

TCA 循环关键节点对 L-谷氨酸合成的影响

乔郅钠, 徐美娟, 龙梦飞, 杨套伟, 张显, 中西秀树, 饶志明

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

乔郅钠, 徐美娟, 龙梦飞, 等. TCA 循环关键节点对 L-谷氨酸合成的影响. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2113–2125.

Qiao ZN, Xu MJ, Long MF, et al. Effect of key notes of TCA cycle on L-glutamate production. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2113–2125.

摘要: 谷氨酸是一种重要的氨基酸, 其衍生出来的高值化产品具有广泛的应用, 市场需求量巨大。文中通过对出发菌株谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* E01 和谷氨酸高产菌 *C. glutamicum* G01 进行转录组测序与重测序分析, 挑选中心代谢途径中转录水平和基因水平上存在差异的基因进行研究, 以挖掘出对谷氨酸合成影响较大的基因进一步提高谷氨酸的产量。草酰乙酸节点和 α -酮戊二酸节点在谷氨酸合成中扮演着重要角色, 探索研究了草酰乙酸节点和 α -酮戊二酸节点对谷氨酸生产的扰动影响。综合以上实验结果构建的整合菌株, 5 L 发酵罐发酵过程中其菌体生长速率较原始菌略有降低, 但 48 h 的谷氨酸产量高达 (136.09 ± 5.53) g/L, 较原始菌的 (93.53 ± 4.52) g/L 提高了 45.5%; 糖酸转化率提高至 58.9%, 较原始菌的 45.2% 提高了 13.7%。可见, 上述实验策略的应用在一定程度上提高了谷氨酸产量和糖酸转化率, 为谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造提供了理论基础。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 谷氨酸, 草酰乙酸节点, α -酮戊二酸节点, CRISPR/dCas9, 核糖体结合位点优化

Effect of key notes of TCA cycle on L-glutamate production

Zhina Qiao, Meijuan Xu, Mengfei Long, Taowei Yang, Xian Zhang, Nakanishi Hideki, and Zhiming Rao

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

Abstract: Glutamic acid is an important amino acid with wide range of applications and huge market demand. Therefore, by performing transcriptome sequencing and re-sequencing analysis on *Corynebacterium glutamicum* E01 and high glutamate-producing strain *C. glutamicum* G01, we identified and selected genes with significant differences in transcription and gene levels in the central metabolic pathway that may have greatly influenced glutamate synthesis and further increased glutamic acid yield. The oxaloacetate node and α -ketoglutarate node play an important role in glutamate synthesis. The

Received: January 20, 2020; **Accepted:** March 2, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900300), National Natural Science Foundation of China (No. 31770058), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20181205), Key Research and Development Plan of Ningxia Hui Autonomous Region (No. 2019BCH01002), Organization Department of the China Ten Thousand Talents Program Science and Technology Innovation Leading Talent Project.

Corresponding authors: Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; Fax: +86-510-85918516; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn
Nakanishi Hideki. Tel: +86-510-85910001; E-mail: hideki@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900300), 国家自然科学基金 (No. 31770058), 江苏省自然科学基金 (No. BK20181205), 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2019BCH01002), 中组部万人计划科技创新领军人才项目资助。

oxaloacetate node and α -ketoglutarate node were studied to explore effect on glutamate production. Based on the integrated strain constructed from the above experimental results, the growth rate in a 5-L fermenter was slightly lower than that of the original strain, but the glutamic acid yield after 48 h reached (136.1 ± 5.53) g/L, higher than the original strain (93.53 ± 4.52) g/L, an increase by 45.5%; sugar-acid conversion rate reached 58.9%, an increase of 13.7% compared to 45.2% of the original strain. The application of the above experimental strategy improved the glutamic acid yield and the sugar-acid conversion rate, and provided a theoretical basis for the metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, glutamic acid, oxaloacetate node, α -ketoglutarate node, CRISPR/dCas9, ribosome binding site optimization

谷氨酸是一种重要的氨基酸,在食品、医药、饲料和化妆品等行业具有广泛应用,市场需求量大^[1],且谷氨酸高值化产品(如聚谷氨酸^[2]、 γ -氨基丁酸^[3]等)已成为目前研究热点,因此选育和开发一株谷氨酸高产菌株是非常有研究意义的,谷氨酸棒杆菌中谷氨酸的生物合成途径如图 1 所示。实验室前期以谷氨酸生产菌株谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* E01 (其谷氨酸产量可达 40.8 g/L) 为出发菌株,经逐级诱变(包括基因组改组技术和等离子诱变 ARTP 等)筛选,获得 1 株谷氨酸产量较高的菌株 *C. glutamicum* G01,其产量高达 93.53 g/L。对 *C. glutamicum* E01 和 *C. glutamicum* G01 进行全局 RNA-seq 和重测序分析,找出引起谷氨酸高产的关键基因,进一步对 *C. glutamicum* G01 菌株进行代谢改造以改善谷氨酸产量。

在谷氨酸棒杆菌中,中心代谢途径对谷氨酸的生产非常重要。已有研究表明,谷氨酸高产菌株中 α -酮戊二酸脱氢酶复合体 ODHC (由 3 个亚基组成,其中 E1 由 *odhA* 基因编码, E2 由 *aceF* 基因编码, E3 由 *lpd* 基因编码) 酶活水平较低^[4], ODHC 能够催化谷氨酸的前体物质 α -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,有利于谷氨酸的大量合成^[5]。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PEPC (编码基因 *ppc*) 在 TCA 循环到氨基酸合成的碳流中起关键作用,该酶被认为是谷氨酸棒杆菌氨基酸生产菌株的重要潜在靶标,近年来,已有很多研究者研究了其对谷氨酸生产的影响^[6-8]。柠檬酸合酶 CS (编码基因 *glcA*) 催化

TCA 循环的初始反应,控制进入 TCA 循环的速度,CS 的过表达可以将更多的碳通量重定向到 TCA 循环中^[9]。异柠檬酸脱氢酶 ICD (编码基因 *icd*) 能够将异柠檬酸氧化去甲酸酯化为谷氨酸合成前体物质 α -酮戊二酸^[10],相关研究表明,ICD 的过表达可能会使更多的碳流量流向 α -酮戊二酸以积累更多的 α -酮戊二酸^[11]。

本研究通过对 *C. glutamicum* E01 和 *C. glutamicum* G01 进行转录组与重测序分析,挑选中心代谢途径中转录水平和基因水平上存在差异的基因进行研究,测试其对谷氨酸生产的扰动影响。结合核糖体结合位点优化(RBS 优化)和 CRISPR/dCas9 敲弱系统构建了谷氨酸高产菌株,实现了谷氨酸产量和糖酸转化率的提高,为谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株 *C. glutamicum* E01 (专利公开号为 103215198B)、*C. glutamicum* G01 (中国典型培养物保藏中心,保藏号: M2013418)、大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) (基因型: F *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)* λ (DE3 *lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*), 表达宿主) 和质粒 pDXW-10 (*E. coli-C. glutamicum* 穿梭表达质粒, P_{tac} 启动子, Km^r)、pFSC-*dCas9* (pXMJ19 包含 *dCas9* 基因、SD 序列和 P_{tac} 启动子, Cm^r) 为实验室保存, pFST 质粒 (pEC-XK99E 温敏型质粒, P_{trc} 启动子, Km^r) 为江南大学白仲虎教授馈赠。

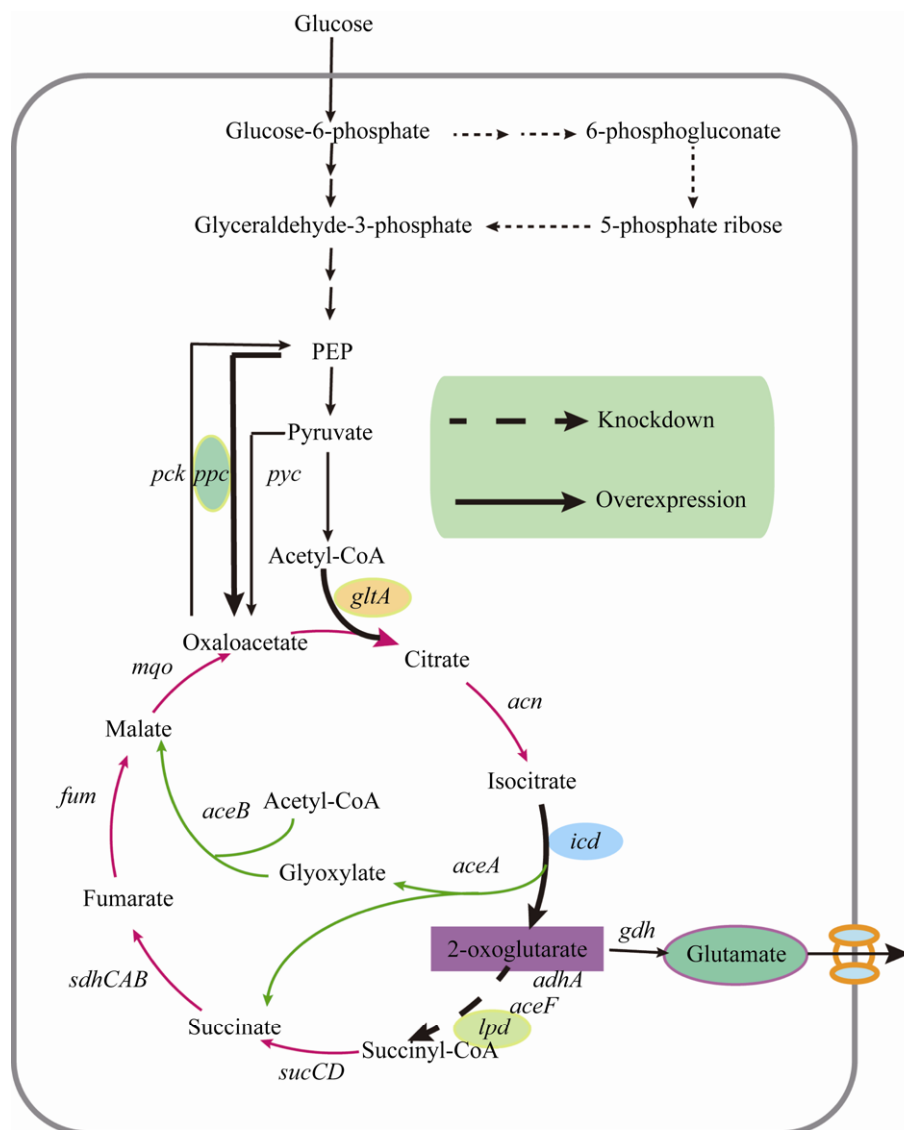


图 1 谷氨酸棒杆菌中谷氨酸生物合成途径

Fig. 1 Glutamate biosynthetic pathway in *C. glutamicum*.

1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 固体培养基添加琼脂 15–20, 根据需要加入相应浓度抗生素。

LBG 培养基 (g/L): LB 培养基+葡萄糖 5, 固体培养基添加琼脂 15–20, 根据需要加入相应浓度抗生素; 谷氨酸棒杆菌平板活化和诱导表达用。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 25, K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4$ 0.6, 玉米浆 30, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005,

$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.005, 尿素 2.5 (与其他组分分开灭菌), 用 200 g/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.0, 115 °C 灭菌 20 min; 谷氨酸棒杆菌上罐发酵养种子用。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 140, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4$ 0.6, 玉米浆 5.0, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.005, 尿素 7.0 (与其他组分分开灭菌), 用 200 g/L NaOH 调 pH 至 7.0, 115 °C 灭菌 20 min; 谷氨酸棒杆菌发酵用。

补料培养基: 80%葡萄糖; 谷氨酸棒杆菌发酵

补料用。

1.3 引物

本研究引物如表 1 所示。

1.4 RNA-seq 与重测序

将出发菌株 *C. glutamicum* E01 和谷氨酸高产菌 *C. glutamicum* G01 进行 5 L 发酵罐发酵, 取对数期 (发酵 18 h, 胞外 L-谷氨酸开始积累) 的发酵样品, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 液氮冻存 10 min 后, 置于 -80 °C 冰箱储存, 送苏州金唯

智有限公司进行总 RNA-seq 和重测序分析。

1.5 重组菌株的构建与表达

1.5.1 过表达菌株的构建与表达

以 *C. glutamicum* G01 基因组为模板, 以相应引物为模板 PCR 扩增获得各基因片段, 回收后与经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切获得的 pDXW-10 线性化载体进行同源重组连接, 各连接产物分别转化 *E. coli* BL21(DE3)。筛选后, 提取重组质粒进行 PCR 验证, 送苏州金唯智有限公司进行测序分析。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primes used in this research

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction site
pDXW-10-ppc-F	TTCACACAGGAAACAG <u>AATTC</u> -Sequence of Synthetic RBS-ATGACTGATTTTTACGCGATGACA Sequence of Synthetic RBS 1: AAAGGAGGTGCGC 2: AAAGGAGTTGCTT 3: AAAGGAGCGGTCC 4: AAAGGAGGGAAATC 5: AAAGGAGGTTGTC 6: AAAGGAGGCTACT	<i>EcoR</i> I
pDXW-10-ppc-R	CATCCGCCAAAACAG <u>AAGCTT</u> TTAGCCGGAGTTGCGCAGCGCA	<i>Hind</i> III
pDXW-10-gltA-F	TTCACACAGGAAACAG <u>AATTC</u> AAAGGAGGGAAATC ATGAGTGACAGCCAAGTC CGCAAAGGACTC	<i>EcoR</i> I
pDXW-10-gltA-R	CATCCGCCAAAACAG <u>AAGCTT</u> TTAGGTTCTCTCCGAAATGGGC	<i>Hind</i> III
pDXW-10-icd-F	TTCACACAGGAAACAG <u>AATTC</u> AAAGGAGGGAAATC TGGCTAAGATCATCTGG ACCCGCACCGAC	<i>EcoR</i> I
pDXW-10-icd-R	CATCCGCCAAAACAG <u>AAGCTT</u> TTACTTCTTCAGTGCGTCAACG	<i>Hind</i> III
dCas9-F	AGGAAACAGACCATG <u>AATTC</u> AAAGGAGGACA ACTAATGGATAAAAAGTATTC CATTGGCCTGGCA	<i>EcoR</i> I
dCas9-P _{trc} -R1 sgRNA-F	TGCACCGTGCAGTCGTTAGTCGCCACCCAG AGGAAACAGACCATG <u>AATTC</u> -N20-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA TAAGGCTAGTCC N20 Sequences: 1-TAGTACTCGGAGCCGGCCCC 2-CGGATGCACGACAATGACCC 3-ACACCTGCATTCTGTGCCC 4-AAACACGTATCCTTGAATGC 5-ATGAAAACCAACCCGACCC	<i>EcoR</i> I
sgRNA-R	TCCGCCAAAACAGCC <u>AAGCTT</u> AAAAAAGCACCGACCGACTCGGTGCCACTTTTT CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTT	<i>Hind</i> III
dCas9-P _{trc} -F1 dCas9-P _{trc} -R	CTGGGTGGCGACTAACGACTGCACGGTGCA TCCGCCAAAACAGCC <u>AAGCTT</u> AAAAAAGCACCGACCGACTCGG	<i>Hind</i> III
16S rRNA F	GCCCAGGTAAGGTTCTT	
16S rRNA R	GGTGTAGCGGTGAAATGC	
lpd F	CGTTGGAGGCGTTCATTA	
lpd R	GGAGACTTCAGCATCTTCAT	

Note: the underlined line indicates the restriction site, the bold is the RBS sequence.

验证正确的各重组质粒分别电转 *C. glutamicum* G01, 涂布卡那霉素平板进行筛选, 验证正确的重组菌株进行命名。

构建好的各重组谷氨酸棒杆菌及菌株 *C. glutamicum* G01 在 LBG 固体平板上划线活化后, 挑取单菌落接入 10 mL LBG 液体小瓶, 于 30 °C、180 r/min 培养 16–24 h 后按 1% 接种量转接至 50 mL LBG 液体培养基, 30 °C、180 r/min 培养 4–5 h 后, 添加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续于 30 °C、180 r/min 诱导表达 8–12 h 后, 4 °C 下离心收集菌体细胞。收集的细胞分别用 PBS 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 洗涤 2 次后, 重新悬浮于 PBS 缓冲液中, 控制菌体浓度一致的情况下, 用超声破碎仪破碎, 破碎液在 4 °C 下离心 20 min, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 分析, 所得粗酶液用于后续的酶活测定。

1.5.2 敲弱菌株的构建

以质粒 pFSC-*dCas9* 为模板, *dCas9*-F 和 *dCas9*-*P_{trc}*-R1 为引物进行 PCR, 扩增出含 *P_{trc}* 部分片段的 *dCas9* 基因片段。

以表 1 所列引物 (引物上设同源臂) PCR 扩增获得含不同 N20 序列的 sgRNA 片段, 胶回收后与经 *EcoR* I 酶切获得的 pFST 线性化载体进行同源重组连接并将各连接产物分别转化 *E. coli* BL21(DE3)。经筛选后, 提取重组质粒进行 PCR 验证, 将重组质粒分别命名为 pFST-S1、pFST-S2、pFST-S3、pFST-S4 和 pFST-S5, 即不同 sgRNA 载体构建完成^[12-14]。

之后, 以含 *P_{trc}* 部分片段的 *dCas9* 基因片段和 pFST-S1 (pFST-S2、pFST-S3、pFST-S4、pFST-S5) 重组质粒为模板进行融合 PCR^[15], 获得含 *dCas9*-*P_{trc}*-sgRNA 的融合片段, 胶回收后的各融合片段与经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切获得的 pFST 线性化载体进行同源重组连接并化转至 *E. coli* BL21(DE3)。经筛选后, 提取重组质粒进行 PCR 验证, 将重组质粒分别命名为 pFST-*dCas9*-S1、pFST-*dCas9*-S2、pFST-*dCas9*-S3、pFST-*dCas9*-S4 和 pFST-*dCas9*-S5。

将质粒 pFST-*dCas9*-S1、pFST-*dCas9*-S2、pFST-*dCas9*-S3、pFST-*dCas9*-S4 和 pFST-*dCas9*-S5 分别电转 *C. glutamicum* E01, 筛选后验证正确的重组菌株分别命名为 CG1、CG2、CG3、CG4 和 CG5。

1.6 相关酶的酶活测定

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶酶活测定: 采用苹果酸脱氢酶偶联法测定, 酶活定义为在 30 °C 下每分钟氧化 1 μmol NADH 所需的酶量为 1 U^[16]。

柠檬酸合酶酶活测定: 通过 5,5'-二硫代双 (2-硝基苯甲酸) 测定在 412 nm 下的吸光值^[9]。

异柠檬酸脱氢酶酶活测定: 酶活力定义为 30 °C 下每分钟催化底物 NADP⁺ 产生 1 μmol NADPH 所需的酶量^[17]。

LPD 酶活的测定: 于 30 °C 下进行反应, 每 5 min 读数 1 次, 连续测 15 min。酶活性单位定义为在上述反应条件下每分钟氧化 1 μmol NADH 所需的酶量为 1 U^[18-19]。

1.7 RT-qPCR

收集培养至对数期的细胞, 根据 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit 的使用说明书提取 RNA。使用 HiScript Q Select RT SuperMix for qPCR 试剂盒, 将 RNA (1 μg) 转录成 cDNA。使用 ABI QuantStudio™ 3D 通过实时 PCR 定量产物。反应混合物 (20 μL) 含有 10 μL 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和各 0.4 μL 基因的上下游引物 (表 1)。以 RNase-free ddH₂O 作为阴性对照, 验证 Mix 和引物有无污染。以基因组 DNA 作为阳性对照, 验证提取的 cDNA 有无污染。

1.8 重组菌株发酵

菌株经平板活化后, 挑取单菌落分别接入含 10 mL 种子培养基的 50 mL 摇瓶中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 24 h 至 *OD*₆₀₀ 约为 20.0 作为一级种子液。10 mL 一级种子液全部接入含 200 mL 种子培养基的 1.0 L 带挡板三角瓶中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 18 h 至 *OD*₆₀₀ 约为 30.0 作为二级种子液。二级种子全部接入装有 2.0 L 发酵培

培养基的 5 L 发酵罐中。发酵罐发酵温度 30 °C，搅拌转速 600 r/min，通气量 3 L/min，pH 7.0 (补加 50% 氨水自动控制)。发酵过程中当葡萄糖浓度降至约 30 g/L 时补加 80% 的葡萄糖溶液。

1.9 发酵过程中相关参数测定

发酵液菌体浓度适当稀释后，在 600 nm 波长下检测其吸光度， OD_{600} 代表菌体浓度，葡萄糖和谷氨酸含量用生物传感分析仪 SBA-40E 进行测定^[20-21]。

2 结果与分析

2.1 RNA-seq 数据分析

对 RNA-seq 的中心代谢途径相关基因进行集中分析，期望能够找到对谷氨酸产量有显著影响的基因。图 2 中对葡萄糖吸收的 3 个编码基因 *ptsG*、*ptsI* 和 *ptsH*，EMP 途径的 20 个相关基因，戊糖磷酸途径的 15 个相关基因和 TCA 循环的 15 个相关基因进行转录水平差异分析，其中 *lpd* 和 *icd* 基因转录水平下调显著，*gltA* 和 *ppc* 基因转录水平上调显著。

为了验证转录水平显著差异的基因 *lpd*、*icd*、*gltA* 和 *ppc* 在基因水平上是否发生变化，进行了重测序分析，结果显示，*lpd*、*icd*、*gltA* 和 *ppc* 基因的氨基酸序列均发生突变，在基因水平上发生了变化 (表 2)。

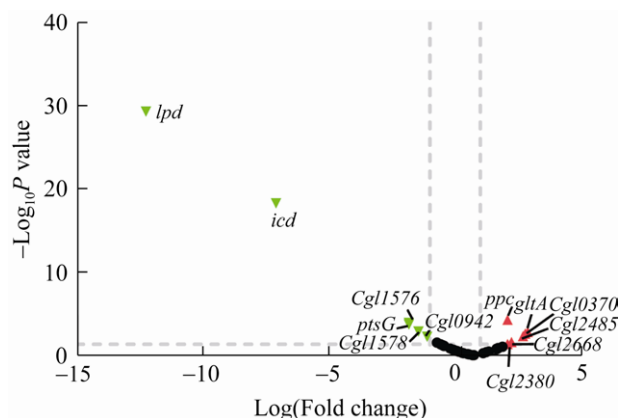


图 2 中心代谢路径基因表达差异图

Fig. 2 Difference map of gene expression in central metabolic pathway.

表 2 重测序比对结果

Table 2 Re-sequencing alignment results

Genes	<i>C. glutamicum</i> G01
<i>lpd</i>	K67R, I108T, L122I, T125A, I134T, D154E, F162Y, E295D, D305P, T341A, S359F, E370Q
<i>icd</i>	I372V
<i>gltA</i>	A4T, S79C, S156T, A243E, A252D
<i>ppc</i>	Q14R, Y85H, G241D, E267G, H274R, K303E, A310E, K383T, A408S, A433T, A441E, Q542R, D549G, R634K, A704T, L773F, T829R, R840H

以上分析所得差异基因主要位于 TCA 循环中草酰乙酸节点和 α -酮戊二酸代谢节点处，可见，这两个节点对谷氨酸生产影响较为显著，后面将展开研究。

2.2 草酰乙酸节点重组谷氨酸棒杆菌的构建

草酰乙酸 OAA 节点在谷氨酸合成途径中扮演着重要角色。因此，探索研究 OAA 节点处转录水平和基因水平均发生了变化的 *ppc* 和 *gltA* 基因在 *C. glutamicum* G01 中对生产谷氨酸的影响具有重要意义。

2.2.1 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*ppc* 菌株的构建和酶活力测定

首先，将参考文献[22]中效果较好的 RBS 序列用于 *ppc* 基因的优化表达，构建含不同 RBS 序列的 PEPC 过表达菌株 (G01-*ppc*1、G01-*ppc*2、G01-*ppc*3、G01-*ppc*4、G01-*ppc*5 和 G01-*ppc*6，原始菌株用 G01 表示)，测试 PEPC 酶活水平以确定最优 RBS 序列。

酶活测定结果显示，G01-*ppc*4 菌株的 PEPC 酶活为 (172.89±7.23) U/mL，较原始菌的 (38.52±2.87) U/mL 提高了 3.5 倍 (图 3)，RBS-4 序列的表达效果较好。采用 RBS-4 序列构建的重组菌株命名为 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*ppc*，RBS-4 序列将用于后面其他基因的过表达。

2.2.2 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* 菌株的构建、表达与酶活测定

将 RBS-4 序列用于 *gltA* 基因的过表达，PCR 鉴定结果如图 4A 所示，条带大小为 1 146 bp，与

gltA 基因大小相符, 即菌株 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* 构建成功。在控制菌体浓度一致的情况下, *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* 菌株中 CS 的表达量均明显高于对照菌株, 其大小约为 42.6 kDa, 即 CS 在 *C. glutamicum* G01 中成功表达 (图 4B)。

酶活测定结果显示, *C. glutamicum* G01/

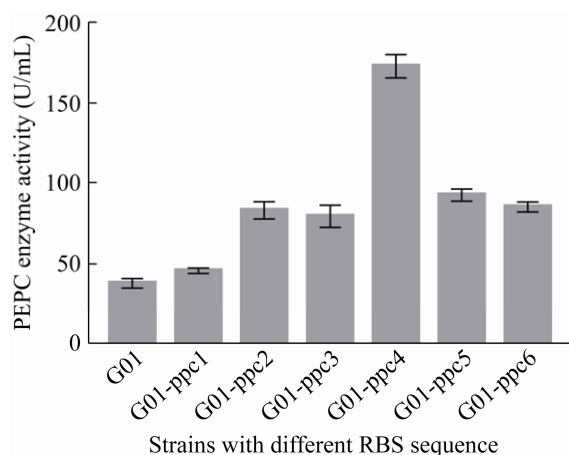


图 3 PEPC 过表达菌株的酶活水平

Fig. 3 Enzyme activity level of PEPC overexpression strains.

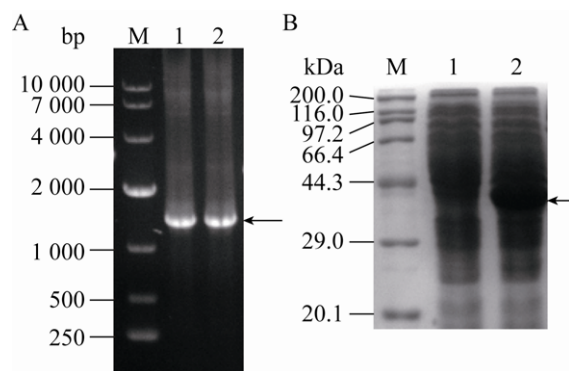


图 4 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* 菌株的 PCR 鉴定结果 (A) 和表达情况 (B)

Fig. 4 PCR results (A) and expression (B) of *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* strain. (A) M: 10 000 bp nucleic acid marker; 1 and 2: PCR results of *gltA* gene. (B) M: protein marker; 1: crude enzyme solution of control strain; 2: crude enzyme solution of *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* strain.

pDXW-10-*gltA* 菌株 CS 酶活为 (148.36 ± 2.56) U/mL, 较 *C. glutamicum* G01 的 (18.87 ± 1.68) U/mL 提高了约 6.9 倍, 即 *gltA* 基因在 *C. glutamicum* G01 中的过表达使得 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* 中的 CS 酶活提高。

2.3 α -酮戊二酸代谢节点重组谷氨酸棒杆菌的构建

降低 ODHC 复合体活性是将 α -酮戊二酸通量重定向至谷氨酸合成而不是琥珀酰 CoA 合成的一种必不可少的方法^[4,16]。敲除 *odhA* 虽然完全消除了 ODHC 活性, 但是会阻断 TCA 循环, 严重影响菌体生长^[5]。有研究者通过改变 RBS 序列^[23]或翻译起始密码子^[24], 或者使用 *odhA* 反义 RNA^[25]和 *odhA* 抑制蛋白 *OdhI*^[26-28]来降低 ODHC 活性。此外, 理论上异柠檬酸脱氢酶 ICD 可能会改变 α -酮戊二酸节点处的代谢流, ICD 酶活力的提高有利于 α -酮戊二酸的积累^[11]。因此, 接下来将会对异柠檬酸脱氢酶和 ODHC 的 E3 亚基展开研究, 探索其对谷氨酸生产的影响。

2.3.1 CRISPR/dCas9 系统用于 *C. glutamicum* E01 中 *lpd* 基因的弱化及弱化程度测试

从转录组测序结果看, *C. glutamicum* E01 菌株中 LPD 蛋白的表达量较高, 因此, 选择在该菌株中进行 *lpd* 基因弱化实验, 筛选出对 *lpd* 基因弱化程度最高的 sgRNA 后再在 *C. glutamicum* G01 中实验, 以获得谷氨酸产量的进一步提高。

酶活测定结果显示, LPD 敲弱菌株 CG1、CG2、CG3、CG4 和 CG5 中 LPD 酶活分别较原始菌下降了 3.1%、5.4%、21.1%、3.0% 和 6.0% (图 5A, 原始菌株用 CG0 表示)。RT-qPCR 结果显示 (图 5B), 各敲除菌株中 *lpd* 基因的转录水平均呈现一定程度的降低, CG3 菌株中 *lpd* 基因转录水平最低, 且相比于其他 sgRNA, sgRNA-3 对 *lpd* 基因的弱化程度更高。后续将会使用 sgRNA-3 来实现 *lpd* 基因在 *C. glutamicum* G01 中的弱化。

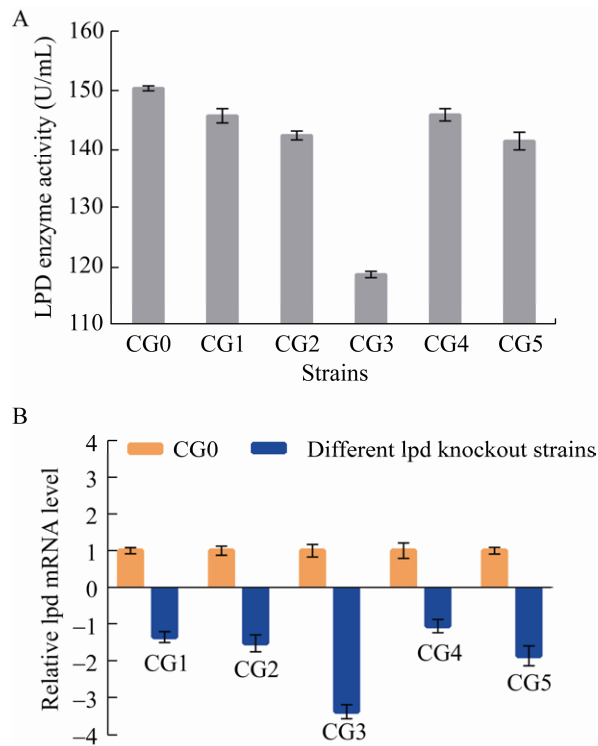


图5 *lpd* 敲弱菌株中 LPD 酶活 (A) 与 *lpd* 基因转录水平 (B)

Fig. 5 LPD enzyme activity (A) and *lpd* gene transcription level (B) of *lpd* knockout strains.

2.3.2 *C. glutamicum* DL01 菌株的构建

将 pFST-*dCas9*-S3 敲弱质粒电转 *C. glutamicum* G01, 提取重组质粒用 *dCas9*-F 和 *sgRNA*-R 引物进行 PCR 验证, 结果如图 6 所示, 泳道中条带大小为 4 467 bp 左右, 与 *dCas9*-*P_{trc}*-*sgRNA* 融合片段大小相符, 即 *dCas9*-*P_{trc}*-*sgRNA* 片段与 pFST 质粒连接成功, 即 *lpd* 基因的敲弱菌株 *C. glutamicum* DL01 构建成功。

2.3.3 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 菌株的构建、表达与酶活测定

将 RBS-4 序列用于 *icd* 基因在 *C. glutamicum* G01 中的过表达, PCR 鉴定结果显示, 泳道中条带大小约为 2 217 bp, 与基因 *icd* 大小相符, 即 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 构建成功 (图 7A)。在控制菌体浓度一致的情况下, *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 菌株中 ICD 的表达量均明显高

于对照菌株, 其大小约为 80.1 kDa, 即 ICD 在 *C. glutamicum* G01 中成功表达 (图 7B)。

酶活测定结果显示, *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 菌株中 ICD 酶活为 (506.45±4.81) mU/mL, 较原始菌的 (60.87±2.57) mU/mL 提高了 7.3 倍, 即 *icd* 基因在 *C. glutamicum* G01 中的过表达提高了 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 中 ICD 的酶活力。

2.4 发酵测试重组菌株产谷氨酸水平

由图 8 可知, 发酵 48 h 后, 菌株 *C. glutamicum* G01 谷氨酸产量达到 (93.53±4.52) g/L, 糖酸转化率为 45.2%; *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*ppc* 和

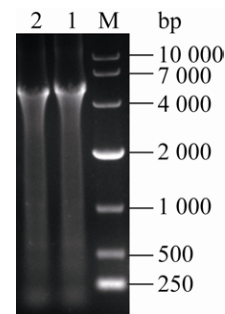


图6 *C. glutamicum* DL01 菌株的 PCR 鉴定结果

Fig. 6 PCR identification results of *C. glutamicum* DL01 strain.

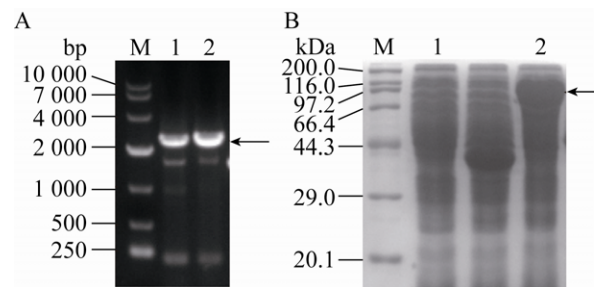


图7 *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 菌株的 PCR 鉴定结果 (A) 和表达情况 (B)

Fig. 7 PCR results (A) and expression (B) of *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* strain. (A) M: 10 000 bp nucleic acid marker; 1 and 2: PCR results of *icd* gene. (B) M: protein marker; 1: crude enzyme solution of control strain; 2: crude enzyme solution of *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* strain.

C. glutamicum G01/pDXW-10-*gltA* 菌株生长速率和葡萄糖消耗速率均较原始菌有所提高, 可能是 PEPC 酶活的提高增强了磷酸烯醇式丙酮酸对 OAA 的供应, 加快了 TCA 循环, 有利于菌体的生长, 葡萄糖的消耗速率加快; 而 CS 酶活的提高直接强化了碳流进入 TCA 循环, 使得菌体生长和葡萄糖消耗速率提高; *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*ppc* 菌株发酵 48 h 后谷氨酸产量提高至 (108.31 ± 1.72) g/L, 较原始菌提高了 15.8%, 可能是突变位点和 RBS 优化使得 PEPC 酶活得到一定程度提高, 有利于改善谷氨酸产量; *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* 菌株生长较快但谷氨酸产量并未得到较大程度的改善, 谷氨酸产量仅达到 (90.23 ± 3.64) g/L, 即仅提高 CS 活性并不能增强谷氨酸合成能力^[29-30]。*C. glutamicum* DL01 菌株菌体生长速率较原始菌慢, 但最终谷氨酸产量高达 (123.86 ± 4.75) g/L, 较原始菌提高了 32.4%; 糖酸转化率为 56.1%, 较原始菌提高了 10.9%。可见, *lpd* 基因的弱化表达减弱了 α -酮戊二酸下游代谢通量, 影响了菌体的生长, 降低了耗糖速率, 提高了糖酸转化率, 同时使得更多的 α -酮戊二酸用于谷氨酸合成, 谷氨酸产量得到改善。*C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* 菌株生长速率和葡萄糖消耗速率与原始菌相近, 但谷氨酸产量并无明显提高, 且从转录组数据来分析, 虽然 *icd* 基因在对照菌株中的表达量明显高于谷氨酸高产菌 *C. glutamicum* G01, 但是对照菌株谷氨酸产量却很低, 这也进一步说明了 ICD 的过表达可能对谷氨酸合成影响不大; 这与之前的研究是相符的, 之前 Shimizu 等在谷氨酸棒杆菌中过表达了 ICD, 提高了 ICD 酶活力, 但是对谷氨酸生产的 α -KG 节点处的代谢流分配没有很大影响, 谷氨酸产量也并无明显提高^[31-32]。

此外, 为进一步确定 *gltA* 和 *icd* 基因对谷氨酸生产的影响, 将 *gltA* 和 *icd* 基因在对照菌株 *C. glutamicum* E01 中也进行了过表达, 重组菌株

发酵数据表明, 其谷氨酸产量与 *C. glutamicum* E01 菌株相近, 没有明显提高 (数据未显示), 即 *gltA* 和 *icd* 基因的过表达对谷氨酸生产基本没有影响。

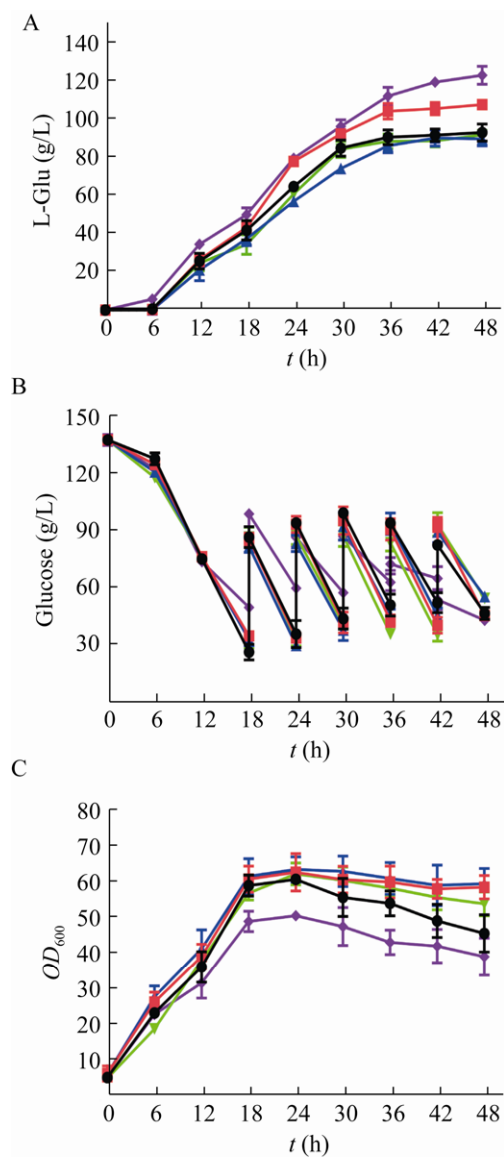


图 8 重组谷氨酸棒杆菌的补料分批发酵

Fig. 8 The fed-batch fermentation of recombinant strains. (A) L-glutamate concentration. (B) Sugar consumption rate. (C) Cell growth rate. *C. glutamicum* G01 (black lines), *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*ppc* (red lines), *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*gltA* (blue lines), *C. glutamicum* G01/pDXW-10-*icd* (green lines) and *C. glutamicum* DL01 (purple lines).

2.5 谷氨酸高产菌株的构建

2.5.1 *ppc* 基因在 *C. glutamicum* DL01 中的过表达

将构建好的 pDXW-10-*ppc* 重组质粒电转化至 *C. glutamicum* DL01 中, PCR 鉴定结果如图 9A 所示, 泳道中条带大小为 2 759 bp, *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 菌株构建成功; 在控制菌体浓度一致的情况下, *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 菌株中 PEPC 的表达量均明显高于对照菌株 *C. glutamicum* DL01, 其大小约为 103.2 kDa, 即 PEPC 在 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 中成功表达 (图 9B)。

2.5.2 谷氨酸高产菌中 PEPC 和 LPD 酶活测定

测定 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 菌株中 PEPC 和 LPD 的酶活, 结果表明该菌株中 PEPC 酶活提高至 (162.64±5.18) U/mL, 较原始菌的 (38.52±2.87) U/mL 提高了 3.2 倍, 即 *ppc* 基因在 *C. glutamicum* DL01 中的过表达, 提高了 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 中 PEPC 的酶活力。LPD 酶活下降为 58.7 U/mL, 较原始菌的 72.3 U/mL 下降了 18.8%, 可能是 CRISPR/dCas9 系统成功实现了 *lpd* 基因在 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 中的弱化, 因此, LPD 酶活呈现一定程度的下降。

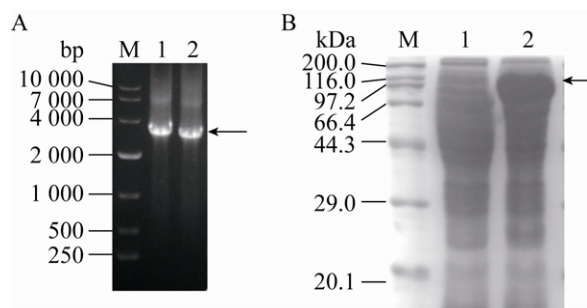


图 9 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 菌株的构建结果 (A) 与表达情况 (B)

Fig. 9 Construction results (A) and expressions (B) of *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* strain. (A) M: 10 000 bp nucleic acid marker; 1 and 2: PCR results of *ppc* gene. (B) M: protein marker; 1: crude enzyme solution of *C. glutamicum* DL01 control strain; 2: crude enzyme solution of *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* strain.

2.5.3 发酵罐发酵测试谷氨酸高产菌株谷氨酸水平

将 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 菌株进行 5 L 罐发酵, 在整个发酵过程中该菌株的生长速率比原始菌略有降低, 可能是 *lpd* 基因的弱化使得 α -酮戊二酸下游代谢流减弱引起的。*C. glutamicum* DL01/pDXW-10-*ppc* 菌株发酵 48 h 后, 其谷氨酸产量为 (136.09±5.53) g/L, 较原始菌提高了 45.5%, 正是 PEPC 酶活的提高, 使得谷氨酸产量在 *C. glutamicum* DL01 菌株的基础上再提高 13.1%; 此外, 该菌株的糖酸转化率为 58.9%, 较原始菌提高了 13.7%。本文构建的整合菌株, 谷氨酸产量由 93.53 g/L 提高至 (136.09±5.53) g/L, 且糖酸转化率提高了 13.7% (图 10), 这一策略将为谷氨酸生产菌株的代谢改造提供理论指导, 以进一步获得高产量、高糖酸转化率的工业化谷氨酸生产菌株, 同时将会用作高值氨基酸细胞工厂实现谷氨酸高值化产品的高产出。

3 讨论

实验室前期通过逐级诱变筛选得到了一株谷氨酸高产菌株 *C. glutamicum* G01, 将其与谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* E01 进行全局 RNA-seq 分析和重测序分析, 挑选出中心代谢路径转录水平和基因水平上存在差异的基因进行研究, 以进一步改善谷氨酸的产量。由于 OAA 节点和 α -酮戊二酸节点在谷氨酸合成途径中扮演重要角色, 因此, 探究了增强 OAA 供应的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、OAA 节点处的柠檬酸合酶、 α -酮戊二酸节点处的异柠檬酸脱氢酶和 ODHC 复合体 E3 亚基对谷氨酸生产的扰动影响。基于以上研究构建的整合菌株, 谷氨酸产量提高了 45.5%, 糖酸转化率提高了 13.7%, 在一定程度上降低了工业生产成本, 为谷氨酸高产菌株的基因工程改造提供了理论依据, 为谷氨酸高值化产品的生产奠定了基础。

鲍杰等通过 RBS 序列弱化 *odhA* 表达, 使得谷氨酸产量提高 16.8%; 同时研究了中心代谢路径中

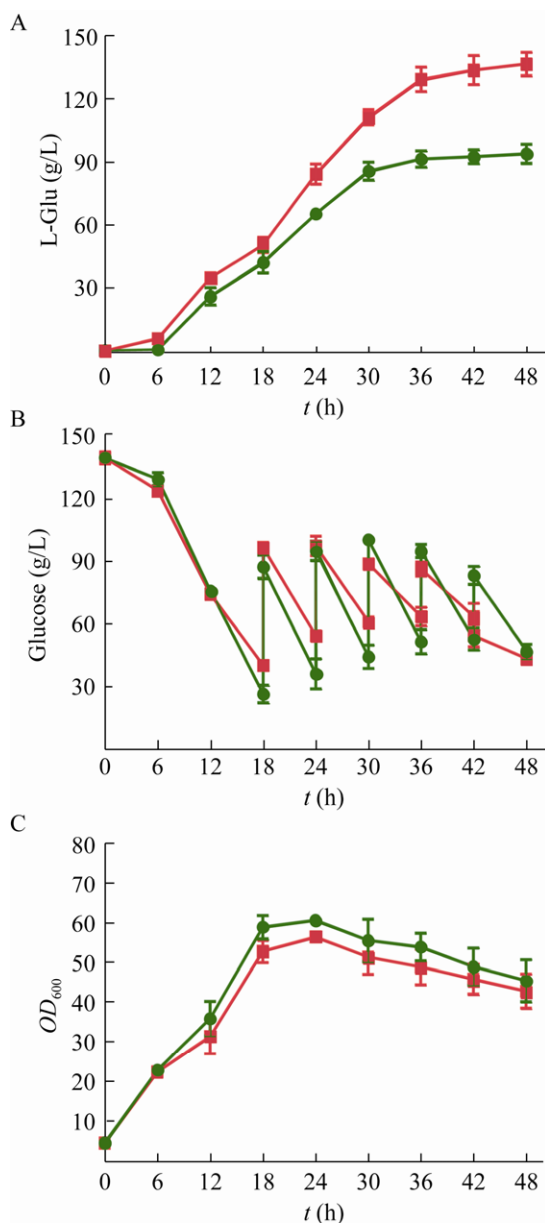


图 10 重组菌株 *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-ppc 菌株的补料分批发酵

Fig. 10 The fed-batch fermentation of recombinant strain *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-ppc. (A) L-glutamate concentration. (B) Sugar consumption rate. (C) Cell growth rate. *C. glutamicum* G01 (green lines), *C. glutamicum* DL01/pDXW-10-ppc (red lines).

pyc、*ppc*、*gltA* 和 *icd* 基因对谷氨酸生产的影响, 结果显示谷氨酸产量均未得到改善^[11]。目前, 很多研究者通过诱变手段虽然获得了谷氨酸高产菌株, 但并未进一步去阐述高产机理, 如白长胜等通

通过对获得的谷氨酸高产菌株进行发酵培养基优化, 谷氨酸产量由 120.3 g/L 提高至 135.6 g/L, 培养基优化水平上谷氨酸产量未得到明显提高^[33]; 陈宁等通过控制谷氨酸温度敏感突变株发酵过程中的温度转换, 完成了从谷氨酸非积累型细胞向谷氨酸积累型细胞的转换, 实现了谷氨酸的高产, 其产量高达 181 g/L, 为目前已报道最高产量^[34]。本文期望能够通过转录组与重测序分析结果, 挖掘关键基因以阐述谷氨酸高产菌株 *C. glutamicum* G01 高产谷氨酸的机理。但本研究仅针对中心代谢途径差异基因对谷氨酸生产的影响, 还不够全面; 谷氨酸的高产出是多因子协同作用的, 本文未对能量代谢、谷氨酸分泌等相关差异基因入手探索对谷氨酸生产的影响。下一步将会继续挖掘其他功能基因对谷氨酸生产的影响, 进一步解析谷氨酸高产机理。

REFERENCES

- [1] Yang Y, Zhang MM, Gao Y, et al. Research progress on key molecular mechanism of high yield glutamic acid fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(5): 311–315, 321 (in Chinese). 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. *食品工业科技*, 2019, 40(5): 311–315, 321.
- [2] Xu GQ, Zha J, Cheng H, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the *de novo* biosynthesis of tailored poly- γ -glutamic acid. *Metabol Eng*, 2019, 56: 39–49.
- [3] Wang NN, Ni YL, Shi F. Deletion of *odhA* or *pyc* improves production of γ -aminobutyric acid and its precursor L-glutamate in recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(7): 1473–1481.
- [4] Kawahara Y, Takahashi-Fuke K, Shimizu E, et al. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-Oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(7): 1109–1112.
- [5] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, et al. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes

- L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(4): 1308–1319.
- [6] Wada M, Sawada K, Ogura K, et al. Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *J Biosci Bioeng*, 2016, 121(2): 172–177.
- [7] Yao WJ, Deng XZ, Zhong H, et al. Double deletion of *dtsR1* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(7): 911–921.
- [8] 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 Biosci Bioeng*, 2008, 106(1): 51–58.
- [9] Buch AD, Archana G, Kumar GN. Enhanced citric acid biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 by overexpression of the *Escherichia coli* citrate synthase gene. *Microbiology*, 2009, 155(8): 2620–2629.
- [10] Man ZW, Xu MJ, Rao ZM, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production. *Sci Rep*, 2016, 6: 28629.
- [11] Wen JB, Bao J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* triggers glutamic acid accumulation in biotin-rich corn stover hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 86.
- [12] Peng F, Wang XY, Sun Y, et al. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Factor*, 2017, 16: 201.
- [13] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [14] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [15] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77(1): 51–59.
- [16] Hasegawa T, Hashimoto KI, Kawasaki H, et al. Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105(1): 12–19.
- [17] Chen RD, Yang H. A highly specific monomeric isocitrate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383(2): 238–245.
- [18] Wu AM, Jiang ZQ, Wei Y, et al. Purification of an extracellular dihydrolipoamide dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *J China Agric Univ*, 2008, 13(1): 16–19 (in Chinese).
武爱民, 江正强, 韦贇, 等. 枯草芽孢杆菌胞外二氢硫辛酰胺脱氢酶的纯化. *中国农业大学学报*, 2008, 13(1): 16–19.
- [19] Guest JR, Creaghan IT. Further studies with lipoamide dehydrogenase mutants of *Escherichia coli* k12. *J Gen Microbiol*, 1974, 81(1): 237–245.
- [20] 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 (in Chinese).
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.
- [21] Xue N, Li ZX, Zhan JJ, et al. Effect of *aceA* and *gogat* knockout combined *gltA* overexpression in GKGD on α -ketoglutarate production. *Food Fermentat Ind*, 2017, 43(8): 1–7 (in Chinese).
薛宁, 李智祥, 战俊杰, 等. 敲除 *aceA* 和 *gogat* 及过表达 *gltA* 对谷氨酸棒状杆菌 GKGD 合成 α -甜酮戊二酸的影响. *食品与发酵工业*, 2017, 43(8): 1–7.
- [22] Zhang B, Zhou N, Liu YM, et al. Ribosome binding site libraries and pathway modules for shikimic acid synthesis with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Factor*, 2015, 14: 71.
- [23] Zhang B, Yu M, Zhou Y, et al. Systematic pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 for l-ornithine production. *Microb Cell Factor*, 2017, 16: 158.
- [24] Nguyen AQD, Schneider J, Reddy GK, et al. Fermentative production of the diamine putrescine: system metabolic engineering of *Corynebacterium*

- Glutamicum*. *Metabolites*, 2015, 5(2): 211–231.
- [25] Kim J, Hirasawa T, Sato Y, et al. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 81(6): 1097–1106.
- [26] 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*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(1): 143–151.
- [27] 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*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81(11): 2130–2138.
- [28] 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(3): 691–700.
- [29] Wiegand G, Remington SJ. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Ann Rev Biophys Biophys Chem*, 1986, 15(1): 97–117.
- [30] Eikmanns BJ, Thum-Schmitz N, Eggeling L, et al. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology*, 1994, 140(8): 1817–1828.
- [31] Shimizu H, Tanaka H, Nakato A, et al. Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2003, 25(5): 291–298.
- [32] Eikmanns BJ, Rittmann D, Sahm H. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol*, 1995, 177(3): 774–782.
- [33] Bai CS, Han J, Wang G, et al. Optimization of fermentation medium for L-glutamic production by suboptimal dose. *China Condiment*, 2016, 41(8): 87–90 (in Chinese).
白长胜, 韩隽, 王刚, 等. 亚适量法 L-谷氨酸发酵培养基的优化. *中国调味品*, 2016, 41(8): 87–90.
- [34] Chen N, Xu QY, Xie XX, et al. Method for improving fermentation acid yield of glutamic acid temperature-sensitive mutant: CN, 101705263A. 2010-05-12 (in Chinese).
陈宁, 徐庆阳, 谢希贤, 等. 一种提高谷氨酸温度敏感突变株发酵产酸率的方法: 中国, 101705263A. 2010-05-12.

(本文责编 郝丽芳)