Aug. 25, 2023, 39(8): 3273-3289 ©2023 Chin J Biotech, All rights reserved

工业生物技术・

理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌高效合成 L-谷氨酸

刘佳峰1,乔郅钠1,赵有玺2,徐美娟1,张显1,杨套伟1,饶志明1*

1 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 北京联合大学生物化学工程学院,北京 100023

刘佳峰, 乔郅钠, 赵有玺, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 饶志明. 理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌高效合成 L-谷氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3273-3289.

LIU Jiafeng, QIAO Zhina, ZHAO Youxi, XU Meijuan, ZHANG Xian, YANG Taowei, RAO Zhiming. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient synthesis of L-glutamate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3273-3289.

摘 要:L-谷氨酸是世界上第一大宗氨基酸产品,广泛应用于食品医药及化工等行业。以谷氨酸高 产菌谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum) G01为出发菌株,首先通过敲除主要副产物丙氨酸 合成相关基因-丙氨酸氨基转移酶编码基因(alaT),降低了发酵副产物丙氨酸含量。其次,α-酮戊二 酸节点碳流量对谷氨酸合成起重要作用,因此,采用核糖体结合位点(ribosome-binding site, RBS)序 列优化降低了α-酮戊二酸脱氢酶的活性,强化了谷氨酸合成代谢流。同时通过筛选不同来源的谷氨 酸脱氢酶,加强了α-酮戊二酸内源转化为谷氨酸的能力。接着,对谷氨酸转运蛋白进行理性设计, 提高了谷氨酸的外排能力。最后,对基于以上策略构建的整合菌株进行了5L发酵罐发酵优化,通 过梯度升温结合分批补料策略,谷氨酸产量为(136.33±4.68) g/L,较原始菌的产量(96.53±2.32) g/L 提高了41.2%;糖酸转化率为55.8%,较原始菌的44.2%提高了11.6%;且降低了副产物丙氨酸的含 量。以上策略一定程度上提高了谷氨酸的产量与糖酸转化率,可为谷氨酸生产菌株的代谢改造提供 参考。

关键词:谷氨酸棒杆菌;谷氨酸;转录分析;核糖体结合位点(RBS)序列优化;谷氨酸转运蛋白

*Corresponding author. Tel: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn Received: 2023-01-08; Accepted: 2023-03-07

资助项目:国家重点研发计划(2021YFC2100900);国家自然科学基金(32071470);新疆生产建设兵团科技攻关计划项目(2019AB009)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100900), the National Natural Science Foundation of China (32071470), and the Science and Technology Project of Xinjiang Production and Construction Corps, China (2019AB009).

Rational metabolic engineering of *Corynebacterium* glutamicum for efficient synthesis of L-glutamate

LIU Jiafeng¹, QIAO Zhina¹, ZHAO Youxi², XU Meijuan¹, ZHANG Xian¹, YANG Taowei¹, RAO Zhiming^{1*}

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

2 College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China

Abstract: L-glutamic acid is the world's largest bulk amino acid product that is widely used in the food, pharmaceutical and chemical industries. Using Corynebacterium glutamicum G01 as the starting strain, the fermentation by-product alanine content was firstly reduced by knocking out the gene encoding alanine aminotransferase (alaT), a major by-product related to alanine synthesis. Secondly, since the α -ketoglutarate node carbon flow plays an important role in glutamate synthesis, the ribosome-binding site (RBS) sequence optimization was used to reduce the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase and enhance the glutamate anabolic flow. The endogenous conversion of α -ketoglutarate to glutamate was also enhanced by screening different glutamate dehydrogenase. Subsequently, the glutamate transporter was rationally desgined to improve the glutamate efflux capacity. Finally, the fermentation conditions of the strain constructed using the above strategy were optimized in 5 L fermenters by a gradient temperature increase combined with a batch replenishment strategy. The glutamic acid production reached (135.33±4.68) g/L, which was 41.2% higher than that of the original strain (96.53±2.32) g/L. The yield was 55.8%, which was 11.6% higher than that of the original strain (44.2%). The combined strategy improved the titer and the yield of glutamic acid, which provides a reference for the metabolic modification of glutamic acid producing strains.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; glutamate; transcription analysis; ribosome-binding site (RBS) sequence optimization; glutamate transporter

L-谷氨酸是一种重要的氨基酸,每年产量 占据全球氨基酸市场的 400 多万 t。L-谷氨酸不 仅应用于制药业,在食品、生化和畜牧行业也 广泛使用^[1],目前焦谷氨酸钠(pyroglutamic acid sodium, PCA-Na)、聚谷氨酸等高值产品已成为 研究热点^[2],因此选育 L-谷氨酸高产菌株十分 有必要。L-谷氨酸主要通过微生物发酵生产, 其在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 内合成途径如图 1 所示。谷氨酸棒杆菌是一种 食品安全级菌株,最初是由日本研究人员分离 出来的一种产生谷氨酸的微生物,具有优秀的 大量生产氨基酸的能力,已经广泛应用于各种 氨基酸的生产中^[3]。谷氨酸棒杆菌在正常生长 条件下不能产生谷氨酸,在生物素亚适量或通 过添加吐温 40 或青霉素的情况下可产生谷氨 酸^[4]。实验室前期通过多级诱变等技术,以谷 氨酸中产菌谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) E01 作为底盘细胞筛选出了一株谷 氨酸产量较高的菌株 *C. glutamicum* G01,其产 量约为 96 g/L,作为宿主菌有很大生产 L-谷氨 酸的潜力。

在谷氨酸棒杆菌中,三羧酸(tricarboxylic

3275



图 1 谷氨酸在谷氨酸棒杆菌中的生物合成途径

Figure 1 Glutamate biosynthetic pathway in Corynebacterium glutamicum.

acid, TCA)循环是产生 L-谷氨酸的关键途径。研 究表明, α-酮戊二酸脱氢酶复合体(α-ketoglutarate dehydrogenase complex, ODHC)的活性对谷氨酸 的合成至关重要,在谷氨酸高产菌中 ODHC 的活 性普遍较低。ODHC 由 3 个亚基组成(E1、E2 和 E3 亚基),其中 E1 亚基由 odhA 基因编码。ODHC 能够催化 α-酮戊二酸生成琥珀酰辅酶 A,因此 ODHC 活性的降低能够使 TCA 循环更多地向合 成谷氨酸流分布,从而提高了谷氨酸的产量^[5]。 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC),由 ppc 基因编码,在TCA 循环中起关键作用,能够加强进入TCA 循环的碳代谢^[6-7]。柠檬酸合酶(citrate synthase, CS),由 gltA 基因编码,是TCA 循环中的第一个酶,参与TCA 循环的起始反应,过表达CS 可以加强进入TCA 循环的碳流量,可能对L-谷氨酸的合成有促进作用^[8]。磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)由 pfk 基因编码,催化果糖-6-磷酸生成果糖-1,6-二磷酸,其酶活力水平严格影响着糖酵解(Embden-Meyerhof-Parnas, EMP)途径的速

率^[9];丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PYK)由 *pyk* 基因编码,控制着丙酮酸的外流量,并在 EMP 途径中起关键作用,有研究表明过表达 PYK 能够提高细菌内谷氨酸含量^[10]。此外,提高 α-酮 戊二酸(α-ketoglutaric acid, α-KG)向谷氨酸转化的能力对谷氨酸的合成十分关键,因此选育高性能的谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)非常有必要。最后,作为谷氨酸合成的非内源因素,谷氨酸转运蛋白(mechanical sensitive channel of *Corynebacterium glutamicum*, MscCG) 近年来成为研究热点,有研究表明 MscCG 的结构改变可引起谷氨酸的过量排泄^[11]。

本文以实验室前期筛选到的 C. glutamicum G01 为出发菌株,与前期实验室对 C. glutamicum G01 发酵前后关键基因转录水平差异的研究不 同^[12],通过对 C. glutamicum E01 与 C. glutamicum G01 进行转录组与基因组测序分析,期望寻找 到谷氨酸合成关键途径中基因转录水平的差 异,对其合成 L-谷氨酸途径进行代谢改造,研 究了 PEPC 和 CS 对代谢途径的影响,同时结合 核糖体结合位点优化以及基因敲除加强了谷氨 酸的积累,减少了副产物的生成,强化了谷氨 酸代谢流并提高了谷氨酸的外排能力,提高了 谷氨酸的产量以及发酵糖酸转化率,为谷氨酸 棒杆菌的代谢改造提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养基

谷氨酸中产菌 C. glutamicum E01、谷氨酸高 产菌 C. glutamicum G01、大肠杆菌(Escherichia coli, E. coli) BL21(DE3)和质粒 pXMJ19、 pK18mobsacB、pEC-XK99E 均为实验室保藏。

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯 化钠 10, 固体培养基添加 1.5%-2.0%琼脂, 根

据需要添加相应浓度的抗生素。

BHI 培养基(g/L): 脑心浸液肉汤粉 38.5, 固体培养基添加 1.5%-2.0%琼脂,根据需要添加相应浓度的抗生素。

发酵种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄ 0.6, 玉米浆 30, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄·H₂O 0.005, 尿素 2.5 (与其他成分分开灭 菌 115 ℃, 20 min), pH 7.0。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 140, K₂HPO₄1, MgSO₄ 0.6, 玉米浆 5, FeSO₄·7H₂O 0.005, MnSO₄·H₂O 0.005, 尿素 7 (与其他成分分开灭 菌 115 ℃, 20 min), pH 7.0。

1.1.2 引物

本研究所用引物如表1所示。

1.1.3 主要试剂

琼脂糖凝胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒以及 MultiF Seamless Assembly Mix 重组酶均购于江苏康为世纪生物科技股份有限公司; EcoR I、Hind III等限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶及 Marker 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 重组质粒的构建

为了加强谷氨酸棒杆菌内合成谷氨酸的前 提供应,本研究过表达了谷氨酸棒杆菌来源的 ppc、gltA、pfk 以及 pyk 基因,同时为了弱化 ODHC 的表达,过表达了不同强度核糖体结合 位点(ribosome-binding site, RBS)序列的α-酮戊 二酸脱氢酶复合体(ODHC) E1 亚基编码基因 odhA,不同强度的 RBS 序列由 RBS Calculator (https://salislab.net/software/)预测得到。以本实 验室保存的 pXMJ19 和 pEC-XK99E 质粒为载 体,以谷氨酸棒杆菌基因组为模板,通过表 1 的引物分别扩增基因片段。再通过同源重组方 法,构建 pXMJ19 和 pEC-XK99E 相关质粒。

pK18mobsacB-ΔalaT 质粒的构建:以 C. glutamicum G01 基因组为模板,以引物对

3277

Table 1 Primers Sequences (5'3') AdaT-1-F TATGACATGATTACGAATTCCGATCTGGCTGAGAGAAAAGTAGACA AdaT-1-R CCCATCCACTAAACTTAAACTAAACTAGACATGATGTGTCCGTGAGAGAAAAGTAGACA A adaT-1-R CCCATCCACTAAACTTAAACTAAACTAGACGGGCGCGGACGGA		
Primers Sequences (5'-3') Aala7-1-F TATGACATGATTACGAATTCCGATCTGGCTGAGAGAAAAGTAGACA A ala7-1-R CCCATCCACTAAACTTAACAATGTTGTGTGCGTCGAGCT A ala7-2-R TGTTTAAGTGAGATGGGACCCGAACGTGTACGAAATCC A ada7-1-R GGACGGCCAGTGCC <u>AAGCTT</u> GAAGCCTAACCCAGAATGAGGGAC A odha-1-F GGAAACAGCTATGACATGAGTACGAATTCAGCAATTCCTCACGACGCGTTGTT A odha-2-R TTGTAAAACGACGCCCGAAGGCCCGAAGTGCTGGCCAAGTCCTGGC A odha-2-R TTGTAAACGACGCCCAGTGCCCCGAAGTCCTGCCGAGGACAA PJ9-ghA-F AAACAGCACCCAGCTGCCCCCCCCCCGCGAGGACAA RBS1odhA-F AAACAGCAACCTTCCCCGCGTCTTACAGCTTGTTTAACGTGAGCAGCGCCTAGTACT RBS1odhA-F AAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACT RBS2odhA-F AAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCTCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACT RBS2odhA-F AAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCCGCTCTTACAGCTGGTGCAGT PJ9-ppc-F CAAACAGAATTAATTAAGCTTCAGCGGAATTCATTAAGTGAGCGAATCATGACTGAGT RBS2odhA-F AAACAGAATTAATTAAGCTTCAGCGGAATTCATTAAGGAGGGAATCATGACTGAGTGGCAGT PJ9-ppc-R CAAACAGCCAAGCTGAATTCCTCCCCCCTCTTCCTACACTGAGTGGAGCGCAGTGC PJ9-ppc-R CAAACAGGCCAAGCGGAATTCATGAGTTGTCGC PJ9-ppc-F CAAACAGGCCAAGCCGGAATTCCTGGT PJ9-ppc-F CAA	Table 1 Primers	used in this study
Aular1-1FTATGACATGATTACGAATTCCGATCTGGCTGAGAGAAAAGTAGAGAAA alar1-1RCCCATCCACTAAACTTAAACATGTTGTGTCCGTCGAGCTA alar2-2FTGTTTAAGTTTAGTGGATGGGACCCGAACGTGACGAACTGCAA alar2-2FGGACGCCATGCCAAGCTTTGAAGCCTAACCCAGAATAGAGGGACA alar2-2FGGACACGCTATGACATGACTGAGCCCGAAGTCCATGCCGGGTGTTA odhA-1FGGAAACAGCTATGACATGAGTGGCCCCGAAGTCCATGCTGCGA odhA-2PTGTTTAAGTTTAGTGGATGGCCCCGAAGTCCATGCTGGGGAGATCCTGGCP odhA-2PTGTTAAACTAATTAAGCATGGCCCCGGAAGTCCATGCTGGAGAGACAAR SS odhA-2PTTGTAAACGCCAAGCTGAATTCATGCGCCCCCGCGGAGGACACAR SS odhA-2PTTGTAAACGCCAAGCTGAATTCATGCCCCCCCCGCGAGGACACAR SS odhA-FAAACAGCAAACTGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTR SS odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTR SS odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTP J > ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAAATCCTGAGCTGGCTGCGCAGTGCAGTP J > ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAAATCCTGAGCCGAGTGCGCAGTGCAGTP J > ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGCGCAGP J > ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTGCTAGCCGAGTGGCGCAGTGCGCAGP J > ppc-RCAAACAGCCAATGGTCCCTGP J > ppc-RCAAACAGCCAATGGTCACGCAGCGP J > ppc-RCAAACAGCCAATGGTCCTTGP J > MscCG-A100VFGCGTCTGGTGCCACTGGAATGCTGCGCAGTGGGAATCATGGAGAGAATGCTGGAGCATTGCGAGCGA	Primers	Sequences $(5' \rightarrow 3')$
Adadr-1-RCCCATCCACTAAACTTAAACAATGTTGTGTCCGTCGAGCTA adar2-F.FTGTTTAGTTGAGTGGACCGGAATGCGCAAACCCGAAATCAA adar2-F.CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGAAGCCAACCAGAATGAGAGGACA adha-1.FGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTCCTCCAGACGCGTGTGTA odha-1.FCCCATCCACTAAACTTAAACATAGCCAATGATGGGGTA odha-2.FTGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCCCCGAAGTCCATGCTGCA odha-2.FTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGAACAGGTTGTGAAGGGTAGTGCTCCTGCp19-gh/a-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCAGCGCTCTTCGCGAGGAACAARBS1odhA-FAAACAGCAAGCTGAATTCTCCCGCGTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCGTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS4odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTP19-ppc-RCAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTP19-ppc-RCAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTACAGCTGGTGGCAGAGp19-ppc-RCAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTACAGCTGGTGGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGACATAATAAGGAGGGAAATCATGATTATGAGCGGCAGCp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGGTGGCACGTTGCCAGGCAGG	$\Delta a la T$ -1-F	TATGACATGATTAC <u>GAATTC</u> CGATCTGGCTGAGAGAAAAGTAGACA
AdaT-2-FTGTTTAAGTTTAGTGGATGGAACCCGAACGTGTACGAAATCCAdaT-2-RCGACGCCAGTGCCAAGCTTTGAAGCTAACCCAGAATAGAGGACA odhA-1-FGGAAACAGCTATGACATGATAACGAAGTGTGGGTA odhA-1-RCCCATCCACAAACTTAAACATAGCCAATGATGTGGGTA odhA-2-RTGTTAAGTTTAGTGGATGGGCCCCGAAGTCCAAGGTCAGGGTGACACCTCGCA odhA-2-RTIGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGGCTTGATCAAGTTCGTGGATGATCCTGCp)-gltA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBSadhA-FAAACAGAATTAATAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBSadhA-FAAACAGAATTAATAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBSadhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCTCTTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTPJ>ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCTCTTCTTACAGCTGGCTG	$\Delta a la T$ -1-R	CCCATCCACTAAACTTAAACAATGTTGTGTCCGTCGAGCT
Adaft-2-RCGACGGCCAGTGCCAAGCTTTGAAGCCTAACCCAGAATAGAGGACAodhA-1-FGGAAACAGCTATGACATGATACGAATTCACACGAGCGCTTGTTAodhA-1-RCCCATCCACTAAACTTAAACATAGCCAATGATGTGGGTAodhA-2-FTGTTAAGTTTAGTGGGATGGGCCCGAAGTCCAAGGTCATGCTGCpl>adha-2-RTTGTAAAACGACGCCAGCCAAGCTCAAGGTTGATCAAGTGTGGATGATCCTGGCpl>gltA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCGCGCTCTTGCGAGGAACAARBS1adhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS2adhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS3adhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTGGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTpl>gbp-phAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCGTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTpl>gbp-phAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCGTCTTACAGCTGGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTpl>ppp-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCCCCGCTTTACAGCTGGCAGTGCCAGTpl>ppp-P-FAAACAGAACTAATTAAGGAGGGAAATCATGATCTGCGCAGTGCAGTpl>ppp-C-RCAAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGCGCGAGTpl>ppp-C-RCAAAACAGCCAAGCCGCpl>pps-CG-A100V+FGCGTCAGCTGGACCTGCGTCpl>MscCG-A100V+FGCGTCAGCTGGACGTGACGTGCACTGGCAGAGTGGACGTGGAAGCACGCGAATGCpl>mscCG-A100V+FGCGTCAGCTGCACCCAAGACCCAAGACCAGGAAATCATGGAAGACATGCGAATGCpl>mp-ph-FCAGGAAACAGACCATGCACCAAGACCAAGACAAGACATGGCAAGACATGGGAAATCATGGAGGAAATCATGGAGGAAATCATGGAGGAAATGATGGAGAGAAATGATGGAGAGAAATGATG	$\Delta a la T$ -2-F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGACCCGAACGTGTACGAAATCC
A odhA-1-FGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTCATCCAGCAGCGCTGTTA odhA-1-RCCCATCCACTAAACTTAACATAGCCAATGGTGGGGTA odhA-2-FTGTTTAAGTTAGTGATGGGCCCCGAAGTCCATGCTGGGTA odhA-2-RTIGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGGATCAAGTTCTGGATGATCTCCGGp19-ghA-FAAACAGCCAAGCGCAAGTCTTAAAGGAGGGAAATCATGTTTGAAAGGGATATCGTGGGCAGCAGCGCTAGTACTRBS1odhA-FAAACAGACATTAATAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS3odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTCTCACACCTCGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTP19-ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTCTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCTAAGGAGGGAATCATGACTGGCAGTGGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCTAAGGAGGGAATCATGACTGGCAGTGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAAGGGGTGGACGTGGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGACATTGCTCp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGACATTGCTACGGAGTGGGCGCAGTGGCGCAGTp19-ppc-RCGGATCCGGTGACCATTGCGTCp19-ppc-RCGGATCGGTGGCCCATGGGTGGCCGTGGCAGCGTGGGCAGAp19-ppc-RCGGCCAATGGTCGCGGAATCGCp19-ppc-RCGGCCAATGGTCGCGGAGCGCAGCCp19-ppc-RCGGCCAATGGTCGCGGAGCGCAGAATCATGGACAGCGAATTGCp19-ppc-RCGGCCAATGGTCGCGGCAGGAAATCATGGACAGCGAATTGCp19-ppc-RCGGCCAATGGCCGGCAGGAATCATGGCGGGAGAATCATGGACAGCGAATTGCp19-ppc-RCGGCCAATGGTCGACGCGAGAACCCAAGGGGAAATCATGGCGGGGAAGCATGCGAATGCGp19-ppc-RCGGCCACAGACCAGCGCAGGAATCATGGCGGGGAAATCATGGCGGGGAATTGGCGAGAACTGGAATGGCp19-ppc-RCGGCCACAGACCAGGGAAATCATGGCGGGGAAATCATGGGCGGGAATGCGGAATGGCp19-ppc-R	$\Delta a la T$ -2-R	CGACGGCCAGTGCC <u>AAGCTT</u> TGAAGCCTAACCCAGAATAGAGGAC
A odhA-1-RCCCATCCACTAAACTTAAACATAGCCAATGGTGGGTA odhA-2-RTGTTAAGTTTAGTGGATGGGCCCGAAGTCCATGCTGCA odhA-2-RTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGATCAAGTTCTGTGATGATCCTGCGp19-ghA-FAAACAGCCAAGCTGAATTCTTAGGGGCACTCCTGCGAGGAACAARBSIodhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCGCTCTTACAGCTGGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCGCTCTTACAGCTGGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS3odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCGCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS4odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCGCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTp19-ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCCGCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCTAAGGAGGGAAATCATGATGTGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCCGAGTGGCGCAGTGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAAGGAGGGAAATCATGATGTGCGCAGTp19-ppc-RCGCATTCCGGTGACCATGCGCTp19-ppc-RCGCATGCGTGACCTGGAATTCCTAAGGGGTGGACGTTGGCGCAAp19-ppc-RCGCATGCGTGACCTGGAATTCCTAAGGAGGGAAATCATGGCGCAGATp19-ppc-RCGCATGCGTGACCTGGAATTCCTAAGGGTGGACGTTGGCGCAAp19-ppc-RCGCATGCGTGACCTGGAATCCTGAGCGTGGATGGCGCAGATp19-ppc-RCGCATGCGTGACCTGGAATCCTGGCGAGATGCGCGCAGAATCATGGCGCAAp19-ppc-RCGCATGCGTGACCTGGCAATCCTGGCGAGAATCATGGCGCAATGCTGGCAATGCGGAATCATGGCGAATGCTGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGGCAATGCTGGG	$\Delta odhA$ -1-F	GGAAACAGCTATGACATGATTAC <u>GAATTC</u> ATCTCACGACGCGTTGTT
A odhA-2-FIGTITAAGTITAGTGGATGGGCCCCGAAGTCCATGCTGCA odhA-2-RITGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGATCAAGTTCTGTGATGATCTCTCGCp19-gltA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTTAAGGCGCCACTCGCGGGAAATCATGTTTGAAGGGAGAGCAGCGCTAGTACTRBS1odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS3odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS4odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTCTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTP19-ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTCTACAGCTGGTCTTACAGCGAGCG	$\Delta odhA$ -1-R	CCCATCCACTAAACTTAAACATAGCCAATGATGTGGGT
\(\Delta\) \(\Del	$\Delta odhA$ -2-F	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCCCCGAAGTCCATGCTGC
pl9.gltA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTAAAGGAGGGAAATCATGTTTGAAAGGGATATCGTGGCTpl9.gltA-RAAACAGCCAAGCT <u>GAATTC</u> TTAGCGCTCCTCGCGAGGAACAARBS1odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCGCGCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS3odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS4odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTpl9.popc-FAAACAGACAAGCCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGCCAGTpl9.popc-RCAAAACGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGCGCGCAGTpl9.mscCG-RCAAAACGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCGCAApl9.mscCG-RCAAACGCCAAGCTGAATGCCpl9.mscCG-A100V-RGCGCACGCGGGACCTGGGCGCAATCGCGGCGCAATCATGGACGTGGCGCAATCATGGTGTGCGCAATGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCGGAATGGCGCAGTGGCGGAAATCATGGAAGACATGCGAATGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCGGAATGGCGAATGCGpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCGGAGTGGACGTGGACGTGGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCTGGAGTGGACGTGGATGGCGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCTGGAGTGGAATGCGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCTGGAGTGGAATGCGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCTGGCAGTGCGAATGCCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCTGGAAGCGAATCATGGGGAAATCATGGAGAGAATGCAGAATTGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAGCCATGCCAGTGCAATCAAGGGGAAATCATGGAAGACATGGAAATTGATGGAGAATTGCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAAGCCATGGCAATGCAAGCCpl9.mscCG-A100V-RGCGCAACGCACTGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGAGAATGATGGAAATTGATGGAAATTGATGGAGAATGATG	$\Delta odhA$ -2-R	TTGTAAAACGACGGCCAGTGCC <u>AAGCTT</u> TGATCAAGTTCTGTGATGATCTCCTGC
p19-gltA-RAAAACAGCCAAGCTGAATTCTTAGCGCTCCTCGCGAGGAACAARBS1odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCGCGTCTTACAGCTCGTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTACTRBS4odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTACTp19-ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTCTACAGCTGGATGAGCAGCGCAGTAGTACTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCCGGAGTTGCGCAGTGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGCGTGGCGCAGTGGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGGGGGGACGTTGGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGGGGTGGACGTGGGCAGTGGCGCAGp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGACCTGCACGCGAATCGCp19-ppc-CCAACACGCCATGGCAGTGGCGGAATCATGGAAGACATGCGAATTGCp19-ppc-CCAGGACCAATCGCCAAGCCAAGCCp19-ppc-CCAGGACACAGCACGGGAAATCATGGGCGGAAATCATGGACGAATGACGAACTAGGp19-ppc-CCAGGACACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGACGGGAATGACGAACTAGGp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGATCCTTAGAAGCTTGCCATGCCTGGGCAGp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGACCTGp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGACACTGGACATTGCCTGGGCAGTp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGACCTGp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGCAGTAACCp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGCAGTAACCp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGCCGGCAGTAACCp19-ppc-CCAGGCCACTCTAGAGGCAGGCAGTACCCTGTGCAATCATGGCGGGGAAATCATGGGCGGAGATGACGAGACATGAGACAACAACAACAATGACC <tr< td=""><td>p19-gltA-F</td><td>AAACAGAATTAATT<u>AAGCTT</u>AAAGGAGGGAAATCATGTTTGAAAGGGATATCGTGGCT</td></tr<>	p19-gltA-F	AAACAGAATTAATT <u>AAGCTT</u> AAAGGAGGGAAATCATGTTTGAAAGGGATATCGTGGCT
RBS1odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTACTRBS2odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACATCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTRBS4odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCTCTTCTACAGCTCGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACTp19-ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTGCTCCTCTCTTACAGCTGATTTTCTACGCGATGAp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCCGGAGTGCGCAGTGCAGTp19-ppc-RCAAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGGCGAATCATGACCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGGCGAGTGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTGGCGCAGTGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGGGGGAATCATGACCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGGGGGGGACGTTGGCGCAGTp19-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGGGGGGGACGTTGGCGCAGTp19-ppc-RGCGTCGGGGCACGTGGACCATGGCGCp19-mscCG-A100vFGCGCAATGGTCACCGGAATCGCp19-mscCG-A100vFGCGTCAGCTGGACTGGACTGTGGCp19-mscCG-A100vFGCGTCGGCGGCGGAATGCTGGCGGGAAATCATGGAAGACATGCGGAATTGCp19-mscCG-A100vFGCGCCGCGCGGCGGAATGCTGGCGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCp19-mscCG-A100vFGCGCCGCCACTGGACGCAGTGGAATGATGGCGGAAATCATGGAAGACATGCGGAATTGCp19-mscCG-A100vFGCGCCGCCACTGCGACTGCCCCTGCCCAGCGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCp19-mscCG-A100vFGCGCCGCCACTGGAGACCAAGACCAp9-pfk-RGAGCAACAGACCATGGAATTGAAGCGGAAATCATGGCGGAGAATCATGGAAGACATGGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAAATCATGGCGGAGAATCATGGCGGGAAATCATGGCGGAGAATCATGGCGGAGAATCATGGGCGGAAATCATGGCGGAGAATCATGGCGGAGAATCATGGCGGGAAATCATGGCGGGAAATCATGGCGGGAAATCATGGCGGGAAATCATGGGCGGAAATCATGGCGGGAAATCATGGGCGGAAATCATGGCGGGAAATCATGGCGGGAAA	p19-gltA-R	AAAACAGCCAAGCT <u>GAATTC</u> TTAGCGCTCCTCGCGAGGAACAA
RBS2odhAFAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCGCGTCTTACATCTAGTTTTAACGTGAGAAGCGCTAGTACTRBS3odhAFAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCCTCGTCTTACAGCTCGTTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTACTRBS4odhAFAAACAGAATTAATTAAGCTTAAAGGAGGGAAATCATGACTGATTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTACTp19-ppc-RAAACAGAATTAATTAAGCTTAAAGGAGGGAAATCATGACTGAC	RBS1odhA-F	${\tt AAACAGAATTAATTAAGCTT} {\tt CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC$
RBS3odhA-FAAACAGAATTAATTAAGCTTCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	RBS2odhA-F	$AAACAGAATTAATTAAGCTT {\color{black} {\bf C} {\bf $
RBS4odhAFAAACAGAATTAATTAAGCTTCTCTCTTCTTACAGCTAGTTTTAACGTGAGCAGCGCAGTAGTAGTp19-ppc-FAAACAGAATTAATTAAGCTTAAAGGAGGGAAATCATGACTGATTTCTACGCGAGTGAGATGAp19-ppc-RCAAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGGAGTTGCGCAGTGCAGTGACGTAGCAGTp19-MscCG-A1ATTAATTAAGCTTAAAGGAGGAAATCATGAGTTTAGGCGTACCp19-MscCG-A100VGCGCAATGGTGACCATGCGTCGp19-MscCG-A100VGACCAATGGTGACGTGGACGTTGGCGCAGAp19-MscCG-A100VGACCAATGGTGACGTGGACGTGGp19-MscCG-A100VGACCAATGGTGACGGAGTGGTGGACGTGGAGAGTGGAGAGTGGGAAGTp19-MscCG-A100VGACCAATGGTGACGGAGAGCp19-MscCG-A100VGACCAATGGTGACGGAGCGAGAGCGAATCATGGGAAGACAGCGp19-MscCG-A100VGACCAATGGACGCAGTGGTGGAGGAAATCATGGAAGAAGAGAGAG	RBS3odhA-F	${\tt AAACAGAATTAATTAAGCTT} {\tt CCTCGTCTTACAGCTCGTTTTAACGTGAGCAGCGCTAGTACT}$
pl9-ppc-FiAAACAGATTAATTAAAGCTTAAAGGAGGAAATCATGACTGATTTTCTACGCGATGApl9-ppc-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCGGAGTTGCGCAGTGCAGTGCAGTGpl9-MscCG-MATTAATGAGCTTAAAGGAGGGAAATCATGATTTTAGGCGTACCpl9-MscCG-A100VFGCGATTCCGGTGACCATTGCGTCpl9-MscCG-A100VFGCGCAATGGTCACCGGAATCGCpl9-MscCG-A100VFGCGCAGTGACTGGACTGTGpl9-MscCG-A100VFGCGCAGTGGACGTGACGCGAATGCCpl9-MscCG-A100VFGCTCAGCTGGATGGTCTGpl9-MscCG-A100VFGCTCAGCTGGATGGTCGACGCpl9-MscCG-A100VFGCTCAGCTGACTGACGCGACGCpl9-MscCG-A100VFGCTCAGCTGAGTGGATGTGCpl9-MscCG-A100VFGCTCTGGGGCAGTGGATGGTGGACGAGAGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCpl9-MscCG-A100VFGCTCTGGGGCAGTAGCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAGAATGCGAATTGCCpl9-mscCG-A100VFGAGCCGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGAGGAAATGATGGAAATGATGGAATTGCpl9-mscCG-A100VFGAGCCGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGGGAGAATGAAGAAGAAGAAGAACAAGAACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA	RBS4odhA-F	$AAACAGAATTAATTAAGCTT {\color{black} {\bf C}} {\bf C} {\bf$
p19-ppc-RCAAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAGCCGGAGTTGCGCAGTGCAGTp19-MscCG-RATAATTAAGCTTAAAGGAGGAAATCATGATTTAGGCGTACCp19-MscCG-A100VFCGAATCGCGGAGCGTGGCGCGAGTGGCGCAAp19-MscCG-A100VFGCGCAATGGCACGCGAATCGCp19-MscCG-A100VFCGCACAGCGGAGTGGCAGCGCAGCp19-MscCG-A100VFCGTCTGGTGTGCAGTGGACGCp19-MscCG-A100VFGCTCTGGTGTGCAGTGGACGCp19-MscCG-A100VFCAGACAACAGCGAGCGCAGCp19-MscCG-A100VFGCTCTGGTGTGCAGTGGAGTGGTGGCAGCGGAATCGCAGAGCAGAGCAGAGCAGAGCp19-MscCG-A100VFGCACAACAGACCAGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCp19-MscCG-A100VFCAGGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCp19-MscCG-A100VFCAGGCAACCAGGAATCCCATCCAAACATTGCCTGGGCAGp19-MscCG-A100VFCAGGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAGAGAATGCAGAACTAAGGAGAACTAAGGp19-mscCG-A100VFCAGGCAACACAGGAGACCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAGAATGGAAATGAGGAAATGAGGAAATGAGGAAATGAGGAAGAA	p19- <i>ppc</i> -F	AAACAGAATTAATT <u>AAGCTT</u> AAAGGAGGGAAATCATGACTGATTTTCTACGCGATGA
p19-MscCG-FATTAATTAAGGTTAAAGGAGGGAAATCATGATTTTAGGCGTACCp19-MscCG-RCAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAAGGGGTGGACGTTGGCGCAAp19-MscCG-A100VFGCGATTCGGTGACCATTGCGTCp19-MscCG-A10VFCAGCCAATGGTCACGGAATCGCp19-MscCG-A10VFCAGCCAATGGTCACGGACCp19-MscCG-A10VFCAGCCAATCGACGCACCAAGACCp19-MscCG-A10VFGCTCTGGTGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A10VFCAGCCAATCGACGCAATCGACGCAAGACCp19-MscCG-A120VFGCACAATCGACTGCAACCAAGACCp19-MscCG-A120VFCAGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGACATGGCAATTGCp19-MscCG-A120VFCAGGCAACCAGGCAATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAGp19-mscCG-A120VFCAGGCAACCAGGCAATCCATGGAATCATGGAGGAAATCATGGAAGACATGGCAATTGCp19-mscCG-A120VFCAGGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGACATGGCAATTGCp19-mscCG-A120VFCAGGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGACATGGCAATTGCp19-mscCG-A120VFCAGGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAGAAGACATGGCAATTGCp19-mscCG-A120VFCAGGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAGAGAATGATGGAAATTGACGAAGACATGGAAATTCAAGGAGGAAATCATGGGGAGAAATCATGGGAAGAATGATGGAAGAAATGATGGGAAATGATGAGAGAAATGATG	p19- <i>ppc</i> -R	CAAAACAGCCAAGCT <u>GAATTC</u> CTAGCCGGAGTTGCGCAGTGCAGT
p19-MscCG-RCAAAACAGCCAAGCTGAATTCCTAAGGGGTGGACGTTGGCGCAAp19-MscCG-A100VFGCGATTCCGGTGACCATTGCGTCp19-MscCG-A100VFGCGTCAGCTGTGATTGGTCTTGp19-MscCG-A100VFCAGACCAATCACAGCTGACGCp19-MscCG-A100VFGCTTTGGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A100VFGCTTTGGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A100VFGCTCTGGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A100VFGCTCTGGTGCAGTCGATTGTAGCp19-MscCG-A100VFGCACAATCGACGCAGCAGAATCATGGGAAATCATGGAAGCAATGCGAATTGCp19-MscCG-A10VFGCAGCAACGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGCAATGCGAATTGCp19-mscCG-A10VFCAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGGAGAATGCGAAATGAGGAAATGATGGAAATGAGGAAATGATGGAAGAA	p19-MscCG-F	ATTAATT <u>AAGCTT</u> AAAGGAGGGAAATCATGATTTTAGGCGTACC
p19-MscCG-A100VFGCGATTCCGGTGACCATTGCGTCp19-MscCG-A100VFGACGCAATGGTCACCGGAATCGCp19-MscCG-A106VFGCGTCAGCTGTGATTGGTCTTGp19-MscCG-A106VFGACACAATCACAGCTGACGCp19-MscCG-A120VFGTCTTGGTGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A120VFGCACAATCGACTGCAACCCAAGACC90e-pfk-FCAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC90e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTATCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG90e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGT90e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GATCCTTAGAGTCGATGGTTGACAATTAATCATCGGpfk-pyk-3GCCCAGGCAATGTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCGGACAGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAGACGAAG	p19-MscCG-R	CAAAACAGCCAAGCT <u>GAATTC</u> CTAAGGGGTGGACGTTGGCGCAA
p19-MscCG-A100V-RGACGCAATGGTCACCGGAATCGCp19-MscCG-A106V-FGCGTCAGCTGTGATTGGTGCAGTCGATGGCp19-MscCG-A120V-FGACCCAATCACAGCCGAATCGCp19-MscCG-A120V-FGCACAATCGACTGCAATCGCAAGACCp19-MscCG-A120V-FGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGCp9e-pfk-FGCAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC99e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG99e-pyk-FCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GATCCTCTAGAGTCGACTGpfk-pyk-3TGCCAGGCAATGTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	p19-MscCG-A100V-F	GCGATTCCGGTGACCATTGCGTC
p19-MscCG-A106V-FGCGTCAGCTGTGATTGGTCTTGp19-MscCG-A106V-FCAAGACCAATCACAGCTGACGCp19-MscCG-A120V-FGGTCTTGGTGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A120V-FCAACAATCGACTGCACACCAAGACC99e-pfk-FCAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC99e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG99e-pyk-FACAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	p19-MscCG-A100V-R	GACGCAATGGTCACCGGAATCGC
p19-MscCG-A106V-RCAAGACCAATCACAGCTGACGCp19-MscCG-A120V-RGGTCTTGGTGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A120V-RCAACAATCGACTGCACACCAAGACC99e-pfk-FCAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC99e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-FACAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	p19-MscCG-A106V-F	GCGTCAGCTGTGATTGGTCTTG
p19-MscCG-A120VFGGTCTTGGTGTGCAGTCGATTGTTGCp19-MscCG-A120VFGCAACAATCGACTGCAACCAAGACC99e-pfk-FCAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC99e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAGG99e-pyk-FACAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAGG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> TTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	p19-MscCG-A106V-R	CAAGACCAATCACAGCTGACGC
p19-MscCG-A120V-R GCAACAATCGACTGCACACCAAGACC 99e-pfk-F CAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC 99e-pfk-R CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG 99e-pyk-F ACAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG 99e-pyk-R CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> TTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGT 99e-pyk-R CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> TTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGT pfk-pyk-1 CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACC pfk-pyk-2 GGATCCTCTAGAGTCGACCTG pfk-pyk-3 TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGG pfk-pyk-4 CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	p19-MscCG-A120V-F	GGTCTTGGTGTGCAGTCGATTGTTGC
99e-pfk-FCAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC99e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG99e-pyk-FACAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> TTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	p19-MscCG-A120V-R	GCAACAATCGACTGCACAACAAGACC
99e-pfk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG99e-pyk-FACAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	99e- <i>pfk</i> -F	CAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGAAGACATGCGAATTGC
99e-pyk-FACAGGAAACAGACCATGGAATTCAAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	99e- <i>pfk</i> -R	CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG
99e-pyk-RCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGTpfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	99e- <i>pyk</i> -F	ACAGGAAACAGACCATG <u>GAATTC</u> AAAGGAGGGAAATCATGGGCGTGGATAGACGAACTAAG
pfk-pyk-1CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACCpfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	99e- <i>pyk</i> -R	CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> TTAGAGCTTTGCAATCCTTGTGT
pfk-pyk-2GGATCCTCTAGAGTCGACCTGpfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	pfk-pyk-1	CTATCCAAACATTGCCTGGGCAGTAACC
pfk-pyk-3TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGGpfk-pyk-4CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	pfk-pyk-2	GGATCCTCTAGAGTCGACCTG
<i>pfk-pyk-</i> 4 CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG	pfk-pyk-3	TGCCCAGGCAATGTTTGGATAGTGTTGACAATTAATCATCCGG
	pfk-pyk-4	CAGGTCGACTCTAGA <u>GGATCC</u> CTATCCAAACATTGCCTGGGCAG

表1 本研究所用引物

The bold sequences are different RBS sequences and the underlined sequences are restriction sites.

ΔalaT-1-F/R 和 ΔalaT-2-F/R 分别扩增基因 alaT 的上下游同源臂,以 EcoR I和 Hind III限制性内 切酶对本实验室保存的 pK18mobsacB (pK18)质 粒进行双酶切线性化。将扩增产物与线性化载 体用 DNA 连接酶连接,将连接产物转化至 E. coli JM109 感受态细胞,于卡那霉素抗性平板 培养, 筛选转化子验证正确的接入 LB 培养基培养, 37 ℃过夜培养取菌液抽提质粒, 将重组质粒送至天霖生物科技(上海)有限公司测序以确认重组质粒 pK18-Δ*alaT* 是否构建成功^[13-14]。 pK18-Δ*odhA*、pK18-Δ*mscsg*、pK18-*MscCG*-A100V 质粒的构建过程与此类似。

1.3 转录组分析与基因组测序

将原始菌株 C. glutamicum E01 与 C. glutamicum G01 分别进行 5 L 发酵罐发酵,在菌体到达对 数生长期(18 h)时取样,4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,液氮中放置 10 min 后置于 -80 ℃冰箱中,送至苏州金唯智生物科技有限 公司进行转录组分析与基因组测序。

1.4 重组菌株的构建与表达

1.4.1 C. glutamicum 基因缺失突变株的构建

C. glutamicum 的基因敲除方法采用 pK18mobsacB 质粒进行。以 alaT 基因敲除为 例,采用电穿孔法将 pK18-ΔalaT 转化^[15]至 C. glutamicum G01 感受态细胞中,30 ℃培养 2-3 h 后涂布 Kan 抗性的 BHI 平板,培养 48 h 后 利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定进行第一轮筛选,挑取阳性转化子于 含有 Kan 抗性的 BHI 液体培养基培养 12 h 后, 吸取 100 μL 菌液涂布于含有 10%蔗糖的 BHI 无抗性平板上,进行第二轮筛选,随机挑选转 化子进行 PCR 鉴定,筛选到 alaT 基因缺失菌 株 G01ΔalaT 后提取其基因组送至天霖生物科 技(上海)有限公司测序以证明基因成功敲除。

1.4.2 过表达菌株的构建与表达

将上文构建的 pXMJ19-gltA 等质粒采用电 穿孔法转化至 C. glutamicum G01 感受态细胞 中,筛选正确的进行菌株命名。

将 *C. glutamicum* G01 及构建好的谷氨酸棒 杆菌重组菌在氯霉素抗性 BHI 固体平板上划线 活化,挑取单菌落接入 10 mL 氯霉素抗性的 BHI 液体小瓶中,于 30 °C、180 r/min 培养 12–18 h 后以 1%接种量接种至 50 mL BHI 液体培养基 中,30 °C、180 r/min 培养 6 h 后,添加 1 mmol/L 终浓度的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropylβ-D-thiogalactoside, IPTG)诱导,继续于 30 °C、 180 r/min 培养 12–16 h 后,于4 °C离心收集菌 体。用 Tris 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5)洗涤 2 次菌体后,用 5 mL Tris 缓冲液重新悬浮,将混合液用超声破碎仪破碎后进行离心 20 min (12 000 r/min, 4 ℃),收集的上清液即为粗酶液,可用于SDS-PAGE分析以及后续酶活的测定。

1.4.3 重组谷氨酸高产菌株的构建

经以上策略组合,首先对 C. glutamicum G01-ΔalaT 经 RBS 替换得到 C. glutamicum G01-ΔalaT-RBS4odhA, 经 GDH 整合得到 C. glutamicum G01-ΔalaT-RBS4odhA::An-gdh, 对其进行 MscCG 突变得到 C. glutamicum G01-ΔalaT-RBS4odhA::An-gdh-MscCG^{A100V}, 命名为 C. glutamicum AO 01,之后实现 pfk、 pyk 以及 ppc 的共表达。最终得到 C. glutamicum AO 01/99E-pfk-pyk/pXMJ19-ppc,将其命名为 C. glutamicum AO 02。

1.5 相关酶酶活测定

丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALAT)酶活力的测定:使用 AT 活性检测方法测定,一个单位的丙氨酸氨基转移酶活力定义为每分钟转化1 mmol/L 丙氨酸所需的酶量^[16]。

柠檬酸合酶酶活力的测定:通过 5,5'-二硫代 双(2-硝基苯甲酸)测定在 412 nm 下的吸光值,其 与乙酰辅酶 A 反应会使反应体系在 412 nm 处的 吸光值改变。一个单位的柠檬酸合酶活力定义为 每分钟转化 1 mmol/L 乙酰-CoA 所需的酶量^[8]。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶酶活力的测定: 通过苹果酸脱氢酶偶联法测定,一个单位的磷 酸烯醇式丙酮酸羧化酶酶活力定义为在 30 ℃ 下每分钟氧化 1 μmol NADH 所需的酶量^[17]。

α-酮戊二酸脱氢酶酶活力的测定:通过以 NAD⁺为辅酶,测定在 340 nm 处 ODHC 催化 α-酮戊二酸生成琥珀酰辅酶 A 反应的吸光度变 化。一个单位的 α-酮戊二酸脱氢酶酶活力定义 为每分钟生成 1 μmol NADH 或 NAD⁺ (或盐酸 苯腙衍生物)所需的酶量[17]。

磷酸果糖激酶酶活力的测定:参照 Blangy 的方法测定 340 nm 处吸光值的变化,一个单位 酶活力定义为每分钟转化 1 μmol NAD⁺所需酶 的量^[18]。

谷氨酸脱氢酶酶活力测定: 10 mmol/L 辅 酶 NADH, 0.5 mol/L 硫酸铵溶液, 0.1 mol/L 磷 酸缓冲液(pH 7.5)。按照上述反应体系配制反应 溶液。酶活单位(U)定义:在上述条件下,每分 钟生成 1 µmol L-草铵膦所需的酶量。

丙酮酸激酶酶活力测定:参照 Jetten 等^[19] 的方法测定 340 nm 处吸光值的变化,一个单位 酶活力定义为每分钟转化 1 μmol NADH 所需 酶的量。

1.6 重组菌株发酵

菌株经平板划线活化后,挑取单菌落接入 10 mL 的 BHI 液体培养基,过夜培养后以 1%接 种量转接至 10 mL 种子培养基,30 ℃、180 r/min 培养 24 h 后作为一级种子液。将一级种子全部 接入至装有 200 mL 的种子培养基的 1 L 大瓶 中,以相同条件培养 12 h 后作为二级种子液, 将其全部转接至装有 1.8 L 发酵培养基的 5 L 发 酵罐中。发酵条件为温度:前期 30 ℃发酵,10 h (*OD*₆₀₀ 约为 30 时)开始升温至 32 ℃,后每间隔 2 h 升 2 ℃,升至 37 ℃后恒温发酵;转速 600 r/min, 通气量为 4 vvm, pH 7.0 (流加 50%氨水控制), 当葡萄糖浓度降为 20 g/L 左右时流加 80%葡萄 糖溶液。需要进行诱导的菌株在发酵 12 h 后, *OD*₆₀₀ 约为 20 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。

1.7 发酵过程相关参数测定

对发酵液定期取样后适当稀释,测定其在 600 nm 处的吸光度 *OD*₆₀₀,葡萄糖和谷氨酸的 浓度采用生物传感分析仪 SBA-40E 测定。

2 结果与分析

2.1 转录组及基因组数据分析

对 C. glutamicum E01 与 C. glutamicum G01 的谷氨酸合成关键途径中相关基因进行转录组 差异分析。图 2 中对糖酵解途径中的 22 个相关 基因、磷酸戊糖途径中的 18 个相关基因以及三 羧酸循环的 20 个相关基因进行转录水平差异 分析,结果发现 odhA、tpiA 基因转录水平明显 下调, ppc、gltA、pfk、pyk 基因转录水平上调。

为了验证转录水平差异变化显著的基因是 否在基因碱基处发生变化,进行了基因组全测 序分析,结合实验室前期测得的重测序结果, 发现基因水平上的差异,结果见表 2。对关键 基因突变后的研究发现基因突变对酶活的影响 不大,后续实验会在 C. glutamicum G01 中研究 突变基因对谷氨酸合成的影响。

2.2 丙氨酸氨基转移酶敲除降低副产物丙 氨酸含量

前期通过对 C. glutamicum G01 菌株发酵液的各种氨基酸含量进行测定时发现,丙氨酸



图 2 关键基因表达差异图

Figure 2 Difference map of key genes expression.

表	2	蜝	因	组测	序	差	异
---	---	---	---	----	---	---	---

Table 2	Genome sequencing differences
Genes	Descriptions
gltA	A4T, S79C, S156T, A243E, A252D
pfk	V263A, S317R, E325D
pyk	S327A
odhA	E1220K, E1180A, N1093D, I967V, L449F,
	N424S, N413S, N413D, A238T, T84A
ppc	Q14R, Y85H, G241D, E267G, H274R, K303E,
	A310E, K383T, A408S, A433T, A441E, Q542R,
	D549G, R634K, A704T, L773F, T829R, R840H

为其发酵过程中的主要副产物,浓度为 (8.13±0.550)g/L,其次是缬氨酸(图 3A),尝试 通过对主要副产物丙氨酸合成途径中丙氨酸氨 基转移酶合成基因 alaT 进行敲除以有效降低副 产物的含量。按照 1.4.1 的方法进行基因敲除, PCR 鉴定结果如图 3B 所示,条带与目标条带 1 400 bp 大小一致,证明基因 alaT 成功敲除。

对 G01-Δ*alaT*与 G01 菌株分别培养提取粗 酶液后测得: G01 中 ALAT 的比酶活为 (80.0±4.43) U/mL, 而在菌株 G01-Δ*alaT* 中未检 测到 ALAT 的酶活性,进一步证明基因 alaT 被成功敲除。

将活化后的菌株接 10 mL BHI 小瓶液体 培养基中,经两级种子培养后进行 5 L 发酵罐 分批补料发酵。发现 *alaT* 敲除后与敲除前相 比,丙氨酸含量由(8.13±0.550) g/L 下降至 (2.23±0.092)g/L,下降了 72.57%,减少了副产 物丙氨酸的生成,后续以 G01-Δ*alaT* 菌株为底 盘进行后续的改造。

2.3 L-谷氨酸代谢流的强化

2.3.1 弱化 α-酮戊二酸脱氢酶复合体活性促进 谷氨酸合成

降低 ODHC 复合体活性是提高谷氨酸产量的一种有效方法^[20],有研究称通过改变 RBS 序列^[21]或者通过 *odhA* 抑制蛋白 OdhI 来降低 ODHC 的活性^[7,22-23]。按照 1.3.2 的方法构建菌 株得到重组菌株 CG1、CG2、CG3 和 CG4,在 RBS 预测网站上预测得到的结果显示 G01 原始 菌的 *odhA* 基因前的 RBS 序列的强度为 47 au,



图 3 Corynebacterium glutamicum G01 的代谢副产物(A)与 alaT 敲除的 PCR 鉴定结果(B)

Figure 3 Metabolic by-products (A) of *Corynebacterium glutamicum* G01 and PCR identification results of *alaT* knockout (B). M: 5 000 bp nucleic acid marker; 1 and 2: PCR results of strain G01 $\Delta alat$; 3 and 4: PCR results of strain G01.

预测得到的4条 RBS 序列强度采取梯度降低的 方式, RBS1/2/3/4 的强度分别为30、20、10和 5 au,同时测定这4株重组菌株与*C. glutamicum* G01 的 ODHC 酶活,结果如图4所示,重组菌 CG1、CG2、CG3 与原始菌相比,ODHC 酶活 均未有明显改变,可能是因为网站只是基于预 测,并未真实地反映 RBS 序列对基因的调控强 度,而 CG4 菌株的酶活有明显降低,比酶活为 (0.469±0.131) U/mg,与原始菌的(1.795±0.32) U/mg 相比比酶活降低了73.87%,通过对 odhA 转录 水平的进一步测定,发现除 CG4 转录水平明显 下降外,其余菌株转录水平未有明显变化甚至 略有升高,后续研究将会使用 RBS4 序列进行 替换研究。

2.3.2 增加 L-谷氨酸合成的前体供应菌株构建 与表达

按照 1.3.2 中的方法进行 gltA 基因的过表 达, PCR 鉴定结果如图 5A 所示,条带大小为 1 314 bp,与 gltA 基因的大小相符,证明 G01/pXMJ19-gltA 构建成功。将其与对照菌株 进行蛋白表达鉴定, G01/pXMJ19-gltA 的 CS 表达量明显高于 G01 对照菌株,其条带大小约为 42.6 kDa,说明 CS 成功在 G01 中过表达(图 5B)。 对 G01/pXMJ19-gltA 的 CS 酶活测定显示为 (123.26±1.24) U/mL,较对照菌 G01 中 CS 的酶 活(25.97±0.37) U/mL 提高了约 3.8 倍,即在 G01/pXMJ19-gltA 中 gltA 的过表达提高了 CS 的酶活水平。

按照 1.3.2 中的方法进行 ppc 基因的过表 达, PCR 鉴定结果如图 6A 所示,条带大小为 2 760 bp,与 ppc 基因的大小相符,证明 G01/pXMJ19-ppc 构建成功。对其与对照菌株进 行蛋白表达鉴定(图 6B),G01/pXMJ19-ppc 的 PEPC 表达量明显高于 G01 对照菌株,其条带 大小约为 103.2 kDa,说明 PEPC 成功在 G01 中 过表达。对 G01/pXMJ19-ppc 的 PEPC 进行酶活 测定,结果显示 G01/pXMJ19-ppc 的 PEPC 酶活为 (182.89±7.23) U/mL,较原始菌的(39.23±2.87) U/mL 提高了约 3.7 倍,即在 G01/pXMJ19-ppc 中 ppc 的过表达提高了 PEPC 的酶活。



图 4 odhA 弱化菌株的 ODHC 酶活(A)与 odhA 基因转录水平(B)

Figure 4 ODHC enzyme activity level (A) and *odhA* gene transcription level (B) of *odhA* weakened strain.



图 5 Corynebacterium glutamicum G01/pXMJ19-gltA 的 PCR 鉴定(A)和表达(B)

Figure 5 PCR (A) and expression (B) identification results of *Corynebacterium glutamicum* G01/pXMJ19-gltA strain. A: PCR identification results of *C. glutamicum* G01/pXMJ19-gltA strain. M: 10 000 bp nucleic acid marker; 1, 2: PCR product of the *gltA* gene. B: Expression identification results of *C. glutamicum* G01/pXMJ19-gltA strain. M: Protein marker; 1: Crude enzyme solution of *C. glutamicum* G01/pXMJ19-gltA; 2: Crude enzyme solution of control *C. glutamicum* G01/pXMJ19.



图 6 Corynebacterium glutamicum G01/pXMJ19-ppc 的 PCR (A)鉴定和表达(B)

Figure 6 PCR (A) and expression (B) identification results of *Corynebacterium glutamicum* G01/pXMJ19-ppc strain. A: PCR identification results of *C. glutamicum* G01/pXMJ19-ppc strain. M: 15 000 bp nucleic acid marker; 1, 2: PCR product of the *ppc* gene. B: Expression identification results of *C. glutamicum* G01/pXMJ19-ppc strain. M: Protein marker; 1: Crude enzyme solution of control *C. glutamicum* G01/pXMJ19; 2: Crude enzyme solution of *C. glutamicum* G01/pXMJ19-ppc.

按照前述方法进行 pfk、pyk 基因的过表达, 对重组菌株与对照菌株进行蛋白表达鉴定,重 组菌株的 PFK、PYK 表达量明显高于 G01 对照 菌株(图 7)。对重组进行酶活测定,重组菌 G01/pEC-XK99E-pfk 破碎液上清中 PFK 的比酶活 为(54.14±0.03) U/mL,同对照的(18.23±0.01) U/mL 相比提高了约 2 倍; 重组菌 G01/pEC-XK99E-pyk 破碎液上清中PYK的比酶活为(142.42±0.06) U/mL, 与对照的(43.68±0.05) U/mL 相比提高了约 2.3 倍 (图 8)。证明在 G01 中成功实现了基因的过表达 并提高了 PFK 和 PYK 的酶活。

2.4 筛选不同来源谷氨酸脱氢酶提高谷氨酸合成能力

谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase,

3283



图 7 Corynebacterium glutamicum G01/pEC-XK99E-pfk (A)与 G01/pEC-XK99E-pyk (B)的表达鉴定 Figure 7 Expression identification results of Corynebacterium glutamicum G01/pEC-XK99E-pfk (A) and G01/pEC-XK99E-pyk (B) strain. A: Expression identification results of C. glutamicum G01/pEC-XK99E-pfk. M: Protein marker; 1: G01/pEC-XK99E-pfk; 2: G01/pEC-XK99E. B: Expression identification results of C. glutamicum G01/pEC-XK99E-pyk. M: Protein marker; 1: G01/pEC-XK99E; 2: G01/pEC-XK99E-pyk.

较高的 GDH。

GDH)是谷氨酸代谢的关键酶,且在有机酸测定 过程中发现存在未转化完全的α-KG,因此,猜 测 GDH 酶活水平的提高,可能会改善谷氨酸合 成。本实验选取了大肠杆菌、枯草芽胞杆菌 (Bacillus subtilis)、谷氨酸棒杆菌、木糖双歧杆菌 (Amphibacillus xylanus)以及黑曲霉菌(Aspergillus niger)等不同来源的 GDH,通过多序列比对分





始菌,但二者最适 pH 相差不大且在 30 ℃条件下 发酵,其 GDH 酶活性仍高于原始菌。后续将采

用 A. niger 来源的 GDH 进行基因组的整合。

析得出了各自序列相似度(图 9A)。通过进行酶

学性质研究,期望筛选出酶学性质稳定且酶活

以及比酶活研究发现A. niger来源的GDH比酶活

较高(表 3)。随后对其进行 GDH 过表达的菌株

G01/pXMJ19-An-gdh 与内源 GDH 过表达菌株 G01/pXMJ19-Cg-gdh 进行了 5 L 发酵罐发酵。发

酵结果显示, A. niger 来源 GDH 过表达的菌株的

L-Glu 产量为 113.8 g/L, 与对照的 96.5 g/L 相比

提升了 17.9%, 而进行内源 GDH 过表达并未增

加谷氨酸产量(图 9B), 三者的耗糖速率相当。可

能是因为虽然重组菌株的 GDH 最适温度高于原

对不同来源的 GDH 进行最适 pH、最适温度

2.5 谷氨酸转运蛋白结构优化促进谷氨酸的外排

谷氨酸转运蛋白(MscCG)是一种机械敏感 通道蛋白,有研究表明 MscCG 与谷氨酸的排泄 有关,且仅增加 MscCG 的表达量并不能提高谷



图 9 不同来源 GDH 序列比对结果(A)与 Aspergillus niger 来源的 GDH 的补料分批发酵(B) Figure 9 Results of GDH sequence comparison between different sources (A) and the fed-batch fermentation of GDH from Aspergillus niger (B). Residual glucose: C. glutamicum G01 (pink), G01/pXMJ19-An-gdh (blue), G01/pXMJ19-Cg-gdh (orange). L-Glu: G01 (green), G01/pXMJ19-An-gdh (red), G01/pXMJ19- Cg-gdh (yellow).

氨酸的产量。Nakayama 等^[24]对 MscCG 的 T3 跨膜区进行定点突变(A100V、A106V)和插入氨 基酸的方法改变了 MscCG 的结构,从而提高了 谷氨酸产量。由于现有研究无该转运蛋白的晶 体结构,本研究选择 Alphafold2.0 对其三级结 构进行预测,随后采用在线服务器(https://saves. mbi.ucla.edu/),通过评价参数 REEAT 打分的数值 对转运蛋白的建模模型质量进行评价。REEAT 打 分为 92.44 (>85),证明建模结果可靠(图 10A)。 MscCG 整体结构与大肠杆菌 MSCs 类通道相 似,但 MscCG 存在 4 个跨膜域,而 MSCs 仅存

表 3 不同来源 GDH 的酶学性质研究

Table 3Enzymatic properties of GDH from differentsources

Source	Optimum pH	Optimum	Specific	
		temperature	activity	
		(°C)	(U/mg)	
E. coli	7.5	55	$60.0{\pm}2.8$	
B. subtilis	7.5	65	$65.0 {\pm} 5.0$	
C. glutamicum	7.0	45	170.0 ± 3.2	
A. xylanus	8.5	50	172.0±3.6	
A. niger	7.5	50	275.0±4.3	

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

在3个,这使得 MscCG 的 C 端和 N 端细胞外 环可以使通道关闭状态更加稳定^[25]。随后通过 Discovery Studio 软件对转运蛋白及氨基酸底物 进行分子对接,结果显示谷氨酸在转运出细胞 时会通过转运蛋白的空腔,靠近第3个β螺旋 (87A-124L)。预测谷氨酸与该螺旋上氨基酸残 基产生相互作用而改变转运效率,预测得出的 位点为 A106V 与 A120V。根据上述策略,构建 了菌株 G01/pXMJ19-MscCGA100V、G01/pXMJ19-MscCG^{A106V}和 G01/pXMJ19-MscCG^{A120V}。对 重组菌株及 G01/pXMJ19-MscCG 进行 5 L 发 酵罐发酵,发酵结果如图10所示,增加MscCG 的表达量并不能提高谷氨酸的产量。而 A100V 突变体较原始菌产量提高了 23.58% (96.53 g/L→119.3 g/L); A106V 突变体谷氨酸产 量为 106.7 g/L, 提升了 10.54%; A120V 突变体 较原始菌相比产量未有明显改变。可能是通道 的门控阈值降低, 使得渗透压引起的膜张力更 容易激活通道的打开^[24]。后续将采用 A100V 突 变位点进行基因组上的整合操作。



图 10 MscCG 的同源建模(A)与 MscCG 突变菌株的补料分批发酵(B) Figure 10 Homology modeling of MscCG (A) and the fed-batch fermentation of MscCG mutant strains (B). G01 (black line), G01/pXMJ19-MscCG^{A100V} (red line), G01/pXMJ19-MscCG^{A106V} (green line), G01/pXMJ19-MscCG^{A120V} (blue line), G01/pXMJ19-MscCG (purple line).

2.6 发酵验证重组菌株产谷氨酸水平

由图11可知,发酵84h后,菌株C.glutamicum G01 谷氨酸产量达到(96.53±2.32) g/L, 糖酸转 化率为 44.2%; C. glutamicum G01/pXMJ19-ppc 与 C. glutamicum G01/pXMJ19-gltA 的菌株生 长速率与初期的葡萄糖消耗速率与原始菌 C. glutamicum G01 相比有所提高,可能是 PEPC 酶活的提高增加了草酰乙酸的供应,强化了 TCA 循环,从而提高了葡萄糖消耗速率与生长 速率; 而 CS 酶活的提高直接强化了进入 TCA 循 环起始部分的碳流量,使得菌体的生长速率与耗 糖速率增加。菌株 C. glutamicum G01/pXMJ19ppc 在发酵 60 h 处 L-谷氨酸产量达到最大值 (108.33±2.08) g/L, 较出发菌株相比产量提高了 12.2%, 而菌株 C. glutamicum G01/pXMJ19-gltA 仅是生长速度略微变快,产量并无明显变化, L-谷氨酸产量为(90.33±2.26) g/L, 说明仅通过 提高 CS 酶活并不能提高 L-谷氨酸产量^[12,26-27]。 C. glutamicum G01/pEC-XK99E-pfk 与 C. glutamicum G01/pEC-XK99E-pyk 的生长速率较原始菌相比

在初期略低于原始菌,可能是 pfk 的过表达加 强了菌体的负荷,使得初期菌体生长速率较慢, 同时由于增强了 EMP 途径, 使得葡萄糖消耗速 率提高; 而 pyk 的加强加重了菌体的负荷, 且 PYK 控制着丙酮酸的外流量,代谢过程需要更多 的糖参与^[10]。C. glutamicum G01/pEC-XK99E-pfk L-谷氨酸产量为(107.66±1.89) g/L,产量提高了 11.6%; C. glutamicum G01/pEC-XK99E-pyk的 L-谷氨酸产量为(106.33±2.45) g/L,产量提高了 10.2%。C. glutamicum G01-∆alaT 菌株在 72 h 处 L-谷氨酸达到最大积累量(101.33±1.67) g/L, 提高 了 5.0%。其谷氨酸产量未有明显增长,可能是因为 代谢通量的改变不大。C. glutamicum G01/pXMJ19-RBS4odhA 菌体生长并未受到明显影响,在发酵 期间谷氨酸合成速率略高于原始菌株,于72h处 达到最大谷氨酸浓度(119.67±1.98)g/L, 与原始 菌株相比, L-谷氨酸积累量提高了 24.0%。证 明 α-酮戊二酸向琥珀酰辅酶 A 的途径的代谢分 布强弱直接影响了 L-谷氨酸的合成, ODHC 活 性的降低能够有效地增加了 L-谷氨酸的产量。



图 11 重组菌株的补料分批发酵

Figure 11 The fed-batch fermentation of recombinant strains. A: Cell growth rate. B: L-glutamate concentration. C: Residual glucose concentration. *Corynebacterium glutamicum* G01 (black lines), G01-Δ*alaT* (red lines), G01/pXMJ19-*gltA* (blue lines), G01/pXMJ19-RBS4*odhA* (purple lines), G01/pXMJ19*ppc* (yellow lines), G01/pEC-XK99E-*pfk* (green lines), G01/pEC-XK99E-*pyk* (orange lines).

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

2.7 重组谷氨酸高产菌株的发酵验证

对 C. glutamicum AO 02 菌株进行 5 L 发酵罐 发酵,在发酵过程中菌株的生长速率相对于原始 菌略有降低,可能是菌体负荷过大导致前期耗糖 速率变慢。C. glutamicum AO 02 菌株发酵 84 h后, 其谷氨酸最大积累量为(136.33±4.68) g/L,较原始 菌提高了 41.2%;此外,该菌株的糖酸转化率为 55.8%,较原始菌提高了 11.6%,可能是因为重组 菌株并没有消耗过多的糖来让自身生长而是用 来合成谷氨酸。本研究构建的重组菌株,谷氨酸 产量由(96.53±2.32) g/L 提升至(136.33±4.68) g/L, 且糖酸转化率提高了 11.6% (图 12),为谷氨酸棒



图 12 重组菌株 Corynebacterium glutamicum AO 02 的补料分批发酵

Figure 12 Fed-batch fermentation of recombinant strain *Corynebacterium glutamicum* AO 02. A: L-glutamate concentration and residual glucose concentration. B: Cell growth rate. 杆菌生产谷氨酸的代谢改造提供了理论指导, 并对谷氨酸工业化菌株构建提供了新的思路。

3 讨论

L-谷氨酸广泛应用于食品、医学、农学等 行业,有着巨大的应用前景。Li 等^[28]通过构建 谷氨酸棒杆菌细胞外层成分霉菌酸合成途径中 基因缺失菌株,谷氨酸产量提高了9倍。Ogata 等[29]通过研究铜离子对谷氨酸棒杆菌的胁迫作 用诱导产生谷氨酸,产量提高了 1.3 倍。陈宁 等^[30]通过温度控制实现细胞膜某些结构的改 变,在温度转换后实现了从谷氨酸非积累型细 胞向谷氨酸积累型细胞的转换,谷氨酸最高产 量为181 g/L,为目前公开报道的最高水平。本 研究通过系统代谢工程构建高产 L-谷氨酸 C. glutamicum 重组菌株, 对实验室前期经逐级 诱变得到的谷氨酸高产菌株 C. glutamicum G01 进行改造,通过对底盘细胞进行副产物途径基 因的敲除减少了副产物的生成,由于 TCA 循环 起点以及 α-酮戊二酸途径对谷氨酸的合成有重 要意义,因此本文研究了增强磷酸烯醇式丙酮 酸羧化酶、柠檬酸合酶以及 α-酮戊二酸脱氢酶 E1 亚基弱化和谷氨酸脱氢酶酶活力对合成谷 氨酸的影响,同时为了研究糖代谢速率以及丙 酮酸节点对三羧酸循环中谷氨酸的影响,研究 了 EMP 途径中的磷酸果糖激酶与丙酮酸激酶 的增强对合成谷氨酸的影响,最后研究了谷氨 酸外排蛋白对谷氨酸排泄的促进影响。基于以 上研究, 重组菌株的谷氨酸产量提高了 41.2%, 糖酸转化率提高了 11.6%。

本文通过代谢工程手段研究了谷氨酸合成 相关途径中的基因并有效地提高了其产量。但 本研究还不够全面,尚未对谷氨酸分泌有重要 影响的转录调控因子、辅因子供应以及发酵过 程优化等方面进行相关研究。下一步会继续研 究其他功能基因对谷氨酸产生的影响,进一步 提高谷氨酸产量。

REFERENCES

- NAKAYAMA Y. Corynebacterium glutamicum mechanosensing: from osmoregulation to L-glutamate secretion for the avian microbiota-gut-brain axis[J]. Microorganisms, 2021, 9(1): 201.
- [2] XU GQ, ZHA J, CHENG H, IBRAHIM MHA, YANG F, DALTON H. CAO R, ZHU YX, FANG JH, CHI KJ, ZHENG P, ZHANG XM, SHI JS, XU ZH, GROSS RA, KOFFAS MAG. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the *de novo* biosynthesis of tailored poly-γ-glutamic acid[J]. Metabolic Engineering, 2019, 56: 39-49.
- [3] LEE MJ, KIM P. Recombinant protein expression system in *Corynebacterium glutamicum* and its application[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2523.
- [4] CAO Y, DUAN ZY, SHI ZP. Effect of biotin on transcription levels of key enzymes and glutamate efflux in glutamate fermentation by *Corynebacterium* glutamicum[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2014, 30(2): 461-468.
- [5] ASAKURA Y, KIMURA E, USUDA Y, KAWAHARA Y, MATSUI K, OSUMI T, NAKAMATSU T. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1308-1319.
- [6] WADA M, SAWADA K, OGURA K, SHIMONO Y, HAGIWARA T, SUGIMOTO M, ONUKI A, YOKOTA A. Effects of phosphoenolpyruvate carboxylase desensitization on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(2): 172-177.
- [7] YAO WJ, DENG XZ, ZHONG H, LIU M, ZHENG P, SUN ZH, ZHANG Y. Double deletion of *dtsR1* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(7): 911-921.
- [8] BUCH AD, ARCHANA G, KUMAR GN. Enhanced

citric acid biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 by overexpression of the *Escherichia coli* citrate synthase gene[J]. Microbiology, 2009, 155(8): 2620-2629.

- [9] FORDYCE AM, CROW VL, THOMAS TD. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(2): 332-337.
- [10] 卢妍,饶志明,徐美娟,满在伟,张显,耿燕,许正宏. 钝齿棒杆菌丙酮酸激酶的克隆表达及其对精氨酸合成的扰动影响[J]. 中国生物工程杂志,2014,34(3):48-55.
 LU Y, RAO ZM, XU MJ, MAN ZW, ZHANG X, GENG Y, XU ZH. Cloning, expression of the pyruvate kinase gene from *Corynebacterium crenatum* and its effect on L-arginine synthesis[J]. China Biotechnology,
- [11] NAKAMURA J, HIRANO S, ITO H, WACHI M. Mutations of the Corynebacterium glutamicum NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4491-4498.

2014, 34(3): 48-55 (in Chinese).

- [12] 乔郅钠, 徐美娟, 龙梦飞, 杨套伟, 张显, 中西秀树, 饶志明. TCA 循环关键节点对 L-谷氨酸合成的影响[J]. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2113-2125.
 QIAO ZN, XU MJ, LONG MF, YANG TW, ZHANG X, ZHONG XXS, RAO ZM. Effect of key notes of TCA cycle on L-glutamate production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(10): 2113-2125 (in Chinese).
- [13] HASHIMOTO JG, STEVENSON BS, SCHMIDT TM. Rates and consequences of recombination between rRNA operons[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(3): 966-972.
- [14] MA WW, WANG XY, MAO YF, WANG ZW, CHEN T, ZHAO XM. Development of a markerless gene replacement system in *Corynebacterium glutamicum* using *upp* as a counter-selection marker[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(3): 609-617.
- [15] van der REST ME, LANGE C, MOLENAAR D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium* glutamicum with xenogeneic plasmid DNA[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(4):

541-545.

- [16] MARIENHAGEN J, EGGELING L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases AlaT and AvtA and impact on L-valine production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7457-7462.
- [17] HASEGAWA T, HASHIMOTO K-I, KAWASAKI H, NAKAMATSU T. Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(1): 12-19.
- [18] BLANGY D, BUC H, MONOD J. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Biology, 1968, 31(1): 13-35.
- [19] JETTEN MS, GUBLER ME, LEE SH, SINSKEY AJ. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(7): 2501-2507.
- [20] KAWAHARA Y, TAKAHASHI-FUKE K, SHIMIZU E, NAKAMATSU T, NAKAMORI S. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(7): 1109-1112.
- [21] ZHANG B, YU M, ZHOU Y, LI YX, YE BC. Systematic pathway engineering of *Corynebacterium* glutamicum S9114 for L-ornithine production[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-10.
- [22] SCHULTZ C, NIEBISCH A, GEBEL L, BOTT M. Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 691-700.
- [23] CHEN ML, CHEN XL, WAN F, ZHANG B, CHEN JC, XIONG YH. Effect of tween 40 and DtsR1 on L-arginine overproduction in *Corynebacterium crenatum*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 1-10.
- [24] NAKAYAMA Y, YOSHIMURA K, IIDA H. A gain-of-function mutation in gating of NCgl1221 Corynebacterium glutamicum causes constitutive glutamate secretion[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(15): 5432-5434.

- [25] NAKAYAMA Y, HASHIMOTO KI, SAWADA Y, SOKABE M, KAWASAKI H, MARTINAC B. Corynebacterium glutamicum mechanosensitive channels: towards unpuzzling "glutamate efflux" for amino acid production[J]. Biophysical Reviews, 2018, 10(5): 1359-1369.
- [26] WIEGAND G, REMINGTON SJ. CITRATE SYNTHASE: structure, control, and mechanism[J]. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 1986, 15: 97-117.
- [27] EIKMANNS BJ, THUM-SCHMITZ N, EGGELING L, LUDTKE KU, SAHM H. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the Corynebacterium glutamicum gltA gene encoding citrate synthase[J]. Microbiology, 1994, 140(8): 1817-1828.
- [28] LI HD, XU DQ, LIU YT, TAN X, QIAO J, LI ZH, QI B, HU XQ, WANG XY. Preventing mycolic acid reduction in *Corynebacterium glutamicum* can efficiently increase L-glutamate production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 177: 108255.
- [29] OGATA S, HIRASAWA T. Induction of glutamic acid production by copper in *Corynebacterium* glutamicum[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6909-6920.
- [30] 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: CN101705263A[P].
 2010-05-12.
 CHEN N, XU QY, XIE XX, et al. Method for

improving fermentation acid yield of glutamic acid temperature-sensitive mutant: CN101705263A[P]. 2010-05-12 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)