酸棒状杆菌工程菌 *C. glutamicum* DAP-*XylI* *icd*^{GTG} *P_{effu}fbp* *P_{sod}tkt* Δact $\Delta lysE$, 戊二胺产量达到 103 g/L^[33]。

5 戊二胺研究前景展望

市场上的完全生物基尼龙产品包括聚酰胺 11、聚酰胺 1010 和聚酰胺 46。其中聚酰胺 11 和聚酰胺 1010 来源于蓖麻油^[68], 聚酰胺 46 由糖类发酵得到的产物腐胺和己二酸聚隶属于荷兰 DSM 公司旗下 Stanyl 品牌^[25]。市场上的部分生物基尼龙产品包括聚酰胺 610、聚酰胺 1012、聚酰胺 410 和聚酰胺 10T, 其他的生物基尼龙还处于研发阶段^[68]。2012 年, 日本味之素公司和东丽实业公司宣布合作开发生物基尼龙原料 1,5-戊二胺。由于谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌的遗传背景清楚、生长周期短, 为戊二胺的合成研究及工业生产提供了有利依据。然而, 无论是大肠杆菌还是谷氨酸棒状杆菌, 虽然中心代谢途径的改造在一定程度上提高了戊二胺的产量, 但戊二胺的合成量远达不到实际生产要求, 还需要大量的基础研究。赖氨酸脱羧酶是胞内酶, 戊二胺滞留在胞内造成对赖氨酸脱羧酶的反馈抑制。已知的戊二胺转运蛋白只有大肠杆菌中的赖氨酸-尸胺反向转运蛋白 *CadB*, 能够在谷氨酸棒状杆菌中表达, 但转化效率还有待提高。而谷氨酸棒状杆菌中 *cg2893* 编码的渗透酶也可能具有转运戊二胺的功能, 但是谷氨酸棒状杆菌中不止这一种潜在的戊二胺转运蛋白, 还可能存在未知的转运蛋白。如果能找到所有的戊二胺转运蛋白, 比较其利弊, 筛选出表达量最高的蛋白, 这对戊二胺的生产具有重大意义。然而, 戊二胺的转运量增加了, 胞外的戊二胺量会明显增加,

这会对细菌的生长造成影响。大肠杆菌在 0.2 mol/L 戊二胺存在时生长率下降 35%，在 0.5 mol/L 戊二胺存在时仍有菌体生存，但戊二胺浓度在 0.3–0.5 mol/L 时部分细胞已裂解。大肠杆菌对戊二胺的耐受性低于其对腐胺的耐受性^[69]。谷氨酸棒状杆菌在 1 mol/L 戊二胺浓度时仍能对数生长，生长率下降约 67%^[27]。因此，明确戊二胺抑制细菌生长的机制，提高谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌对戊二胺的耐受性是亟需解决的问题。

REFERENCES

- [1] Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*, 1985, 49: 81–99.
- [2] Brieger L. Weitere Untersuchungen über Ptomaine A. Berlin: Hirschwald, 1885.
- [3] Francisco J, Flores J, Rincn JF. Characterization of the iron regulated *desA* promoter of *Streptomyces pilosus* system for controlled gene expression in actinomycetes. *Microb Cell Fact*, 2003, 71: 339–349.
- [4] Hirao T, Sato M, Shirahata A. Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. *Bacteriol*, 2000, 182(4): 1154–1157.
- [5] Kamio Y, Nakamura K. Putrescine and cadaverine are constituents of peptidoglycan in *Veillonella alcalescens* and *Veillonella parvula*. *Bacteriol*, 1987, 169(6): 2881–2884.
- [6] Delavega AL, Delcour AH. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO*, 1995, 14(23): 6058–6065.
- [7] Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1): 39–51.
- [8] Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2261–2265.
- [9] Samartzidou H, Delour AH. Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J Bacteriol*, 1999, 18(3): 791–798.
- [10] Tkachenko AG, Shumkov AV, Akhova AV. Adaptive functions of *Escherichia coli* polyamines in response to sublethal concentrations of antibiotics. *Microbiol*, 2009, 78(1): 25–32.
- [11] Manuel J, Zhanel GG, Kievit T. Cadaverine suppresses persistence to carboxypenicillins in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(12): 5173–5179.
- [12] Chen XH, Yu J, Li LL. Advances in study on polyamines during flowering and fruit setting and development in higher plants. *Chin Bull Bot*, 2003, 20(1): 36–42 (in Chinese).
陈学好, 于杰, 李伶俐. 高等植物开花结实的多胺研究进展. *植物学通报*, 2003, 20(1): 36–42.
- [13] Wang XY, Zou Q. Advances in study on polyamines during flowering and fruit setting and development in higher plants. *Chin Bull Bot*, 2002, 19(1): 11–20 (in Chinese).
王晓云, 邹琦. 多胺与植物衰老关系研究进展. *植物学通报*, 2002, 19(1): 11–20.
- [14] Casalino M, Latella MC, Prosseda G, et al. Molecular evolution of the lysine decarboxylase defective phenotype in *Shigella sonnei*. *Int J Med Microbiol*, 2005, 294: 503–512.
- [15] Kiyohiko N, Shuichi E, Yukiko M. Enzymatic method for producing cadaverine dicarboxylate and its use for the production of nylon: Japan, 147688. 2003-05-26.
- [16] Deng RS, Wei YF, Chen BN. Polyamide Resin and Its Application. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 124–130 (in Chinese).
邓如生, 魏运房, 陈步宁. 聚酰胺树脂及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2002: 124–130.
- [17] Lin SS, Weng HS. Liquid-phase oxidation of cyclohexane over CoAPO-5: synergism effect of coreactant and solvent effect. *Appl Catal A-Gen*, 1994, 118(1): 21–31.
- [18] Sanders J, Scott E, Weusthuis R, et al. Bio-refinery as the bio-inspired process to bulk chemicals. *Macromol Biosci*, 2007, 7(2): 105–117.

- [19] Okino S, Noburyu R, Suda M, et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 81(3): 459–464.
- [20] Oh IJ, Kim DH, Oh EK, et al. Optimization and scale-up of succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens* LPK7. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(2): 167–171.
- [21] Stellmacher R, Hangebrauk J, Wittmann C, et al. Fermentative manufacture of succinic acid with *Basfia succiniciproducens* DD1 in serum flasks. *Chem Lett*, 2010, 82(8): 1223–1229.
- [22] Ogunniyi DS. Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource Technol*, 2006, 97(9): 1086–1091.
- [23] Jiang LL, Wu XY, Liu Y, et al. Fermentation and properties of lysine decarboxylase. *Fine Chem*, 2006, 23(11): 1060–1067 (in Chinese).
蒋丽丽, 吴晓燕, 刘毅, 等. 赖氨酸脱羧酶发酵工艺及酶学性质. *精细化工*, 2006, 23(11): 1060–1067.
- [24] Velasco AM, Leguina JI, Lazcano A. Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways. *Mol Evol*, 2002, 55: 445–459.
- [25] Schneider J, Wendisch VF. Biotechnological production of polyamines by Bacteria: recent achievements and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91: 17–30.
- [26] Mimitsuka T, Sawai H, Hatsu M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007, 71(9): 2130–2135.
- [27] Katinka M, Cossart P, Sibilli L, et al. Nucleotide sequence of the *thrA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(10): 5730–5733.
- [28] Zakin MM, Duchange N, Ferrara P, et al. Nucleotide sequence of the *metL* gene of *Escherichia coli*. Its product, the bifunctional aspartokinase ii-homoserine dehydrogenase II, and the bifunctional product of the *thrA* gene, aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I, derive from a common ancestor. *J Biol Chem*, 1983, 258(5): 3028–3031.
- [29] Cassan M, Parsot C, Cohen GN, et al. Nucleotide sequence of *lysC* gene encoding the lysine-sensitive aspartokinase III of *Escherichia coli* K12. Evolutionary pathway leading to three isofunctional enzymes. *J Biol Chem*, 1986, 261(3): 1052–1057.
- [30] Park JH, Lee KH, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19): 7797–7802.
- [31] Soksawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, et al. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2004, 51 (5): 1401–1412.
- [32] Qian Z, Xia X, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 93–103.
- [33] Buschke N, Becker J, Schäfer R, et al. Systems metabolic engineering of xylose-utilizing *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane. *Biotechnol J*, 2013, 8: 557–570.
- [34] Meng SY, Bennett GN. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J Bacteriol*, 1992, 174(8): 2659–2669.
- [35] Watson N, Donyak DS, Rosey EL, et al. Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J Bacteriol*, 1992, 174(2): 530–540.
- [36] Yamamoto Y, Miwa Y, Miyoshi K, et al. The *Escherichia coli ldcC* gene encodes another lysine decarboxylase, probably a constitutive enzyme. *Genes Genet Syst*, 1997, 72 (3): 167–172.
- [37] Lemonnier M, Lane D. Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. *Microbiol*, 1998, 144(3): 751–760.
- [38] Fritz G, Koller C, Burdack K, et al. Induction kinetics of a conditional pH stress response system in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2009, 393(2): 272–286.
- [39] Neely MN, Olson ER. Kinetics of expression of the *Escherichia coli cad* operon as a function of pH and

- lysine. *J Bacteriol*, 1996, 178(18): 5522–5528.
- [40] Sabo DL, Boeker EA, Byers B. Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochem*, 1974, 13(4): 662–670.
- [41] Stefan V, Harald H, Andreas K, et al. Process for production of cadaverine by fermentation: German, 2008100053323. 2008-02-01.
- [42] Fecker LF, Beier H, Berlin J. Cloning and characterization a lysine decarboxylase gene form *Hafnia alvei*. *Mol Gen Genet*, 1986, 203: 177–184.
- [43] Lu MH, Li XM, Chen JF, et al. Study on chilling tolerance of cucumber during germination and expression of lysine decarboxylase gene. *Sci Agri Sin*, 2005, 38(12): 2492–2495 (in Chinese).
逯明辉, 李晓明, 陈劲枫, 等. 黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达. *中国农业科学*, 2005, 38(12): 2492–2495.
- [44] Sakazaki R. The genus *Hafnia*//Starr MP, Stolp H, Trüper HG, et al eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1981: 1181–1186.
- [45] Jiang LL, Liu JZ, Shen YL, et al. Producing cadaverine by cell immobilization of lysine decarboxylase. *Fine Chem*, 2007, 24(11): 1080–1084 (in Chinese).
蒋丽丽, 刘均忠, 沈俞, 等. 用固定化 L-赖氨酸脱羧酶细胞制备 1,5-戊二胺. *精细化工*, 2007, 24(11): 1080–1084.
- [46] Takatsuka Y, Yamaguchi Y, Ono M, et al. Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. *J Bacteriol*, 2000, 6732–6741.
- [47] Kashiwagi K, Miyamoto S, Suzuki F, et al. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4529–4533.
- [48] Kashiwagi K, Shibuya S, Tomitori H, et al. Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *Biol Chem*, 1997, 272: 6318–6323.
- [49] Kashiwagi K, Kuraishi A, Tomitori H, et al. Identification of the putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE. *Biol Chem*, 2000, 275: 36007–36012.
- [50] Qian ZG, Xia XX, Lee SY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(4): 651–662.
- [51] Gong S, Richard H, Foster JW. YjdE (AdiC) is the arginine: agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *Bacteriol*, 2003, 185: 4402–4409.
- [52] Iyer R, Williams C, Miller C. Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *Bacteriol*, 2003, 185: 6556–6561.
- [53] Jack DL, Paulsen IT, Saier MH. The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiol*, 2000, 146: 1797–1814.
- [54] Soksawatmaekhin W, Uemura T, Fukiwake N, et al. Identification of the cadaverine recognition site on the cadaverine-lysine antiporter cadB. *J Biol Chem*, 2006, 281(39): 29213–29220.
- [55] Tomitori H, Kashiwagi K, Igarash K. Structure and function of polyamine-amino acid antiporters CadB and PotE in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, 2012, 42: 733–740.
- [56] Kind S, Kreye S, Wittmann C. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5-diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2011, 13: 617–627.
- [57] Kind S, Wittman C. Bio-based production of the platform chemical 1,5-diaminopentane. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91: 1287–1296.
- [58] Melzer G, Esfandabadi ME, Franco LE, et al. Flux design: in silico design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties. *BMC Syst Biol*, 2009, 3: 120.
- [59] Nishi K, Endo S, Mori Y, et al. Method for producing cadaverine dicarboxylate: US 7189543 B2. 2007-3-13.
- [60] Tateno T, Okada Y, Tsuchidate T, et al. Direct production of cadaverine from soluble starch using

- Corynebacterium glutamicum* coexpressing alpha-amylase and lysine decarboxylase. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 115–121.
- [61] Niu T, Li M, Zhang JH, et al. Construction of recombinant *Corynebacterium glutamicum* producing 1,5-pentanediamine by one step method. China Biotechnol, 2010, 30(8): 93–99 (in Chinese).
牛涛, 黎明, 张俊环, 等. 一步法生产 1,5-戊二胺谷氨酸棒杆菌基因工程菌的构建. 中国生物工程杂志, 2010, 30(8): 93–99 .
- [62] Park JH, Lee SY. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. Curr Opin Biotechnol, 2008, 19: 454–460.
- [63] Kind S, Jeong WK, Schröder H, et al. Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diaminopentane. Metab Eng, 2010, 12(4): 341–351.
- [64] Kind S, Jeong WK, Schröder H, et al. Identification and elimination of the competing N-acetyldiaminopentane pathway for improved production of diaminopentane by *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol, 2010b, 76(15): 5175–5180.
- [65] Huang YY, Li M, Liu M, et al. Construction and transformation of *Corynebacterium glutamicum* expression vector of cadaverine-lysine antiporter *cadB* gene. Biotechnol Bull, 2012(8): 94–100 (in Chinese).
黄云雁, 黎明, 刘萌, 等. 赖氨酸-尸胺反向转运蛋白 *cadB* 基因谷氨酸棒杆菌表达载体的构建及转化. 生物技术通报, 2012(8): 94–100.
- [66] Volkert M, Zelder O, Ernst B, et al. Method for fermentively producing 1,5-diaminopentane: US, 20100292429, 2010-11-18.
- [67] Buschke N, Schröder H, Wittmann C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemicelluloses. Biotechnol J, 2011, 6: 306–317.
- [68] Ji D, Fang Z, Ouyang PK, et al. Progress in bio-based polyamides. Chin J Biopro Eng, 2011, 6: 306–317 (in Chinese).
季栋, 方正, 欧阳平凯, 等. 生物基聚酰胺研究进展. 生物加工过程, 2013, 11(2): 73–80.
- [69] Limsuwun K, Jones PG. Spermidine acetyltransferase is required to prevent spermidine toxicity at low temperatures in *Escherichia coli*. Bacteriol, 2000, 182(19): 5373–5380.

(本文责编 郝丽芳)