

• 工业生物技术 •

# 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌合成及分泌途径生产 L-缬氨酸

张海灵<sup>1,2</sup>, 李颜颜<sup>1,2</sup>, 王小元<sup>1,2</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

张海灵, 李颜颜, 王小元. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌合成及分泌途径生产 L-缬氨酸. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1606-1619.

Zhang HL, Li YY, Wang XY. Metabolic engineering of L-valine synthesis and secretory pathways in *Corynebacterium glutamicum* for higher production. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1606-1619.

**摘要:** 谷氨酸棒状杆菌是目前微生物发酵生产 L-缬氨酸的主要工业菌株。文中首先在谷氨酸棒状杆菌 VWB-1 中敲除了 *alaT* (丙氨酸氨基转移酶), 获得突变菌株 VWB-2, 作为出发菌株。进而对 L-缬氨酸合成途径关键酶——乙酰羟酸合酶 (*ilvBN*) 的调节亚基进行定点突变 (*ilvBN*<sup>M13</sup>), 解除 L-缬氨酸对该酶的反馈抑制。然后辅助过量表达 L-缬氨酸合成途径关键基因 *ilvBN*<sup>M13</sup>、乙酰羟酸异构酶 (*ilvC*)、二羟酸脱水酶 (*ilvD*)、支链氨基酸氨基转移酶 (*ilvE*), 加强通往 L-缬氨酸的碳代谢流, 提高菌株的 L-缬氨酸水平。最后, 基于过量表达 L-缬氨酸转运蛋白编码基因 *brnFE* 及其调控蛋白编码基因 *lrp1*, 提高细胞的 L-缬氨酸转运能力。最终获得工程菌株 VWB-2/pEC-XK99E-*ilvBN*<sup>M13</sup>*CE-lrp1-brnFE* 在 5 L 发酵罐中的 L-缬氨酸产量达到 461.4 mmol/L, 糖酸转化率达到 0.312 g/g 葡萄糖。

**关键词:** L-缬氨酸, 代谢工程, 发酵, 谷氨酸棒状杆菌

## Metabolic engineering of L-valine synthesis and secretory pathways in *Corynebacterium glutamicum* for higher production

Hailing Zhang<sup>1,2</sup>, Yanyan Li<sup>1,2</sup>, and Xiaoyuan Wang<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** *Corynebacterium glutamicum* is the main industrial strain to produce L-valine by microbial fermentation. In this study, a low L-alanine producing *C. glutamicum* strain VWB-2 was constructed by knocking out the alanine aminotransferase encoding gene *alaT* in a high L-valine producing strain VWB-1. Meanwhile, a site-directed mutagenesis (*ilvBN*<sup>M13</sup>) was done on the

**Received:** March 27, 2018; **Accepted:** April 28, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31370131), Post-graduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province, China (No. CXZZ12-0755).

**Corresponding author:** Xiaoyuan Wang. Tel/Fax: +86-510-85329329; E-mail: xwang@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金面上项目 (No. 31370131), 江苏省普通高校研究生科研创新计划 (No. CXZZ12-0755) 资助。

regulatory subunit of acetohydroxyacid synthase (*ilvBN*), a key enzyme in the L-valine synthesis pathway. Furthermore, the overexpression of the genes involved in the biosynthesis of L-valine, the mutated *ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>, the acetohydroxy acid isomerase coding genes *ilvC*, the dihydroxy-acid dehydratase coding gene *ilvD* and branched-chain amino acid aminotransferase coding gene *ilvE*, could all promote the L-valine production of VWB-1 by strengthening the carbon flow towards L-valine. With the overexpression of the branched chain amino acid transporter coding gene *brnFE* and its regulator *lrp*<sub>1</sub>, the L-valine producing capability of VWB-1 was further enhanced. The finally obtained engineered strain VWB-2/pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>*CE-lrp*<sub>1</sub>-*brnFE* could produce 461.4 mmol/L L-valine in a 5 L fermentor with a sugar acid conversion rate of 0.312 g/g glucose.

**Keywords:** L-valine, metabolic engineering, fermentation, *Corynebacterium glutamicum*

L-缬氨酸 (L-valine) 是一种重要的支链氨基酸, 是人体 8 种必需氨基酸之一, 广泛应用于食品、医药、化妆品、饲料等领域<sup>[1]</sup>。目前工业上主要通过微生物发酵法生产 L-缬氨酸, 生产菌株主要包括谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 以及酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 谷氨酸棒状杆菌由于产率高、生物安全等特性而被广泛应用<sup>[2-4]</sup>。传统诱变育种是 L-缬氨酸工业生产菌主要来源<sup>[5]</sup>, 但是传统的育种方式获得的菌株遗传背景不明确、菌株遗传特性不稳定, 随着谷氨酸棒状杆菌生理学和遗传学知识的积累, 基于理性设计的代谢工程正在成为选育氨基酸高产菌株的主要方式, 更多的谷氨酸棒状杆菌生产特性得以改良, 根据已经获得的遗传学信息, 系统分析菌株 L-缬氨酸代谢网络, 通过基因工程技术改造谷氨酸棒状杆菌以提高 L-缬氨酸的产量<sup>[6-7]</sup>。近年来, 一些谷氨酸棒状杆菌的基因敲除、表达系统已经被构建<sup>[8-13]</sup>, 针对谷氨酸棒状杆菌中的启动子工程也已经开展<sup>[11,14]</sup>。围绕 L-缬氨酸的生物合成途径, 谷氨酸棒状杆菌中的理性代谢工程设计从 DNA 层次上的定点突变以消除转录弱化调控和改变启动子活性、蛋白层次上改造酶的催化结构域和调节结构域、强化通往 L-缬氨酸的碳代谢流以及加强 L-缬氨酸的胞外转运等几个方面展开<sup>[15]</sup>。

在前期的研究中, 我们选育了一株 L-缬氨酸产量较高的谷氨酸棒状杆菌 VWB-1, 通过对其进行转录组学和蛋白质组学的分析研究其遗传背

景, 发现菌株的产酸水平有待进一步提高<sup>[16]</sup>。本研究中, 借助代谢工程改造的技术手段, 我们首先在谷氨酸棒状杆菌 L-缬氨酸高产菌株 VWB-1 中对丙氨酸合成途径丙氨酸氨基转移酶编码基因 *alaT* 进行敲除, 发现丙氨酸合成途径的阻断能够降低细胞内杂酸丙氨酸的生成。其次, 对 L-缬氨酸合成代谢限速酶乙酰羟酸合酶 (AHAS) 进行抗反馈抑制的定点突变, 解除 L-缬氨酸对该酶的反馈抑制, 进而通过过量表达 L-缬氨酸合成途径基因加强通往 L-缬氨酸的碳代谢流。最后, 表达与 L-缬氨酸转运相关的基因加强菌株的 L-缬氨酸转运能力。通过摇瓶发酵和 5 L 罐发酵实验, 检测重组工程菌株的产 L-缬氨酸水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

本研究所采用的菌株和质粒见表 1。pEC-XK99E 载体为 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 穿梭表达载体<sup>[17]</sup>。

### 1.2 培养基及培养方法

大肠杆菌 *E. coli* JM109 使用 LB 培养基 (酵母浸提物 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L; 固体培养基加入琼脂粉 20 g/L) 进行培养, 培养温度为 37 °C。谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* ATCC 13869 和 VWB-1 使用 LBGB 培养基 (LB 培养基中添加 5 g/L 葡萄糖以及 18.5 g/L 脑心浸液), 培养温度为 30 °C。*C. glutamicum* 感受态制备培养基 (酵母浸提物 0.5 g/L, 蛋白胨 1 g/L,

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Relevant genotype	Reference
Plasmids		
pEC-XK99E	<i>E. coli</i> and <i>C. glutamicum</i> shuttle vector	Laboratory preservation
pk19mobsacBalaT	<i>C. glutamicum</i> <i>alaT</i> knocking out vector	[20]
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i>	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i>	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sup>M13</sup>	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sup>M13</sup>	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub>	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sub>1</sub>	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup>	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup>	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD- <i>lrp1-brnFE</i>	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD- <i>lrp1-brnFE</i>	This research
pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE- <i>lrp1-brnFE</i>	pEC-XK99E with the insertion of <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE- <i>lrp1-brnFE</i>	This research
Strains		
<i>E. coli</i> JM109		Laboratory preservation
<i>C. glutamicum</i> VWB-1		[16]
<i>C. glutamicum</i> VWB-2	VWB-1 with the deletion of <i>alaT</i>	This research
ATCC 13869/pJYW- <i>ilvBNC1-lrp1-brnFE</i>	ATCC 13869 harboring pJYW- <i>ilvBN1C-lrp1-brnFE</i>	[21]
VWB-1/pEC-XK99E	VWB-1 harboring pEC-XK99E	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i>	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i>	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup>	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup>	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub>	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub>	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup>	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup>	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD- <i>lrp1-brnFE</i>	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD- <i>lrp1-brnFE</i>	This research
VWB-1/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE- <i>lrp1-brnFE</i>	VWB-1 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE- <i>lrp1-brnFE</i>	This research
VWB-2/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD- <i>lrp1-brnFE</i>	VWB-2 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CD- <i>lrp1-brnFE</i>	This research
VWB-2/pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE- <i>lrp1-brnFE</i>	VWB-2 harboring pEC-XK99E- <i>ilvBN</i> <sub>1</sub> <sup>M13</sup> CE- <i>lrp1-brnFE</i>	This research

NaCl 1 g/L, 甘氨酸 3%, 吐温 800.1%), *C. glutamicum* 电转化恢复培养基 LBHIS (酵母浸提物 2.5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, NaCl 5 g/L, D-山梨醇 91 g/L, 脑心浸液 18.5 g/L; 固体培养基加入琼脂粉 20 g/L)。必要时添加质量浓度为 30 μg/mL 的卡那霉素。大肠杆菌感受态制备及转化方法参照文献[18], 谷氨酸棒状杆菌感受态制备及转化方法参照

文献[12]。

### 1.3 突变菌株、定点突变、重组载体和基因重组菌构建

本研究所用引物序列及相关信息见表 2。引物主要依据 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组序列设计<sup>[19]</sup>, *ilvN*<sub>1</sub><sup>M13</sup> 突变相关引物 *ilvNM13-F/ilvNM13-R* 根据 VWB-1 相关基因测序结果设计。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
<i>ilvBN</i> -F ( <i>EcoR</i> I)	CGGAATTCAAAGGAGGAGAATCAGTAAAGGAGCCAGAAAGTCGTG
<i>ilvBN</i> -R ( <i>Sma</i> I)	GCACCCGGGGATTAATTGCTGTTTAGATCTTGG
<i>ilvNM13</i> -F	GTCCGTA <del>C</del> CTCGTTACAGGACGTAGACGATGACTTTTCCCGCGTATC
<i>ilvNM13</i> -R	CGGGTGAACATACCTGATACGCGGGAAAAGTCATCGTCTACGTCC
<i>ilvBNC</i> -F ( <i>EcoR</i> I)	CGGAATTCAAAGGAGGAGAATCAGTAAAGGAGCCAGAAAGTCGTG
<i>ilvBNC</i> -R ( <i>Sma</i> I)	GATCCCGGGTATGTACAAAGTGCACAGCAGGT
<i>ilvD</i> -F ( <i>Xba</i> I)	CGTCTAGAAAAAGCGCATCATGATCCCACCTTCGT
<i>ilvD</i> -R ( <i>Xba</i> I)	CATCTAGACCAAAGTAGGGAACCGGTGCTCAAACA
<i>ilvE</i> -F ( <i>Xba</i> I)	CGTCTAGAGTGTATCTGTCAGGTAGCAGGT
<i>ilvE</i> -R ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGAGTTTAATGCAGCGGGGTCTTAA
Ptac- <i>lrp-brnFE</i> -F( <i>Nde</i> I)	GGTATTTACACCCGCATATGACTCGACAACCTGTTAATT
Ptac- <i>lrp-brnFE</i> -R( <i>Nde</i> I)	TACTGAGAGTGCACCATATGTTAGAAAAGATTCACAGTC
<i>alaT</i> -veri-F	GACTACAGACAAGCGCAAAACCTCTAAGAC
<i>alaT</i> -veri-R	GGAAGTTACCCAGGCGCTCAATTGC

“—” represents the cleavage site of restriction endonuclease, “==” represents the mutation sites of *ilvN*<sup>M13</sup>.

### 1.3.1 丙氨酸氨基转移酶编码基因 *alaT* 敲除突变菌株的构建

应用 *sacB* 基因的条件致死性原理,进行 VWB-1 丙氨酸氨基转移酶编码基因 *alaT* 的敲除。利用基于 *sacB* 的整合型敲除载体 pK19mobsacBalaT (德国尤里希生物技术研究中心 Lothar Eggeling 教授提供)<sup>[20]</sup>,对菌株 VWB-1 进行 *alaT* 敲除,谷氨酸棒状杆菌 *alaT* 基因敲除方法参照文献[12]。获得了不含有 *kan* 抗性的无痕基因敲除突变菌株 VWB-1/ $\Delta$ *alaT* (命名为 VWB-2)。

### 1.3.2 乙酰羟酸合酶调节亚基 *IlvN* 定点突变

前期测序结果表明,VWB-1 来源的 *ilvBN* (标记为 *ilvBN*<sub>1</sub>) 编码的乙酰羟酸合酶 (标记为 AHAS<sub>1</sub>) 蛋白相比于 ATCC 13869 来源的 *ilvBN* 编码的乙酰羟酸合酶蛋白,氨基酸序列并非完全一致。如图 1 所示,分别以 *C. glutamicum* ATCC 13869 和 VWB-1 的基因组为模板扩增 *ilvBN* 相关基因。以 *ilvBN*-F 和 *ilvBN*-R 为引物分别扩增 *ilvBN* 和 *ilvBN*<sub>1</sub>,将获得的 PCR 片段与载体 pEC-XK99E 共同进行 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切并纯化,在 T4

DNA 连接酶作用下进行连接,构建得到载体 pEC-XK99E-*ilvBN* 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub>。分别以构建好的重组载体 pEC-XK99E-*ilvBN* 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub> 为模板,以 *ilvNM13*-F/*ilvNM13*-R 为引物,进行全质粒扩增,PCR 反应结束,直接在 PCR 反应体系中加入 1  $\mu$ L *Dpn* I,混匀后 30  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。*Dpn* I 消化结束后直接转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,将转化后的细胞全部涂布到含有适当抗生素的平板上,过夜培养。挑取生长后的转化子提取质粒进行酶切验证,确认得到的质粒大小正确以后,对该质粒进行测序,比对测序结果,鉴定突变是否成功。突变成功后的载体命名为 pEC-XK99E-*ilvBN*<sup>M13</sup> 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>。

### 1.3.3 L-缬氨酸合成途径相关基因的串联表达

如图 1 所示,以 *C. glutamicum* VWB-1 基因组为模板,以 *ilvC*-F/*ilvC*-R 为引物,扩增获得目的基因 *ilvC*,将 *ilvC* 片段和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup> 分别进行双酶切,在 T4 DNA 酶的作用下进行连接,得到新载体 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>C。继而分别以 *C. glutamicum* VWB-1 基因组 *ilvD*-F/*ilvD*-R、

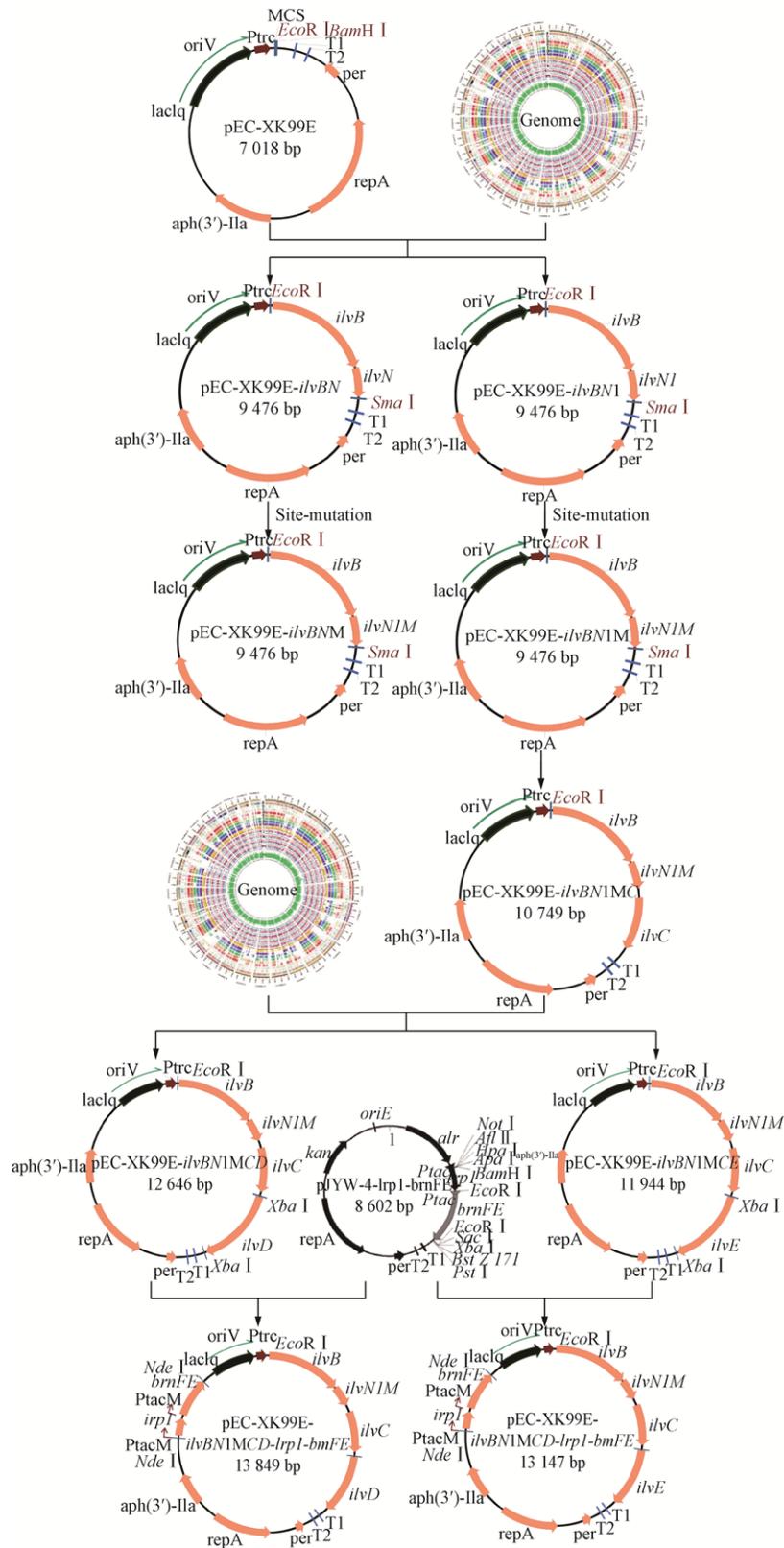


图 1 重组质粒的构建流程

Fig. 1 Construction procedure of the recombinant plasmids.

*ilvE-F/ilvE-R* 为引物,克隆得到 *ilvD* 和 *ilvE*,将 *ilvD* 和 *ilvE* 各自进行 *Xba* I 酶切,与同样经 *Xba* I 酶切的载体 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>C 进行连接。连接反应产物转入到 *E. coli* JM109 感受态细胞,提取转化子质粒酶切验证,同时测序验证片段的连接顺序。构建分别得到 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CD 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CE。

### 1.3.4 L-缬氨酸转运系统基因的串联表达

如图 1 所示,以陈诚等<sup>[21]</sup>构建的载体 pJYW-4-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE* 为模板,以 Ptac-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE-F*/Ptac-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE-R* 为引物,扩增得到 *lrp*<sub>1</sub> 和 *brnFE* 上游均含有 P<sub>tacM</sub> 启动子序列的片段 P<sub>tacM</sub>-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE*,将该片段用 *Nde* I 进行酶切,在 T4 DNA 连接酶的作用下,与同样经 *Nde* I 酶切的载体 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CD 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CE 进行连接,转入到 *E. coli* JM109 感受态细胞。提取转化子质粒酶切验证,同时测序验证片段的连接顺序。构建得到新载体命名为 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CD-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE* 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CE-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE*。

## 1.4 谷氨酸棒状杆菌发酵用培养基和发酵条件

### 1.4.1 种子培养基

30 g/L 葡萄糖,1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.4 g/L MgSO<sub>4</sub>,10 mg/L FeSO<sub>4</sub>,10 mg/L MnSO<sub>4</sub>,20 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,40 g/L 尿素,60 ml/L 大豆浸出液,0.1 g/L DL-甲硫氨酸,50 μg/L 生物素,200 μg/L 维生素 B1。NaOH 调 pH 为 6.3,121 °C 灭菌 20 min。

### 1.4.2 发酵培养基

120 g/L 葡萄糖,1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.4 g/L MgSO<sub>4</sub>,10 mg/L FeSO<sub>4</sub>,10 mg/L MnSO<sub>4</sub>,40 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,10 ml/L 大豆浸出液,0.7 g/L DL-甲硫氨酸,50 μg/L 生物素,300 μg/L 维生素 B1,0.25 g/L L-异亮氨酸。NaOH 调 pH 为 7.2,摇瓶发酵需预先加入 4 g/100 mL CaCO<sub>3</sub> 以中和发酵过程产酸,115 °C 灭菌 15 min。

### 1.4.3 摇瓶发酵

菌种活化:将冻存于-70 °C 的甘油管保藏菌株于固体培养基上划线,30 °C 培养 36 h。种子培养:利用接种环挑取活化好的新鲜菌苔,接种于装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C、200 r/min 培养 16 h。摇瓶发酵:将培养好的种子液体按照初始 OD<sub>562</sub> 控制为 1.0,接种入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶,必要时添加 30 μg/mL 卡那霉素维持菌株抗性,同样置于 30 °C、200 r/min 条件下培养。含有质粒的重组菌株,在发酵进行到 8 h 时,添加 1 mmol/L IPTG 诱导重组载体上携带的基因进行表达。

### 1.4.4 5 L 罐发酵

菌种活化和种子培养参照摇瓶发酵,培养 200 mL 种子液,接种入装有 2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐。发酵过程中,通过流加 50% 的氨水的方式自动控制发酵培养基 pH 为 7.2,通过夹套加热控制温度为 30 °C,通过发酵罐搅拌转速 (200-800 r/min) 和通气量 (1.5 vvm) 的偶联控制溶氧水平保持 30%。发酵至 8 h 时,添加 1 mmol/L IPTG 诱导重组载体上携带的基因进行表达。当测得发酵液中葡萄糖质量浓度低于 20 g/L 时,流加质量浓度为 80% 的葡萄糖溶液,以保证菌株生长和产酸所必需的葡萄糖供应。每隔 12 h 取样,发酵培养 96 h。

## 1.5 发酵过程参数分析

发酵液中的葡萄糖浓度采用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定;发酵液菌体 OD<sub>562</sub> 采用紫外可见分光光度计 (UV-1800, 日本岛津公司) 测定;基于细胞 OD<sub>562</sub> 与细胞干重 (Dry cell weight, DCW) 的计算公式为: DCW=0.649 5×OD<sub>562</sub>-2.792 5,乘以稀释倍数计算获得<sup>[22]</sup>;L-缬氨酸、丙氨酸的含量通过高效液相色谱 (Agilent Technologies 1200 series, USA) 测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 敲除 *alaT* 以降低胞内杂酸

在前期的实验研究中我们发现, VWB-1 在 5 L 发酵罐上的 L-缬氨酸产量可以达到 29.85 g/L, 远高于 ATCC 13869 的 1.42 g/L。通过 HPLC 对 VWB-1 发酵液中的氨基酸含量进行分析发现, VWB-1 发酵过程中主要杂酸为丙氨酸<sup>[16]</sup>。根据文

献报道, 谷氨酸棒状杆菌中存在两条 L-丙氨酸合成途径<sup>[20]</sup> (图 2)。丙氨酸氨基转移酶 AlaT 和 AvtA 催化丙酮酸生产 L-丙氨酸的氨基供体分别为 L-谷氨酸和 L-缬氨酸。由 AlaT 催化下生成 L-丙氨酸的途径为细胞内产生 L-丙氨酸的主要途径, 由 AvtA 催化生成 L-丙氨酸的途径为次级途径。为了研究谷氨酸棒状杆菌中 *alaT* 在 L-缬氨酸和 L-丙

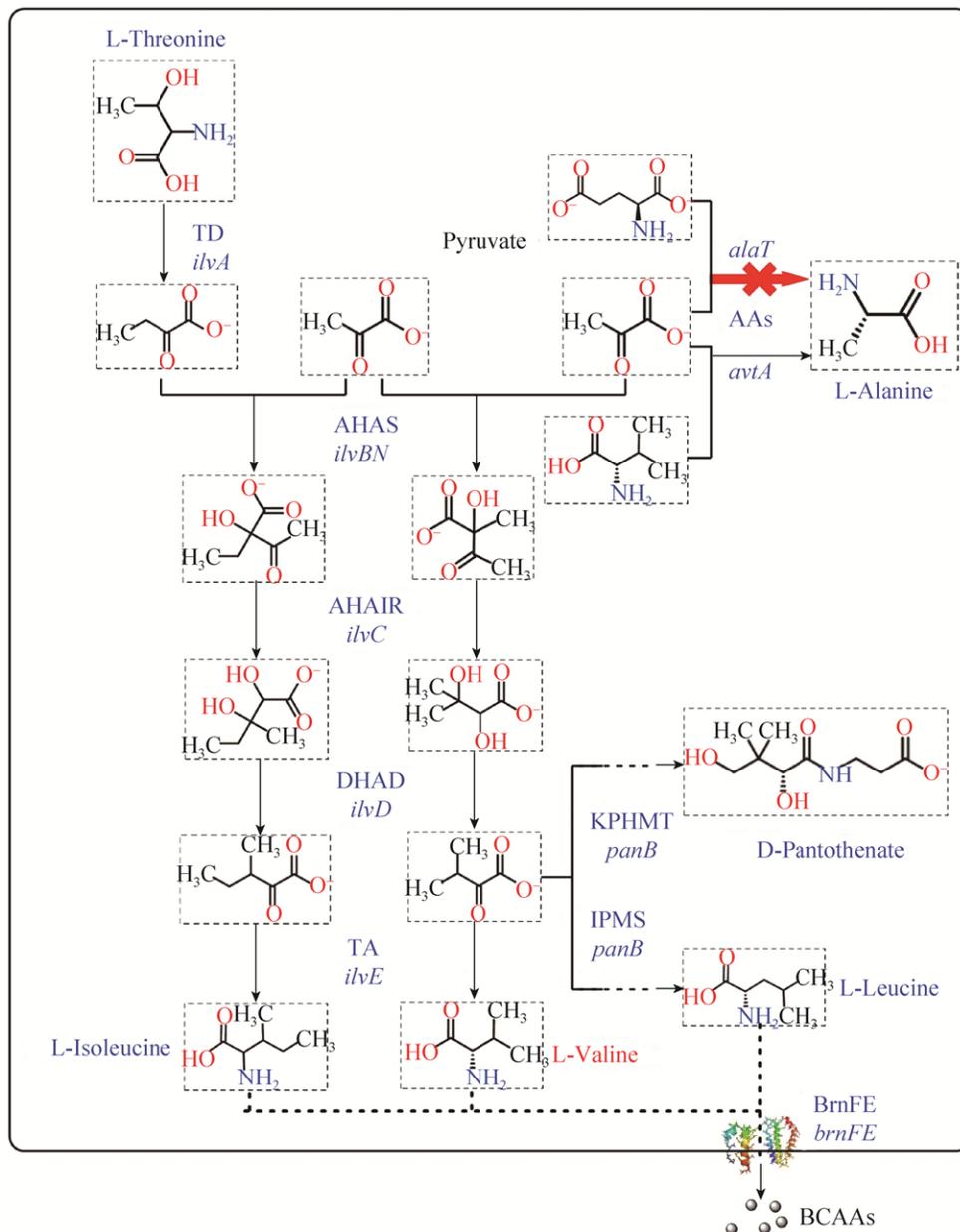


图 2 谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸合成代谢途径

Fig. 2 The biosynthetic pathway of L-valine in *C. glutamicum*.

氨酸合成中所起到的作用,我们对 VWB-1 中的丙氨酸氨基转移酶编码基因 *alaT* 进行敲除,得到突变菌株 VWB-2。以 L-缬氨酸高产菌株 VWB-1 作为对照菌株,对菌株 VWB-2 进行摇瓶发酵实验,并检测菌株的生长以及 L-缬氨酸和 L-丙氨酸合成情况(图 3)。

从图 3A 中可以看出, *alaT* 敲除后菌株的生长有轻微下调。如图 3B 所示,比较 VWB-1 与 VWB-2 的 L-丙氨酸产生情况可以发现, *alaT* 缺失菌株的 L-丙氨酸产量出现大幅度的下调,同时 L-缬氨酸产量有轻微的上调。由此表明, *alaT* 的缺失能够使谷氨酸棒状杆菌 L-丙氨酸合成能力大幅下降,但同时菌体仍有一定的丙氨酸合成能力,以保证细胞正常生长,这可能与细胞内存在的另外一个丙氨酸氨基转移酶编码基因 *avtA* 有关。由于丙氨酸途径同时也是 L-缬氨酸合成代谢的底物竞争途径(图 2),两条途径有共同的关键底物丙酮酸。对谷棒细胞中的丙氨酸途径进行阻断,一方面有利于减少发酵液中丙氨酸含量,降低下游分离纯化的成本,另一方面减少了 L-缬氨酸途径的碳代谢流损耗,对 L-缬氨酸合成有利,因此 VWB-2 可以作为 L-缬氨酸代谢工程改造出发菌株。

## 2.2 *ilvBN* 定点突变及其表达对谷氨酸棒状杆菌发酵产 L-缬氨酸的影响

谷氨酸棒状杆菌中的乙酰羟酸合酶(AHAS)是 L-缬氨酸合成代谢中的关键酶,由 2 个亚基组成,分别是 *ilvB* 编码的催化亚基 IlvB 和 *ilvN* 编码的调节亚基 IlvN<sup>[23]</sup>。AHAS 同时也是细胞中 3 种支链氨基酸(L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸)合成的共用酶(图 2),且受到这 3 种支链氨基酸的反馈抑制, *ilvBN* 基因的表达受 3 种支链氨基酸的调控。在 L-缬氨酸生产中,乙酰羟酸合酶(AHAS)是 L-缬氨酸合成代谢中的关键酶。根据文献报道,当乙酰羟酸合酶调节亚基 IlvN 20–22 位氨基酸由 Gly-Ile-Ile 突变为 Asp-Asp-Phe 时,能够解除这 3 种支链氨基酸对该酶的反馈抑制,从而有利 L-缬氨酸的生产<sup>[24]</sup>。为了比较来源于 ATCC 13869 和 VWB-1 的 *ilvBN* 点突变前后 AHAS 对在 L-缬氨酸代谢中作用程度的不同,我们将不同来源的 *ilvBN* 连接到表达载体 pEC-XK99E 上,构建了重组载体 pEC-XK99E-*ilvBN* 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub>,并以此为模板构建了含有抗反馈抑制突变位点的重组载体 pEC-XK99E-*ilvBN*<sup>M13</sup> 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>,从图 4 中的测序结果可

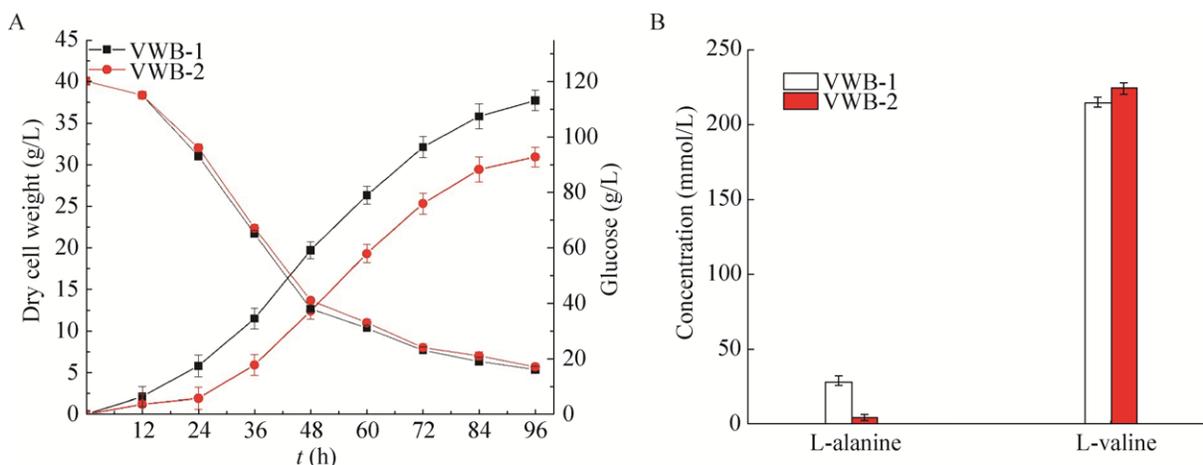


图 3 *alaT* 敲除突变株 VWB-2 生长 (A) 及产 L-丙氨酸和 L-缬氨酸水平检测 (B)  
Fig. 3 Growth curve of VWB-2 (A) and its L-Alanine and L-Valine producing level (B).

ilvN. seq	ATGGCTAATTCIGACGTCACCCGCCACATCCTGTCGGTACICGTTCAGGACGTAGACGAAATCATTCCCGCGTATCAGG	80
ilvNM. seq	ATGGCTAATTCIGACGTCACCCGCCACATCCTGTCGGTACTCGTTCAGGACGTAGACATGACTTTCCCGCGTATCAGG	80
Consensus	atggctaatttctgacgtcaccgccacatcctgtccgtactcgttcaggacgtagacg c ttcccgcgatcagg	
ilvN. seq	TATGTTACCCCGACGCGCATTCAACCTCGTGTCCCTCGTGTCTGCAAAGACCAGAACTCGGCATCAACCGCATCACGG	160
ilvNM. seq	TATGTTACCCCGACGCGCATTCAACCTCGTGTCCCTCGTGTCTGCAAAGACCAGAACTCGGCATCAACCGCATCACGG	160
Consensus	tatgttaccgccagcgcatccaacctcgtgtccctcgtgtctgcaaagaccgaaactcggcatcaaccgcatcacgg	
ilvN. seq	TTGTTGTCGACGCCGACGAGCTCAACATTGAGCAGATCACCAGCAGCTCAACAAGCTGATCCCGGTGCTCAAAGTCGTG	240
ilvNM. seq	TTGTTGTCGACGCCGACGAGCTCAACATTGAGCAGATCACCAGCAGCTCAACAAGCTGATCCCGGTGCTCAAAGTCGTG	240
Consensus	ttgttgtcgacgccgacgagctcaacattgagcagatcaccagcagctcaacaagctgacccccgtgctcaaagtctgt	
ilvN. seq	CGACTTGATGAAGAGACCCTATCGCCCGCGCAATCATGCTGGTTAAGGTTTCTGCGGACAGCACCACCGTCCGCAGAT	320
ilvNM. seq	CGACTTGATGAAGAGACCCTATCGCCCGCGCAATCATGCTGGTTAAGGTTTCTGCGGACAGCACCACCGTCCGCAGAT	320
Consensus	cgacttgatgaagagaccactatcgcccgcgcaatcatgctggttaaggtttctgcgacagcaccacccgctccgcagat	
ilvN. seq	CGTCGACGCCGCGAACAATCTTCCGCGCCGAGTCTGTCGACGTGGTCCAGACTCTGTGGTTATTGAATCCACAGGCACCC	400
ilvNM. seq	CGTCGACGCCGCGAACAATCTTCCGCGCCGAGTCTGTCGACGTGGTCCAGACTCTGTGGTTATTGAATCCACAGGCACCC	400
Consensus	cgtcgacgccgcgcaaatcttccgccccgagtcgtcgacgtggctccagactctgtggttattgaatccacaggcaccc	
ilvN. seq	CAGGCAAGCTCCGCGCACTGCTTGACGTGATGGAACCAATTCGGAATCCGCGAACTGATCCAATCCGGACAGATTGCACCTC	480
ilvNM. seq	CAGGCAAGCTCCGCGCACTGCTTGACGTGATGGAACCAATTCGGAATCCGCGAACTGATCCAATCCGGACAGATTGCACCTC	480
Consensus	caggcaagctccgcgcaactgcttgacgtgatggaaccattcggaaatccgcgaaactgatccaatccggacagattgacactc	
ilvN. seq	AACCGCGGTCCGAAAGACCATGGCTCCGGCCAAAGATCTAA	518
ilvNM. seq	AACCGCGGTCCGAAAGACCATGGCTCCGGCCAAAGATCTAA	518
Consensus	aaccgcggtccgaaagaccatggctccggccaaagatctaa	

图 4 AHAS 调节亚基编码基因 *ilvN* 突变构建测序结果

Fig. 4 The sequencing results of the mutated AHAS regulatory subunit coding gene *ilvN*.

可以看出, *ilvN* 点突变构建成功。将上述重组质粒转入到 VWB-1 中进行摇瓶发酵, 以比较不同的 AHAS 对菌株 L-缬氨酸产量的影响 (图 5)。如图 5A 所示, *ilvBN* 的表达对菌株生长均没有影响, 进入到对数生长后期以及稳定期, 含有重组质粒的菌株对葡萄糖的消耗逐渐增加, 这是因为 *ilvBN* 的表达促进细胞合成 L-缬氨酸, 对底物葡萄糖的需求能力加强。分析菌株发酵液中的 L-缬氨酸含量, 如图 5B 所示, ATCC 13869 和 VWB-1 来源的 *ilvBN* 的过量表达均能够提高菌株的 L-缬氨酸产量, 而且在同等发酵条件下, 表达含有突变位点 M13 的 *ilvBN* 基因的重组质粒对菌株 L-缬氨酸产量的提升效果更为明显。由此表明, *IlvN* 20–22 位氨基酸的突变能够更好地促进细胞代谢产 L-缬氨酸, 对 L-缬氨酸生产有利。在之前的测序比对中, 来源于 VWB-1 的 AHAS 与野生型 AHAS 相比存在 9 个氨基酸位点的突变, 其中 8 个突变位点位于该酶催化亚基 *IlvB*, 分别为 K30Q、G128S、A139V、H213R、A226S、Y252H、T362S、V562A, 另外有一个突变位点 H47L 位于调节亚基 *IlvN*<sup>[16]</sup>。相较于野生型来源的 *ilvBN* 和 *ilvBN*<sup>M13</sup>, VWB-1 来源的 *ilvBN*<sub>1</sub> 和 *ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup> 的表

达对 L-缬氨酸产量提升的效果更为明显, 推测原因可能是由于 AHAS 活性中心存在的突变位点加强了该酶与底物的结合能力<sup>[24]</sup>, 从而更利于发挥酶的催化功能。选用含有该重组质粒的菌株 VWB-1/pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup> 作为进一步代谢改造的出发菌株。

### 2.3 L-缬氨酸主代谢通路强化

为了进一步提高菌株的 L-缬氨酸生产能力, 对 L-缬氨酸合成代谢相关的一系列基因进行过量表达。谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸的合成途径如图 2 所示, 从丙酮酸出发, L-缬氨酸的合成代谢主要经由乙酰羟酸合酶 (AHAS)、乙酰羟酸同分异构酶 (AHAIR)、二羧酸脱水酶 (DHAD) 和支链氨基酸转氨酶 (TA) 四个主要酶的催化下完成。已经有报道表明, 相关基因的过量表达能够提高谷氨酸棒状杆菌的产 L-缬氨酸水平<sup>[25–27]</sup>。本研究将 AHAIR 编码基因 *ilvC*、DHAD 的编码基因 *ilvD*、TA 编码基因 *ilvE* 通过酶切连接, 串联入载体 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>, 构建得到 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CD 和 pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CE, 将上述质粒转入 VWB-1 中, 进行摇瓶发酵实验。结果如图 6 所示, 在消耗相同葡萄糖的情况下,

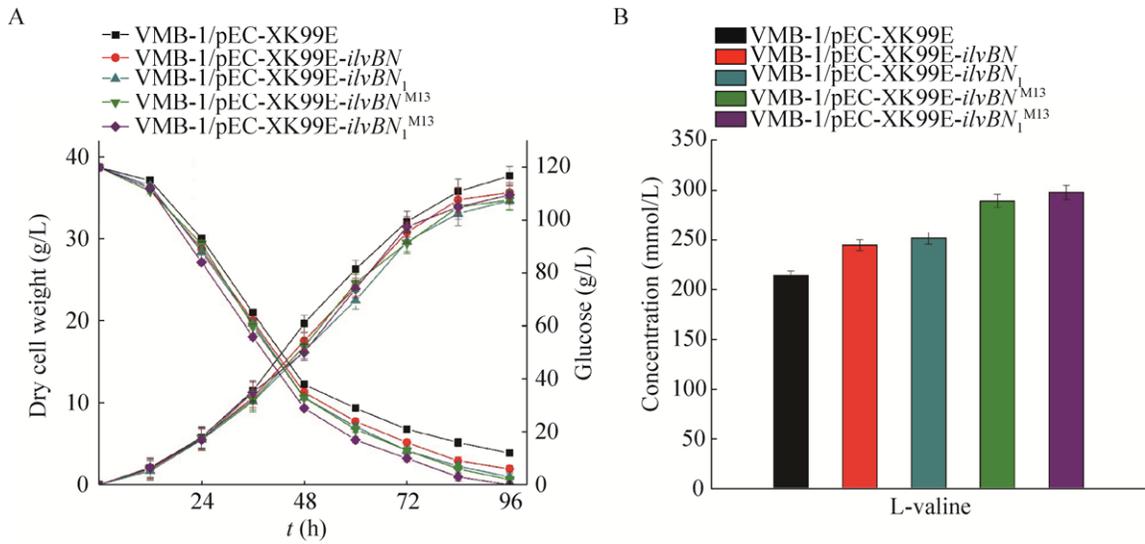


图 5 抗反馈抑制 AHAS 的表达对 L-缬氨酸产量影响 (A: 菌株生长; B: L-缬氨酸产量)

Fig. 5 Influence of the feedback resistant AHAS overexpression over the production of L-valine. (A) Growth curve and glucose consumption. (B) L-valine production level.

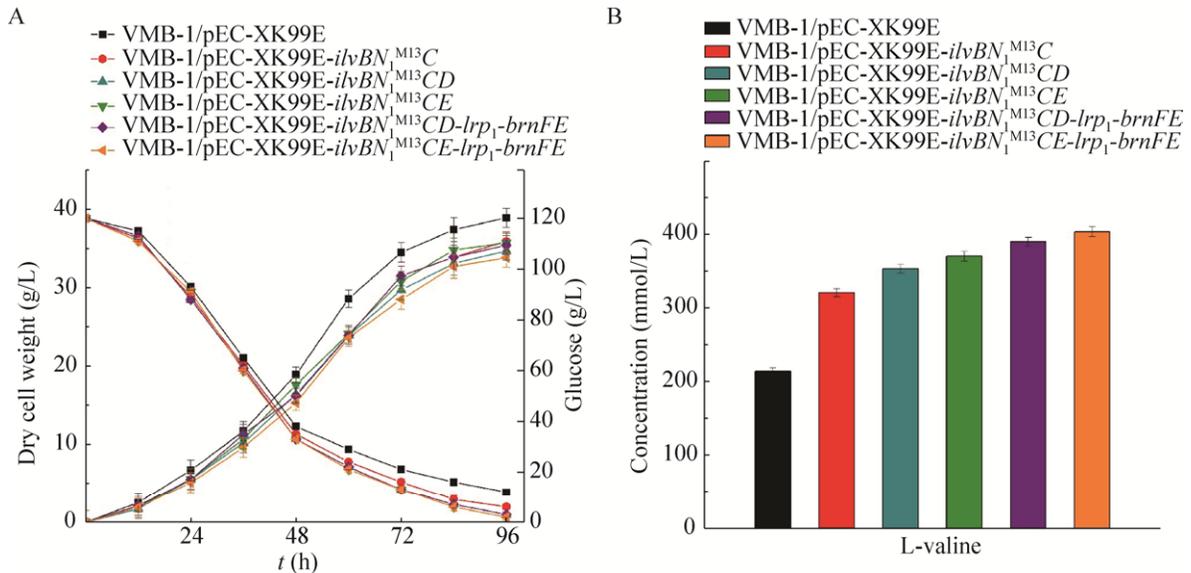


图 6 L-缬氨酸合成途径和转运途径关键基因的表达对产量的影响

Fig. 6 Effect of the biosynthesis and transport related genes overexpression over the production of L-valine. (A) Growth curve and glucose consumption. (B) L-valine production level.

菌株 VWB-1/pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>C 的 L-缬氨酸产量达到了 321.1 mmol/L, 相较于 VWB-1/pEC-XK99E (214.3 mmol/L) 提高了 49.8%, 而菌株 VWB-1/pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CD 以及 VWB-1/pEC-XK99E-

*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CE 的 L-缬氨酸产量则分别为 353.4 mmol/L 和 370.5 mmol/L, 相较于 VWB-1/pEC-XK99E 对比分别提高了 64.9% 和 72.9%。由此证明, VWB-1 L-缬氨酸合成途径关键基因 *ilvC*、*ilvD* 和 *ilvE* 的

过量表达,均能够有效地提高谷棒菌株产 L-缬氨酸的能力。

#### 2.4 提升 L-缬氨酸胞外转运能力

细胞内 L-缬氨酸的积累会抑制相关酶的活性,对 L-缬氨酸生产不利,因此 L-缬氨酸在细胞体内合成后需要迅速地分泌到细胞外。在谷氨酸棒状杆菌中,负责 L-缬氨酸胞外分泌的蛋白为分别由 *brnF* 和 *brnE* 编码的膜转运酶 BrnF 和 BrnE, BrnFE 同时也是细胞内 L-亮氨酸、L-异亮氨酸和 L-甲硫氨酸的转运蛋白,且 *brnFE* 的表达需要调控因子 *lrp* 的存在<sup>[28]</sup>。陈诚等在前期测序研究发现, VWB-1 来源的 *lrp1* 基因编码的 Lrp1 蛋白相比于 ATCC 13869 来源的 Lrp 有 1 个点突变 Arg39Trp, *lrp* 和 *brnFE* 的共表达能够促进细胞 L-异亮氨酸、L-缬氨酸等的生产<sup>[21,29]</sup>。将来源于 ATCC 13869 和 VWB-1 的 *lrp1* 基因分别在 VWB-1 中进行表达,发现两者均能提高细胞产 L-缬氨酸的能力,且后者的作用更为明显。另外, Lrp1 的表达能促进细胞内与 L-缬氨酸合成和转运相关的基因 *ilvBC*、*ilvD*、*lrp* 和 *brnFE* 等的上调。为了提高细胞的 L-缬氨酸胞外运输能力,我们以陈诚等<sup>[29]</sup>构建的质粒 pJYW-4-*lrp1-brnFE* 为模板,扩增得到 *lrp1-brnFE*,与前述构建的重组载体 pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CD 以及 pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CE 进行串联,构建得到 pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CD-*lrp1-brnFE* 以及 pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CE-*lrp1-brnFE*,将重组质粒转入到 VWB-1 中,进行摇瓶发酵实验。图 6B 是重组菌株产 L-缬氨酸能力比较,可以看出, VWB-1/pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CD-*lrp1-brnFE* 以及 VWB-1/pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CE-*lrp1-brnFE* 的 L-缬氨酸产量相较于没有 *lrp1-brnFE* 过表达菌株均有所提高,分别达到 390.1 mmol/L 和 403.8 mmol/L,表明 *lrp1* 和 *brnFE* 的共表达能够提高谷棒菌株的产 L-缬氨酸水平。通过与 *lrp* 和 *brnF* 的启动子的转录融合表达分

析,3 种支链氨基酸和 L-甲硫氨酸刺激 *brnFE* 表达时需要调控因子 Lrp 的存在<sup>[28]</sup>。由于 BrnFE 负责细胞内 L-缬氨酸的胞外转运,且 Lrp1 对 *brnFE* 的表达有正向的调控作用,因此, *lrp1* 和 *brnFE* 的共表达能够提高谷棒菌株 VWB-1 胞内的 BrnFE 蛋白水平,从而提高细胞支链氨基酸转运能力。细胞内合成的过量的 L-缬氨酸被 BrnFE 大量的转移到胞外,同时加快了 L-缬氨酸的合成速度,从而更有利于 L-缬氨酸生产。

#### 2.5 L-缬氨酸合成及转运途径相关基因的共表达以提高 L-缬氨酸产量

作者通过基因敲除获得了 VWB-1 的丙氨酸氨基转移酶编码基因 *alaT* 的敲除突变株 VWB-2,降低杂酸丙氨酸生成的同时减少了丙氨酸途径对 L-缬氨酸合成底物丙酮酸的竞争。并且通过构建重组质粒的方式,将细胞中参与 L-缬氨酸代谢合成相关基因和转运相关基因进行过量表达,显著提高了细胞了 L-缬氨酸合成能力和转运水平。为了更好地提高细胞产 L-缬氨酸的水平,同时降低杂酸丙氨酸的含量,我们将对 L-缬氨酸产量提高作用最为显著的质粒 pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CE-*lrp1-brnFE* 转入到 VWB-2 中,构建得到 VWB-2/pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CE-*lrp1-brnFE*。摇瓶水平发酵表明,上述菌株的 L-缬氨酸产量相较于 VWB-1/pEC-XK99E-*ilvBN1*<sup>M13</sup>CE-*lrp1-brnFE* 有进一步提高,且菌株发酵液中的杂酸丙氨酸含量由 30.5 mmol/L 下降为 5.3 mmol/L,降幅达到 82.6%。进一步对该菌株进行 5 L 罐发酵实验,检测菌株在发酵过程中各个时期的生长特性、糖耗水平以及产 L-缬氨酸能力。如图 7 所示,当发酵进行到 60 h 时,由于葡萄糖即将耗尽,因此进行糖液的补充,提供碳源以使菌株继续生长和产酸。发酵 96 h 后,菌株的细胞干重达到 47.2 g/L, L-缬氨酸产量达到 461.4 mmol/L,相较于原始菌株提高了 115.3%,产率 0.564 g/(L·h),比产量 1.162 g/(L·g DCW),

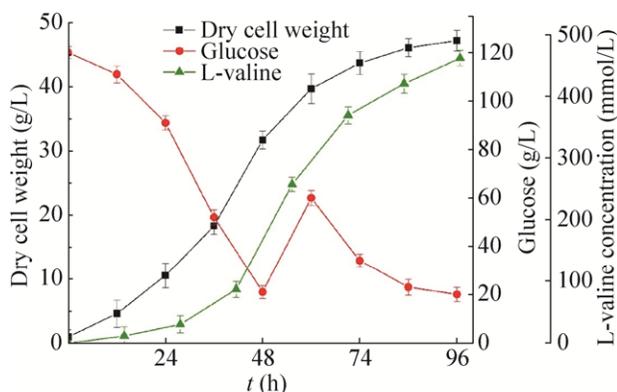


图 7 5 L 罐水平检测菌株生长及生产性能

Fig. 7 Growth and L-valine production performance detection of the recombinant strain in 5 L fermentator.

糖酸转化率达到 0.312 g/g 葡萄糖。当发酵进入到 96 h 时, 菌株仍然维持比较高的生长和耗糖状态, 且产 L-缬氨酸水平仍有上升趋势。考虑到发酵周期过度延长可能降低整个发酵过程的产物得率, 所以可选择在 96 h 时结束发酵。当然, 该菌株产 L-缬氨酸的水平仍有望进一步提高, 后期可以进行更深入的代谢工程改造, 并对发酵培养基的成分以及发酵策略进行优化, 进一步提高菌株产量。

### 3 讨论

作为一种重要的支链氨基酸, L-缬氨酸的工业生产一直备受关注。目前, 微生物发酵法正取代直接提取法和化学合成法而成为 L-缬氨酸生产的主要方法。但是许多工业上应用的 L-缬氨酸生产菌株为多次诱变筛选获得, 带来的二次有害突变会导致菌株生长缓慢、糖耗降低、杂酸等副产物增多, 具有盲目性和不确定性。因此, 合理、高效的设计在谷氨酸棒状杆菌代谢工程改造中便显得尤为重要, 生产菌株不仅应该有较高的 L-缬氨酸生产能力, 还要有最少化的副产物积累, 从而简化随后的分离和纯化过程, 减少生产成本。例如, 溶氧速率对生物反应过程有较大影响, 进行菌株改造的时候, 需要对此加以考虑<sup>[30]</sup>。微生

物分子生物学的发展使人们重新认识了 L-缬氨酸生产菌株, DNA 重组技术和诱导技术的出现促使代谢工程取代传统育种成为主流的菌株改造策略。近年来, 利用创新的基因编辑技术如 CRISPR/Cas9 系统, 研究人员可以在谷氨酸棒状杆菌中快速高效地进行基因编辑, 包括基因敲除、插入和替换等, 为代谢途径的改造提供了有力的工具, 以此促进谷氨酸棒状杆菌的代谢工程育种进程<sup>[31-33]</sup>。深入了解 L-缬氨酸生物合成的代谢和调节机制对谷氨酸棒状杆菌整体代谢工程策略的设计至关重要, 未来的研究需要更多的关注谷氨酸棒状杆菌细胞的代谢网络。随着系统生物学和合成生物技术的快速发展, 合理利用转录组学、蛋白组学、代谢组学和计算机建模等现代生物技术, 解析 L-缬氨酸生产菌株繁杂的合成代谢途径以及多重的调控机制, 由点到面、从局部到整体对生产菌株进行改造, 提升生产性能<sup>[3,34]</sup>。

本研究发现谷氨酸棒状杆菌中丙氨酸氨基转移酶基因 *alaT* 的缺失能够降低 L-缬氨酸生产菌株发酵液丙氨酸的含量, 以此削弱细胞内丙氨酸途径对 L-缬氨酸代谢途径关键前体丙酮酸的竞争, 同时降低下游分离纯化的成本。Wada 等<sup>[35]</sup>敲除了 L-缬氨酸生产菌株 ATCC13032 $\Delta$ *ilvA* $\Delta$ *panBC* pJC1*ilvBNCD* 中的 *alaT* 基因, 同样极大地降低了细胞内 L-丙氨酸的积累。串联表达 L-缬氨酸合成途径关键基因 *ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>、*ilvC*、*ilvD*、*ilvE*, 能够将细胞内的碳代谢流引入 L-缬氨酸途径, 在 L-缬氨酸生产菌株代谢改造中非常关键<sup>[36]</sup>。在减少副产物、加强主通路碳代谢流的基础上, 本研究在谷氨酸棒状杆菌中过表达 L-缬氨酸转运途径相关基因 *brnFE* 及其调控蛋白 *lrp*<sub>1</sub>, 能够显著提高细胞产 L-缬氨酸的能力及其转运能力, 从而提高菌株 L-缬氨酸产量。Chen 等<sup>[21]</sup>在 ATCC 13869 过表达 *lrp*<sub>1</sub>-*brnFE*, 同样提高了菌株的 L-缬氨酸生产性能。对菌株 VWB-2/pEC-XK99E-*ilvBN*<sub>1</sub><sup>M13</sup>CE-*lrp*<sub>1</sub>-*brnFE* 进行补料批发酵实验, 发酵 96 h 时

L-缬氨酸产量达到 461.4 mmol/L, 糖酸转化率达到 0.312 g/g 葡萄糖, 使 L-缬氨酸产量相较于原始菌株大幅度提高, 同时菌株发酵液中的杂酸液降到较低的水平。通过与已经报道的 L-缬氨酸高产菌株进行比较, 该菌株 L-缬氨酸产量处于中游水平, 仍有较大提升空间<sup>[37]</sup>。另外, 本研究构建的重组菌株均通过导入外源质粒的方法来提高关键基因的表达水平, 后期还可以通过染色体重组技术, 例如将野生型基因进行突变使其能够抗支链氨基酸反馈抑制、增加重要基因在染色体上的拷贝数、加强野生型启动子的活性等, 进一步提高菌株生产性能。

致谢: 感谢 Institute of Biotechnology (Forschungszentrum Julich) Lothar Eggeling 教授为本研究提供 *alaT* 的敲除载体 pK19mobsacBalaT。

## REFERENCES

- [1] Karau A, Grayson I. Amino acids in human and animal nutrition//Zorn H, Czermak P, Eds. Biotechnology of Food and Feed Additives. Berlin: Springer, 2014: 189–228.
- [2] Takpho N, Watanabe D, Takagi H. High-level production of valine by expression of the feedback inhibition-insensitive acetohydroxyacid synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2018, 46: 60–67.
- [3] 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.
- [4] Park Y, Park JH, Park S, et al. Enhanced cellular uptake and pharmacokinetic characteristics of doxorubicin-valine amide prodrug. *Molecules*, 2016, 21(10): E1272.
- [5] Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol*, 2003, 104(1/3): 155–172.
- [6] Nielsen J. Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 58(2/3): 125–132.
- [7] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, 252(5013): 1668–1675.
- [8] Radmacher E, Vaitsikova A, Burger U, et al. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2246–2250.
- [9] Xu DQ, Tan YZ, Huan XJ, et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(1): 86–92.
- [10] Xu DQ, Tan YZ, Shi F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2010, 64(2): 85–91.
- [11] Xu DQ, Tan YZ, Li Y, et al. Construction of a novel promoter-probe vector and its application for screening strong promoter for *Brevibacterium flavum* metabolic engineering. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(4): 961–968.
- [12] Tan YZ, Xu DQ, Li Y, et al. Construction of a novel *sacB*-based system for marker-free gene deletion in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2012, 67(1): 44–52.
- [13] Hu JY, Tan YZ, Li YY, et al. Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2013, 70(3): 303–313.
- [14] Holátko J, Elišáková V, Prouza M, et al. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation. *J Biotechnol*, 2009, 139(3): 203–210.
- [15] Wang XY. Metabolic engineering in corynebacterium glutamicum to increase L-valine production. *J Food Sci Biotechnol*, 2012, 31(3): 225–231 (in Chinese). 王小元. 谷氨酸棒杆菌生产缬氨酸的代谢工程研究进展. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(3): 225–231.
- [16] Zhang HL, Li YY, Wang CH, et al. Understanding the high L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* VWB-1 using transcriptomics and proteomics. *Sci Rep*, 2018, 8: 3632.
- [17] Liu Q, Ouyang SP, Kim J, et al. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, 2007, 132(3): 273–279.
- [18] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A*

- Laboratory Manual. 3rd ed. New York: CSH Laboratory Press, 2001.
- [19] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol*, 2003, 104(1/3): 5–25.
- [20] Marienhagen J, Eggeling L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases AlaT and AvtA and impact on L-valine production. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(24): 7457–7462.
- [21] Chen C, Li YY, Hu JY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for L-valine production. *Metab Eng*, 2015, 29: 66–75.
- [22] Yin L, Shi F, Hu X, et al. Increasing l-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* by overexpressing global regulator Lrp and two-component export system BrnFE. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(5): 1369–1377.
- [23] Blombach B, Hans S, Bathe B, et al. Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(2): 419–427.
- [24] Elišáková V, Pátek M, Holátko J, et al. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 207–213.
- [25] Blombach B, Arndt A, Aucter M, et al. L-valine production during growth of pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* in the presence of ethanol or by inactivation of the transcriptional regulator SugR. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(4): 1197–1200.
- [26] Bartek T, Zönnchen E, Klein B, et al. Analysing overexpression of L-valine biosynthesis genes in pyruvate-dehydrogenase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(3): 263–270.
- [27] Hou XH, Ge XY, Wu D, et al. Improvement of L-valine production at high temperature in *Brevibacterium flavum* by overexpressing *ilvEBN<sub>r</sub>C* genes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(1): 63–72.
- [28] Lange CT, Mustafi N, Frunzke J, et al. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the *brnFE* operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids. *J Biotechnol*, 2012, 158(4): 231–241.
- [29] Chen C, Li YY, Yin LH, et al. Expression of global regulator Lrp facilitates L-valine production in *Corynebacterium glutamicum*. *J Food Sci Biotechnol*, 2016, 35(9): 920–927 (in Chinese).  
陈诚, 李颜颜, 尹良鸿, 等. 全局调控因子 Lrp 的表达强化谷氨酸棒状杆菌发酵生产 L-缬氨酸. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(9): 920–927.
- [30] Kaß F, Prasad A, Tillack J, et al. Rapid assessment of oxygen transfer impact for *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014, 37(12): 2567–2577.
- [31] Cleto S, Jensen JV, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi). *ACS Synth Biol*, 2016, 5(5): 375–385.
- [32] Cho JS, Choi KR, Prabowo CS, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2017, 42: 157–167.
- [33] Peng F, Wang XY, Sun Y, et al. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 201.
- [34] Poetsch A, Haußmann U, Burkovski A. Proteomics of corynebacteria: from biotechnology workhorses to pathogens. *Proteomics*, 2011, 11(15): 3244–3255.
- [35] Wada M, Hijikata N, Aoki R, et al. Enhanced valine production in *Corynebacterium glutamicum* with defective H<sup>+</sup>-ATPase and C-terminal truncated acetohydroxyacid synthase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(11): 2959–2965.
- [36] Hasegawa S, Suda M, Uematsu K, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(4): 1250–1257.
- [37] Wang X, Zhang H, Quinn PJ. Production of L-valine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, (1): 1–12.

(本文责编 郝丽芳)