

研究报告

加强表达碳代谢全局转录因子对谷氨酸棒杆菌产L-丝氨酸的影响

张薇^{1,2}, 张晓梅^{*1,2}, 史劲松^{1,2}, 许正宏²

1 江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江苏集萃未来食品技术研究有限公司, 江苏 无锡 214122

张薇, 张晓梅, 史劲松, 许正宏. 加强表达碳代谢全局转录因子对谷氨酸棒杆菌产 L-丝氨酸的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 2997-3010.

ZHANG Wei, ZHANG Xiaomei, SHI Jinsong, XU Zhenghong. Effects of overexpression of global transcription factors of carbon metabolism on L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 2997-3010.

摘要:【背景】谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)广泛应用于氨基酸的生产, 是 L-丝氨酸的主要生产菌株之一。全局转录因子在胞内代谢物合成的调节中发挥着重要的作用, 调节具有特定功能的转录因子可以有效增加目标氨基酸的合成。【目的】研究谷氨酸棒杆菌碳代谢全局转录因子 GlxR、RamA、RamB、LldR、GntR1、SigB 和 SigH 对谷氨酸棒杆菌 A36-AC 的生长和 L-丝氨酸产量的影响。【方法】以本实验室保藏的产 L-丝氨酸的谷氨酸棒杆菌 A36-AC 为出发菌株, 构建单独加强表达转录因子基因 *glxR*、*ramA*、*ramB*、*lldR*、*gntR1*、*sigB* 和 *sigH* 的重组菌, 通过发酵考察重组菌的生长和产 L-丝氨酸情况, 并对结果进行分析。【结果】在谷氨酸棒杆菌 A36-AC 中加强表达 RamB 和 GlxR 可以促进 L-丝氨酸的合成且不影响菌株 A36-AC 的生长, 而加强表达转录因子 RamA、LldR、GntR1、SigB 和 SigH 对菌株 A36-AC 的生长和 L-丝氨酸产量均无明显影响。进一步将 2 种转录因子 RamB 和 GlxR 进行组合加强表达, 构建重组菌株 AC-pZM1-*ramB*-*glxR*, 发酵结果表明, 重组菌最大 OD_{562} 为 30.3, 而出发菌株 A36-AC 最大 OD_{562} 为 34.1; 重组菌株的 L-丝氨酸产量和生产强度分别达到 43.10 g/L 和 0.36 g/(L·h), 比出发菌株 A36-AC 分别提高 15.9% 和 16.1%。【结论】在谷氨酸棒杆菌中加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 可以促进 L-丝氨酸的合成, 本研究为进一步提高微生物发酵生产 L-丝氨酸的水平奠定了基础。

关键词: 碳代谢全局转录因子; L-丝氨酸; 谷氨酸棒杆菌; 生产强度

资助项目: 国家自然科学基金(32171470)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171470).

*Corresponding author. E-mail: zhangxiaomei@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-10-18; Accepted: 2025-02-04; Published online: 2025-03-12

Effects of overexpression of global transcription factors of carbon metabolism on L-serine production by *Corynebacterium glutamicum*

ZHANG Wei^{1,2}, ZHANG Xiaomei^{*1,2}, SHI Jinsong^{1,2}, XU Zhenghong²

1 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Jiangsu Jitri Institute of Future Food Technology, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Corynebacterium glutamicum* is widely used for amino acid production and it is one of the major L-serine-producing strains. Global transcription factors play an essential role in the regulation of intracellular metabolite synthesis, and the regulation of transcription factors with specific functions can effectively increase the synthesis of target amino acids. [Objective] To systematically investigate the effects of overexpressing the global transcription factors (GlxR, RamA, RamB, LldR, GntR1, SigB, and SigH) of *C. glutamicum* carbon metabolism on the growth of *C. glutamicum* A36-AC and L-serine titer. [Methods] With *C. glutamicum* A36-AC capable of producing L-serine as the starting strain, recombinant strains with individual overexpression of the transcription factor genes *glxR*, *ramA*, *ramB*, *lldR*, *gntR1*, *sigB*, and *sigH* were constructed. The growth and L-serine titer of the recombinant strains were examined by fermentation and the experimental results were analyzed. [Results] The overexpression of RamB and GlxR in *C. glutamicum* A36-AC promoted the synthesis of L-serine and did not affect the growth of *C. glutamicum* A36-AC, whereas the overexpression of RamA, LldR, GntR1, SigB, and SigH had no significant effects on the growth of *C. glutamicum* A36-AC or the L-serine titer. RamB and GlxR were overexpressed in A36-AC, and the recombinant strain AC-pZM1-*ramB*-*glxR* was obtained. The fermentation profiles indicated that the maximum OD_{562} of AC-pZM1-*ramB*-*glxR* was 30.3, while that of *C. glutamicum* A36-AC was 34.1. The L-serine titer and productivity of the recombinant strain AC-pZM1-*ramB*-*glxR* reached 43.10 g/L and 0.36 g/(L·h), respectively, which were 15.9% and 16.1% higher than those of *C. glutamicum* A36-AC. [Conclusion] The overexpression of RamB and GlxR in *C. glutamicum* promotes the synthesis of L-serine. The findings lay a foundation for further improving the production of L-serine by microbial fermentation.

Keywords: global transcription factor of carbon metabolism; L-serine; *Corynebacterium glutamicum*; productivity

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)作为美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认可的生产食品及药品的安全菌株, 现已被广泛用于发酵生产各种氨基酸和有机酸等化合物^[1-4]。L-丝氨酸是一种必需氨基酸, 在蛋白质、嘌呤和嘧啶等生物合成以及一碳单位的生成中都发挥着重要作用, 同时也是多种氨基酸合成的前体^[5], 在中枢神经

系统中的蛋白质合成、细胞增殖、发育和鞘脂形成中也起着至关重要的作用^[6]。近年来的研究表明, L-丝氨酸及其下游产物的缺乏与严重的神经功能缺陷有关^[7]。L-丝氨酸可能对阿尔茨海默病、精神分裂症及其他神经系统疾病有治疗作用, 在临床上有效的神经保护剂^[8-9]。

目前, 国内外研究主要通过增强合成途径、敲除和弱化 L-丝氨酸降解途径, 以及解除反馈

抑制等策略来提高 L-丝氨酸产量^[10-15]。然而, 一个或多个基因的加强表达或敲除可能会引起代谢网络失衡, 从而导致副产物积累或细胞生长缓慢。转录因子(transcription factor, TF)在微生物代谢途径中具有“多点调控”的独特优势, 可以弥补代谢工程中单个基因修饰效果不足的缺陷^[6]。参与中心碳代谢调控的转录因子在氨基酸的合成过程中发挥了重要作用, 根据不同的代谢调节需求表达具有特定功能的转录因子, 可以有效增加目标代谢物的合成^[16]。因此, 通过转录因子调控碳代谢极可能提高 L-丝氨酸产量。

谷氨酸棒杆菌中存在着多种中心碳代谢转录调控因子, 包括 GlxR、RamA、RamB、LldR、GntR1、SigB 和 SigH 等^[17], 其具体调控位点如图 1 中所示。其中, GlxR 参与谷氨酸棒杆菌中数百个基因的表达调控, 具体涉及碳氮代谢、细胞应激反应、芳香化合物降解及脂肪酸生物合成等多个过程, 并且在谷氨酸棒杆菌的转录网络中发挥着至关重要的全局性作用^[18]。RamB 能够促进葡萄糖和蔗糖的摄取并抑制参与乙酸代谢基因的表达^[19]; RamA 与 RamB 拮抗能够调控糖摄取、糖酵解、糖异生、乙酸和其他几种代谢途径相关基因的表达^[19]。Deng 等^[16]发现, 加强表达转录因子 RamA 可以促进 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)的合成, 并利用 RamA 突变体(RamAM)将摇瓶中的 GlcNAc 产量进一步提高至 16 g/L。此外, LldR 参与 L-乳酸和糖的利用, 是 L-乳酸、果糖和蔗糖利用不可或缺的转录因子^[20], GntR1 是糖摄取基因的激活因子和葡萄糖酸盐代谢基因的抑制因子^[21]。Wang 等^[22]发现, 谷氨酸棒杆菌 GntR1-E70K 和 RamA-A52V 位点的突变, 使得糖酵解和磷酸戊糖途径通量均显著增加, 赖氨酸产量提高了 32%。SigB 可以全局性激活糖酵解基因的表达, 并且有助于提高菌体在低溶氧胁迫时的糖代谢速率^[23]。SigH 与氧化还原酶系统密切相关, 可以上调磷酸戊糖途径的一些酶编码

基因如 *tal-zwf-opcA-devB* 操纵子的表达, 提高还原型辅酶 II 和五磷酸核糖的生成^[24]。Cao 等^[25]通过随机诱变枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的全局转录因子 CodY 和 CcpA, 重编程了全局氮代谢和碳代谢的调控网络, 突变体中支链氨基酸的生产水平都增加, 更有助于异源蛋白的生产。以上研究表明, 针对代谢途径中相关转录因子进行加强表达或改造, 能够引发细胞基因网络和代谢网络的重编程, 从而改变代谢网络中相关基因的转录效率, 使得基因在转录水平的表达发生整体改变。然而, 目前尚无关于加强表达碳代谢全局转录因子对谷氨酸棒杆菌的生长和 L-丝氨酸产量影响的研究。

本实验室前期从自然界中筛选得到一株能利用糖质原料发酵产 L-丝氨酸的谷氨酸棒杆菌 SYPS-062^[10], 通过对其进行多轮诱变, 以及敲除或弱化 L-丝氨酸降解途径和竞争途径, 构建了重组谷氨酸棒杆菌 Δ SSAAI, 其 L-丝氨酸产量为 30.1 g/L^[11-12]。进一步, 对菌株 Δ SSAAI 进行常压室温等离子体诱变, 并优化其 L-丝氨酸合成途径编码基因 *serA* 和 *serC* 启动子, 获得一株高产 L-丝氨酸的谷氨酸棒杆菌 A36-AC^[13-14], 但该菌株仍然存在生产强度不高的问题。本研究以菌株 A36-AC 为出发菌株, 首先对谷氨酸棒杆菌中的 7 种全局性碳代谢转录因子(GlxR、RamA、RamB、LldR、GntR1、SigB 和 SigH)进行单独加强表达, 筛选出对 L-丝氨酸产量具有正向调控效果的转录因子, 随后对其进行组合加强表达, 旨在研究碳代谢全局转录因子对谷氨酸棒杆菌产 L-丝氨酸的影响, 为研究碳代谢全局转录因子对氨基酸生物合成的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

L-丝氨酸高产菌株 A36-AC、大肠杆菌 JM109 及大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭表达质粒 pZM1-J2 为本实验室保藏。

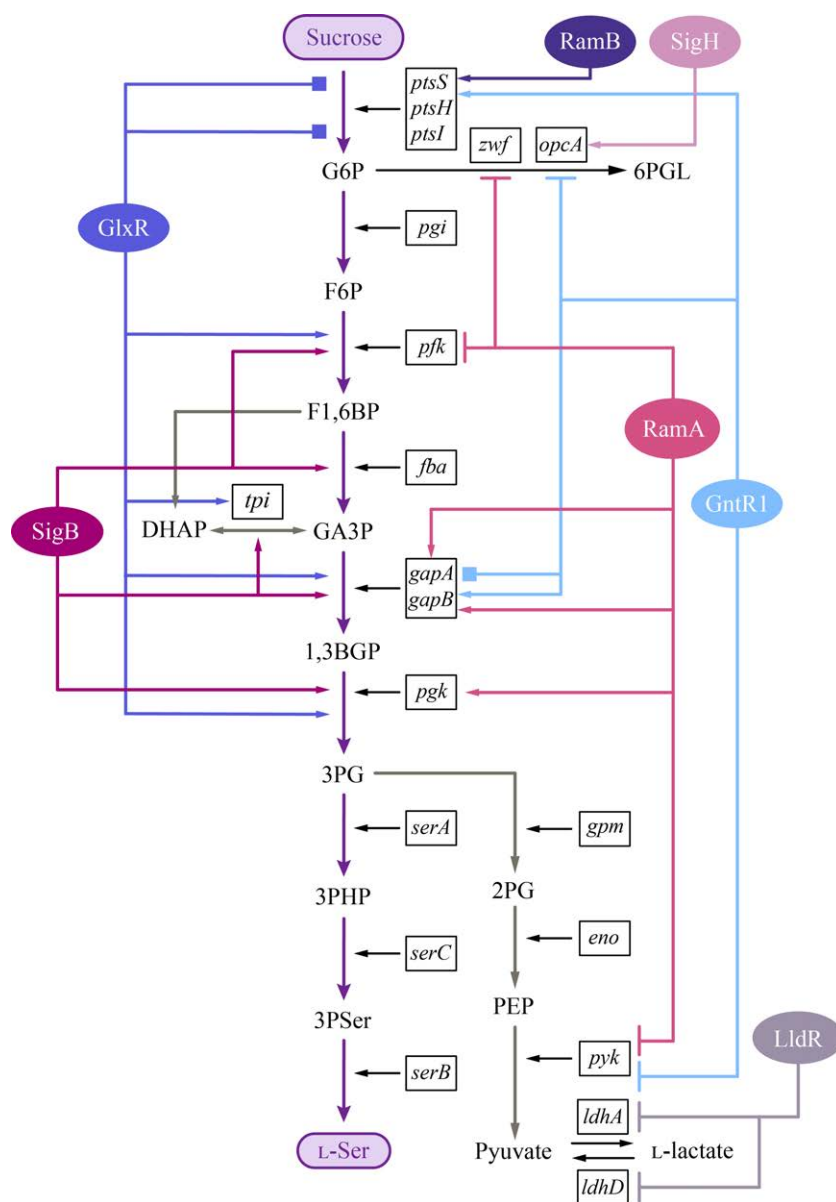


图 1 谷氨酸棒杆菌 L-丝氨酸代谢途径及相关全局碳代谢转录因子作用位点 代谢途径用紫色粗短箭头表示。构成代谢途径的基因用斜体字母加方框表示。糖和代谢物用粗体字母表示。转录因子用椭圆形表示。箭头结尾的线条表示转录激活，T 形横杠结尾的线条表示转录抑制，正方形结尾的线条表示转录因子在体内或体外的结合功能未知。G6P: 6-磷酸葡萄糖; F6P: 6-磷酸果糖; 6PGL: 6-磷酸葡萄糖; F1,6BP: 1,6-二磷酸果糖; DHAP: 二羟丙酮磷酸; GA3P: 3-磷酸甘油醛; 1,3-BGP: 1,3-二磷酸甘油酸; 3PG: 3-磷酸甘油酸; 2PG: 2-磷酸甘油酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; 3PHP: 3-磷酸羟基丙酮酸; 3PSer: 3-磷酸丝氨酸。*ptsI* 编码胞质磷酸转移酶; *ptsH* 编码组氨酸磷酸载体蛋白; *ptsS* 编码蔗糖特异性酶 II; *zwf* 与 *opcA* 编码葡萄糖 6-磷酸脱氢酶; *pgi* 编码磷酸己糖异构酶; *pfk* 编码 6-磷酸果糖激酶; *fba* 编码果糖-1,6-二磷酸裂解酶; *tpi* 编码磷酸丙糖异构酶; *gapA* 与 *gapB* 编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶; *pgk* 编码磷酸甘油酸激酶; *gpm* 编码磷酸甘油酸变位酶; *eno* 编码烯醇化酶; *pyk* 编码丙酮酸激酶; *ldhA* 编码

L-乳酸脱氢酶; *ldhD* 编码 D-乳酸脱氢酶; *serA* 编码磷酸甘油酸脱氢酶; *serC* 编码磷酸丝氨酸氨基转移酶; *serB* 编码磷酸丝氨酸磷酸酶。

Figure 1 L-serine metabolic pathway and binding sites of related global transcription factors of carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. Metabolic pathways are indicated by short thick purple arrows. Genes constituting the metabolic pathways are indicated by italicized letters with boxes added. Sugars and metabolites are indicated by bold letters. Transcriptional regulators are indicated by ovals. Arrows from the ovals indicate transcriptional activation, whereas T-bars indicate repression. Lines ended with squares indicate the *in vivo* or *in vitro* binding of transcriptional regulators with unknown function. G6P: 6-phosphogluconate; F1P: Fructose 1-phosphate; 6PGL: 6-phosphate glucose; F1,6BP: 1,6-diphosphate fructose; DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; GA3P: 3-phosphoglyceraldehyde; 1,3-BGP: 1,3-diphosphoglycerate; 3-GP: 3-phosphoglycerate; 2-GP: 2-phosphoglyceric acid; PEP: Phosphoenolpyruvate; 3PHP: 3-hydroxypyruvic acid phosphate; 3PSer: 3-phosphoserine. *ptsI* encoding cytoplasmic phosphotransferase; *ptsH* encoding histidine phosphate carrier protein; *ptsS* encoding sucrose specific enzyme II; *zwf* and *opcA* encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase; *pgi* encoding phosphohexose isomerase; *pfk* encoding 6-phosphofructokinase; *fba* encoding fructose-1,6-bisphosphatase; *tpi* encoding phosphoglucose isomerase; *gapA* and *gapB* encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *pgk* encoding phosphoglycerate kinase; *gpm* encoding phosphoglycerate mutase; *eno* encoding enolase; *pyk* encoding pyruvate kinase; *ldhA* encoding L-lactate dehydrogenase; *ldhD* encoding D-lactate dehydrogenase; *serA* encoding phosphoglycerate dehydrogenase; *serC* encoding phosphoserine aminotransferase; *serB* encoding phosphoserine phosphatase.

1.2 培养基

本研究所用 LB 培养基、种子培养基、发酵培养基、脑心浸液恢复培养基、谷氨酸棒杆菌感受态培养基和电转化培养基的配方均参考文献[14]。

1.3 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒、基因组提取试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; RNA 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、质粒提取和琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒、2×Rapid Taq Master Mix、同源重组酶, 上海翊圣生物科技有限公司; 高保真酶 2×TransStart FastPfu Fly PCR SuperMix, 天根生化科技(北京)有限公司; 脑心浸液, BD 公司; 高效液相色谱相关试剂, 上海泰坦科技股份有限公司; 其余常规试剂, 上海国药集团和上海麦克林生化科技股份有限公司。本研究所用引物如表 1 所示。

小型离心机、冷冻高速离心机, Eppendorf 公司; 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; PCR 仪, 东胜兴业科学仪器有限公司; 核酸电泳仪器, 上海天能科技有限公司; 电穿孔仪和荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 生化培养箱, 上海博讯科技有限公司; 核酸浓度测

定仪, 赛默飞世尔科技公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.4 质粒的构建

按照基因组提取试剂盒的说明书提取谷氨酸棒杆菌 A36-AC 的基因组, 接着从菌株 A36-AC 基因组中克隆出编码转录因子 GlxR、RamA、RamB、LldR、GntR1、SigB 和 SigH 的基因 *glxR*、*ramA*、*ramB*、*lldR*、*gntR1*、*sigB* 和 *sigH*。分别采用引物 *glxR*-F/R、*ramA*-F/R、*ramB*-F/R、*lldR*-F/R、*gntR1*-F/R、*sigB*-F/R 和 *sigH*-F/R 扩增 *glxR*、*ramA*、*ramB*、*lldR*、*gntR1*、*sigB* 和 *sigH* 片段。PCR 反应体系(50 μL): 菌株 A36-AC 基因组模板 1 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L)各 1 μL, 2×TransStart FastPfu Fly PCR SuperMix 25 μL, ddH₂O 22 μL。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 20 s, 34 个循环; 72 °C 5 min。采用引物 pZM1-F/R 对质粒 pZM1-J2 进行线性化处理, 并采用同源重组法构建重组质粒 pZM1-J2-*glxR*、pZM1-J2-*ramA*、pZM1-J2-*ramB*、pZM1-J2-*lldR*、pZM1-J2-*gntR1*、pZM1-J2-*sigB* 和 pZM1-J2-*sigH*。

表 1 用于转录因子加强表达质粒构建与实时荧光定量 PCR 的引物及序列

Table 1 Primers for plasmid construction for overexpression of transcription factors and RT-qPCR

Primers	Sequence (5'→3')	Use
<i>ramA</i> -F	<u>CTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> GTGGATACCCAGCGGATTAAAGAT	Amplification of <i>ramA</i>
<i>ramA</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTAAGGCAGTGCGCCGATCC</u>	Amplification of <i>ramA</i>
<i>ramB</i> -F	<u>TCTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> ATGGGAAAGACATATGTGGGGTCC	Amplification of <i>ramB</i>
<i>ramB</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>CTAGTAAGGCGCAATCGTGGAT</u>	Amplification of <i>ramB</i>
<i>glxR</i> -F	<u>CTCTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> GTGGAAGGTGTACAGGAGATCCTG	Amplification of <i>glxR</i>
<i>glxR</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTAGCGAGCGCGACGTGC</u>	Amplification of <i>glxR</i>
<i>gntR1</i> -F	<u>CTCTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> ATGACCCCAGCAAACGAAAGT	Amplification of <i>gntR1</i>
<i>gntR1</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTAGTTCAGCGTGCCAGCG</u>	Amplification of <i>gntR1</i>
<i>lldR</i> -F	<u>CTCTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> ATGAGTGTGAAAGCACATGAATCTG	Amplification of <i>lldR</i>
	TC	
<i>lldR</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTATGCCTCGGCAGCAGCG</u>	Amplification of <i>lldR</i>
<i>sigB</i> -F	<u>TCTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> ATGACAGCACCGTCCACG	Amplification of <i>sigB</i>
<i>sigB</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTACTGGGCGTACTCACGAAGAC</u>	Amplification of <i>sigB</i>
<i>sigH</i> -F	<u>CTCTAGAAAAGGAGGACAACCAT</u> ATGGCTGAAAACCGAACCGG	Amplification of <i>sigH</i>
<i>sigH</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTATGCCTCCGAATTTTCTTCATGTCG</u>	Amplification of <i>sigH</i>
<i>glxR'</i> -F	<u>AGAGATGAAGGAGAAAAGCAGT</u> GGAAGGTGTACAGGAGATCCTG	Amplification of <i>glxR</i>
<i>glxR'</i> -R	TCTGCAGCGGCCCGGGATCC <u>TTAGCGAGCGCGACGTG</u>	Amplification of <i>glxR</i>
pZM1-F	GGATCCGCGGCCGCTG	Linearization of pZM1-J2
pZM1-R	ATGGTTGTCCTCCTTTTCTAGAGTGTGACAAC	Linearization of pZM1-J2
pZM1-cx-F	CAGGTCGTAAATCACTGCATAA	Sequencing of pZM1-J2
pZM1-cx-R	CATGAGCGGATACATATTTGAA	Sequencing of pZM1-J2
pZM1- <i>ramB</i> -F	TGGCACGTCGCGCTCGCTAAGGATCCGCGGCCGCTG	Linearization of pZM1-J2- <i>ramB</i>
pZM1- <i>ramB</i> -R	CACTGCTTTTCTCCTTCATCTCTAGTAAGGCGCAATCGTGGATTCGTG	Linearization of pZM1-J2- <i>ramB</i>
16S rRNA-F	TCGATGCAACGCGAAGAAC	RT-qPCR
16S rRNA-R	GAACCGACCACAAGGGAAAAC	RT-qPCR
<i>ptsS</i> -F	CCTACACCGCAACAACAACG	RT-qPCR
<i>ptsS</i> -R	CGCTAGGAAGAACAACACTGCCA	RT-qPCR
<i>pfk</i> -F	ACCATGGAGCTTCGTGAAGG	RT-qPCR
<i>pfk</i> -R	ACACCATAACGAGTGGCCAG	RT-qPCR
<i>gapA</i> -F	CCTACACCGCAACAACAACG	RT-qPCR
<i>gapA</i> -R	TCGATCGATGCGGTACCAAG	RT-qPCR
<i>pgk</i> -F	CTCCGTCTACGACATCGCAA	RT-qPCR
<i>pgk</i> -R	AGGAAGGTGTAGCACATGCC	RT-qPCR

下划线区域为同源臂。

Underlined portions are homology arms.

以菌株 A36-AC 基因组为模板, 使用引物 *glxR'*-F/*glxR'*-R 扩增得到 *glxR* 片段, 并进行凝胶电泳实验及胶回收纯化。随后使用引物

pZM1-*ramB*-F/R 对质粒 pZM1-J2-*ramB* 进行线性化处理, 然后与上述基因片段进行同源重组连接, 构建重组质粒 pZM1-J2-*ramB*-*glxR*。再将

连接产物用化学转化法转化至 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞中,挑取转化子并使用引物 pZM1-cx-F/R 进行菌落 PCR 验证。PCR 反应体系(30 μ L): 菌液 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 15 μ L, ddH₂O 12 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。验证成功后将剩余 PCR 产物送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.5 重组菌株的构建

取质粒 pZM1-J2-*glxR*、pZM1-J2-*ramA*、pZM1-J2-*ramB*、pZM1-J2-*lldR*、pZM1-J2-*gntR1*、pZM1-J2-*sigB*、pZM1-J2-*sigH* 和 pZM1-J2-*ramB-glxR* 与菌株 A36-AC 感受态细胞混合,于冰上放置 10 min,然后在 1.8 kV、5 ms 条件下电击细胞 2 次。取 1 mL 脑心浸液恢复培养基吹吸混匀后置 46 $^{\circ}$ C 金属浴温浴 6 min,随后于 30 $^{\circ}$ C、120 r/min 往复式摇床上培养 2 h。常温 1 200 r/min 离心 2 min 后重悬菌体,涂布于含 50 μ g/mL Kan 的电转化固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 4 d,挑取单菌落进行 PCR 及测序验证,得到重组菌株 AC-pZM1-*glxR*、AC-pZM1-*ramA*、AC-pZM1-*ramB*、AC-pZM1-*lldR*、AC-pZM1-*gntR1*、AC-pZM1-*sigB*、AC-pZM1-*sigH* 和 AC-pZM1-*ramB-glxR*。

1.6 发酵方法

将菌株 A36-AC、AC-pZM1-*glxR*、AC-pZM1-*ramA*、AC-pZM1-*ramB*、AC-pZM1-*lldR*、AC-pZM1-*gntR1*、AC-pZM1-*sigB* 和 AC-pZM1-*sigH* 的菌液取出置冰上融化,分别取少许进行三区划线,30 $^{\circ}$ C 培养箱活化 3 d,然后挑取单菌落密集划线,再次培养 3 d,使菌株活力得到充分恢复。用无菌接种环刮取一环菌体于 20 mL 种子培养基中,30 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 12 h。根据种子液 OD₅₆₂ 计算发酵培养基中的接种量,使发酵初始 OD₅₆₂ 为 1,每组设置 3 个平行,30 $^{\circ}$ C、120 r/min 发酵培养 120 h,测定发酵液生物量 OD₅₆₂ 和

L-丝氨酸产量。

1.7 分析方法

1.7.1 生物量的测定

根据菌体量,使用 1 mol/L 稀盐酸溶液稀释至适当的倍数,使用紫外分光光度计于 562 nm 处测定菌液的吸光度。

1.7.2 L-丝氨酸的测定

采用 HPLC 方法检测 L-丝氨酸^[13]。

1.7.3 基因转录水平分析

将生长至对数生长期(60 h)的谷氨酸棒杆菌于 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min 去除上清,取适量湿菌体加入 900 μ L Trizol 试剂充分裂解细胞后加入适量液氮,在研钵内充分研磨破壁。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取谷氨酸棒杆菌的 RNA,并将提取的总 RNA 进行逆转录反应。逆转录反应体系(20 μ L): RNA 15 μ L, 4 $\times$ Hifair III SuperMix plus 5 μ L。反应条件: 25 $^{\circ}$ C 5 min, 55 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。将逆转录得到的 cDNA 样本用于荧光定量 PCR 反应或置-80 $^{\circ}$ C 保存,荧光定量 PCR 反应按照试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 转录因子加强表达菌株的构建及发酵性能评价

2.1.1 单一转录因子加强表达质粒和菌株的构建

为了评价转录因子 *GlxR*、*RamA*、*RamB*、*LldR*、*GntR1*、*SigB* 和 *SigH* 对菌株 A36-AC 生长和 L-丝氨酸产量的影响,首先依据 1.4 构建重组质粒 pZM1-J2-*glxR*、pZM1-J2-*ramA*、pZM1-J2-*ramB*、pZM1-J2-*lldR*、pZM1-J2-*gntR1*、pZM1-J2-*sigB* 和 pZM1-J2-*sigH*,挑取转化子进行菌落 PCR 验证,送至测序公司进行测序,验证重组质粒均构建成功。

将重组质粒分别电转 A36-AC 感受态细胞,涂布平板挑取转化子进行菌落 PCR 验证,经

验证, 重组菌株 AC-pZM1-*glxR*、AC-pZM1-*ramA*、AC-pZM1-*ramB*、AC-pZM1-*lldR*、AC-pZM1-*gntR1*、AC-pZM1-*sigB* 和 AC-pZM1-*sigH* 均构建成功。

2.1.2 单一转录因子加强表达对谷氨酸棒杆菌生长的影响

单一加强表达 7 个转录因子重组菌生长情况如图 2 所示, 发现加强表达转录因子 *GlxR* 后, 重组菌株的 OD_{562} 从 36 h 开始略低于出发菌株, 在发酵终点 OD_{562} 为 36.54, 较出发菌株(39.24)降低 6.9% (图 2A); 加强表达转录因子 *RamA*、

RamB 和 *GntR1* 后, 重组菌株在发酵过程中的生长过程曲线与出发菌株相差不大(图 2B、2C、2E); 加强表达转录因子 *LldR*、*SigB* 和 *SigH* 后, 菌株的 OD_{562} 自 84 h 开始较出发菌株(39.24)有所降低, 发酵终点的 OD_{562} 分别为 36.73、36.33 和 36.00, 分别较出发菌株降低了 6.4%、7.4% 和 8.3% (图 2D、2F、2G)。

2.1.3 单一加强表达转录因子对谷氨酸棒杆菌 L-丝氨酸产量的影响

七个重组菌株的发酵结果如图 3 所示, 出发菌株 A36-AC 的 L-丝氨酸产量和生产强度分

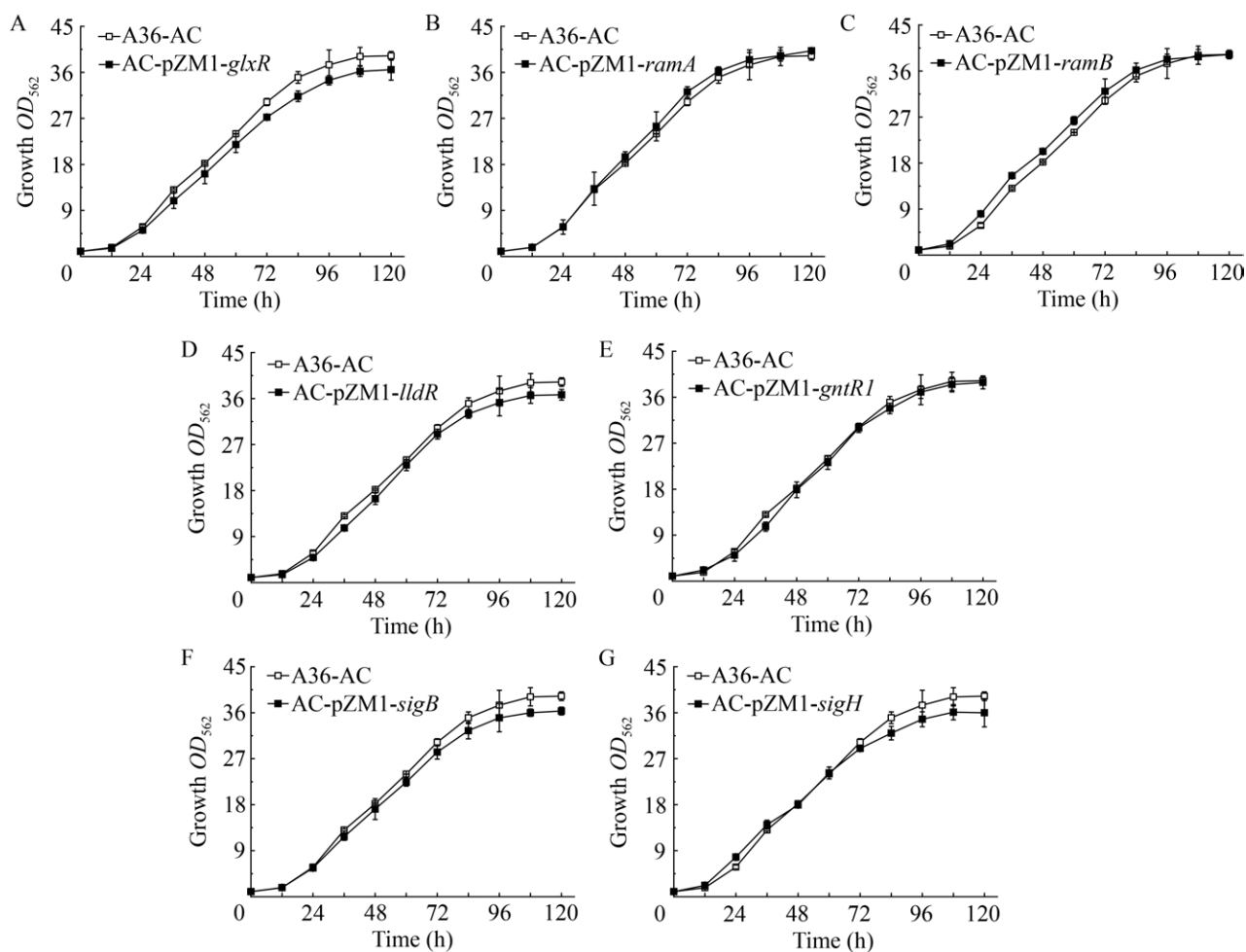


图 2 转录因子加强表达菌株的生长曲线

Figure 2 Growth curves of strains with overexpression of transcription factors. A: Strain AC-pZM1-*glxR*; B: Strain AC-pZM1-*ramA*; C: Strain AC-pZM1-*ramB*; D: Strain AC-pZM1-*lldR*; E: Strain AC-pZM1-*gntR1*; F: Strain AC-pZM1-*sigB*; G: Strain AC-pZM1-*sigH*.

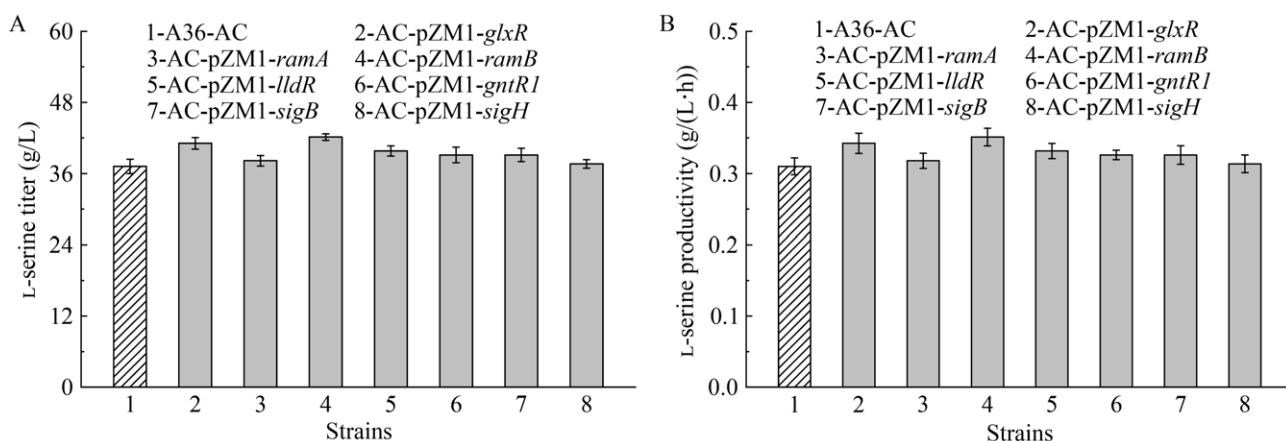


图3 加强表达不同转录因子菌株的 L-丝氨酸产量(A)和生产强度(B)

Figure 3 L-serine titer (A) and productivity (B) of strains with overexpression of different transcription factors.

别为 37.20 g/L 和 0.31 g/(L·h)，加强表达转录因子 RamB 后 L-丝氨酸的产量(42.15 g/L)和生产强度 [0.35 g/(L·h)] 提升最为明显，分别较出发菌株提高了 13.30% 和 12.9%。其次，加强表达转录因子 GlxR 后菌株的 L-丝氨酸产量(41.09 g/L)和生产强度 [0.34 g/(L·h)] 分别较出发菌株 A36-AC 提高 10.46% 和 9.7%。而重组菌株 AC-pZM1-*ramA* (38.14 g/L)、AC-pZM1-*gntR1* (39.13 g/L)、AC-pZM1-*lldR* (39.8 g/L)、AC-pZM1-*sigB* (39.13 g/L) 和 AC-pZM1-*sigH* (37.62 g/L) 与出发菌株 A36-AC 的 L-丝氨酸产量相比无明显变化。推测原因是加强表达转录因子 RamB 后激活了 *ptsS* 的表达^[19]，*ptsS* 负责编码蔗糖摄取的酶，细胞从外界摄取更多的蔗糖，进而使更多的碳源流向 L-丝氨酸的合成途径，提高了 L-丝氨酸的产量；加强表达转录因子 GlxR 后，激活了糖酵解途径中 *pfk*、*gapA* 和 *pgk* 的表达，提高了 L-丝氨酸的产量。

2.2 组合加强表达转录因子对谷氨酸棒杆菌生长和 L-丝氨酸产量的影响

2.2.1 组合加强表达转录因子质粒和菌株的构建

上述研究发现，单独加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 提高了 L-丝氨酸的产量和生产强度，因此，将转录因子 RamB 和 GlxR 进行组合

加强表达，采用一步法构建 RamB 和 GlxR 组合加强表达质粒和重组菌株，如图 4A 所示。使用引物 pZM1-*ramB*-F/R 进行反向 PCR 线性化质粒 pZM1-J2-*ramB*，然后与 *glxR* 片段进行同源重组连接，如图 4B 所示，泳道 3 的条带大小为 2 600 bp 左右，测序结果显示质粒构建成功。依据 1.5 方法构建重组菌株，如图 4C 所示，重组菌株菌落 PCR 条带均位于 2 600 bp 左右，测序结果表明重组菌株 AC-pZM1-*ramB*-*glxR* 构建成功。

2.2.2 组合加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 对菌株生长的影响

组合加强表达转录因子重组菌株 AC-pZM1-*ramB*-*glxR* 的生长曲线和比生长速率曲线如图 5 所示。组合加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 后，重组菌株与出发菌株在 0–36 h 内的 OD_{562} 保持一致，自 36 h 后重组菌株的生长较出发菌株有所减慢，在发酵过程中重组菌株的最大比生长速率较出发菌株降低了 6.42%。在发酵终点重组菌株最大生物量 OD_{562} 为 30.3，较出发菌株 AC (34.1) 降低了 11.1%。

2.2.3 组合加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 对菌株 A36-AC 产 L-丝氨酸的影响

重组菌株 AC-pZM1-*ramB*-*glxR* 的发酵结果如图 6 所示。在发酵终点，L-丝氨酸产量和生产强度分别为 43.10 g/L 和 0.36 g/(L·h)，分别较

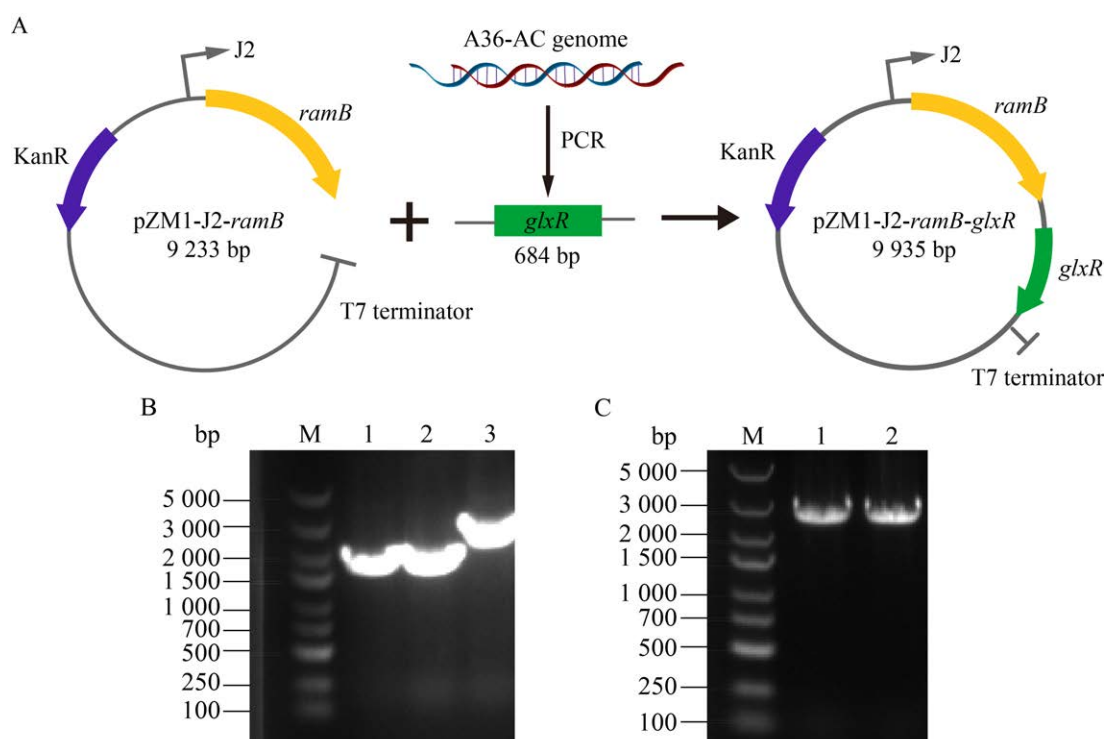


图 4 组合加强表达转录因子质粒和菌株的构建 A: 组合加强表达转录因子质粒构建示意图. B: 质粒 pZM1-ramB-glxR 菌落 PCR 结果(M: DL5000 DNA marker; 1、2: pZM1-ramB-glxR 阴性转化子; 3: pZM1-ramB-glxR 阳性转化子). C: 菌株 AC-pZM1-ramB-glxR 菌落 PCR 验证(M: DL5000 DNA marker; 1、2: AC-pZM1-ramB-glxR 阳性转化子)。

Figure 4 Construction of plasmids and strains with overexpression of combined transcription factors. A: Schematic diagram of the plasmid construction for combined overexpression of transcription factors. B: PCR results of plasmid pZM1-ramB-glxR colonies; (M: DL5000 DNA marker; 1 and 2: pZM1-ramB-glxR negative transformants; 3: pZM1-ramB-glxR positive transformants). C: Strain AC-pZM1-ramB-glxR colony PCR validation (M: DL5000 DNA marker; 1 and 2: AC-pZM1-ramB-glxR positive transformants).

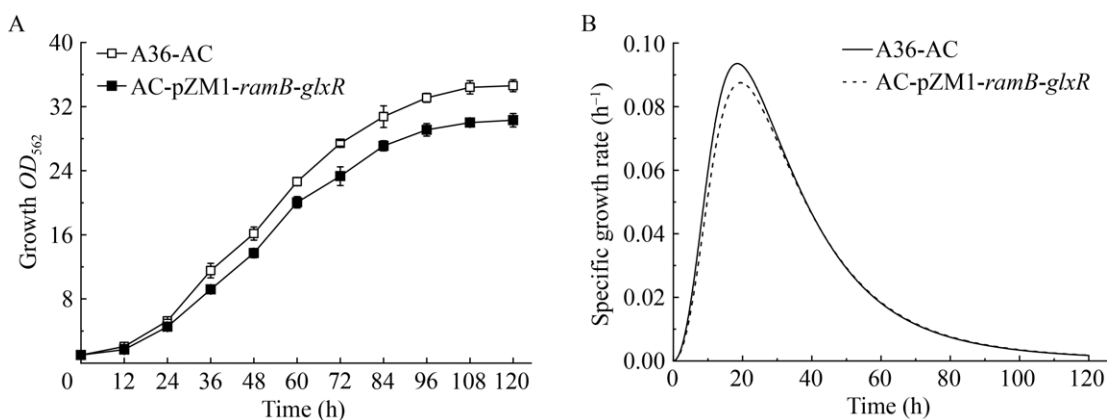


图 5 菌株 AC-pZM1-ramB-glxR 的生长曲线(A)和比生长速率曲线(B)

Figure 5 Growth curve (A) and specific growth rate curve (B) of strain AC-pZM1-ramB-glxR.

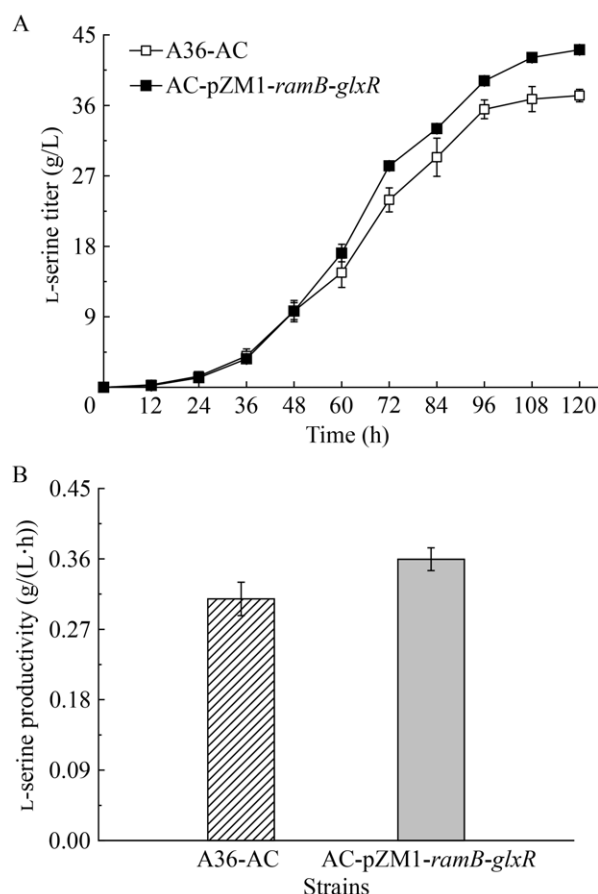


图 6 菌株 AC-pZM1-ramB-glxR 的 L-丝氨酸产量 (A) 和生产强度 (B)

Figure 6 L-serine titer (A) and productivity (B) of strain AC-pZM1-ramB-glxR.

出发菌株 A36-AC [37.2 g/L, 0.31 g/(L·h)] 提高了 15.9% 和 16.1%，较单独加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 均有所提升，说明转录因子 RamB 和 GlxR 的组合加强表达更有利于 L-丝氨酸的合成。

对 RamB 和 GlxR 可能激活的基因 *ptsS*、*pfk*、*gapA* 和 *pgk* 进行转录水平分析，探究加强表达转录因子 GlxR 和 RamB 重组菌株 L-丝氨酸产量提高的原因。从图 7 可以看出，加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 后，*pfk* 和 *pgk* 的表达量提升最为明显，*ptsS* 的表达也有一定提高，*gapA* 的表达量与出发菌株无明显变化。以上结果表明，加强表达转录因子 RamB 和 GlxR 后，

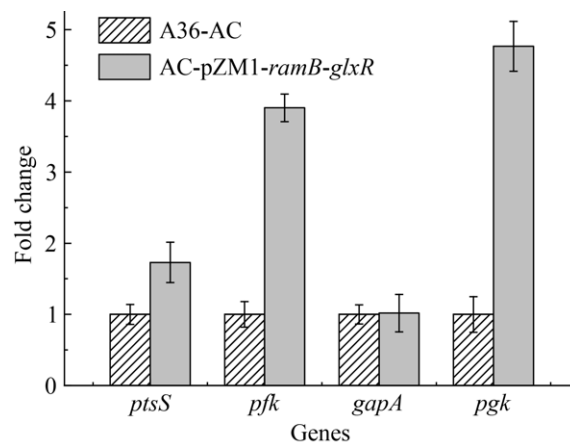


图 7 菌株 AC-pZM1-ramB-glxR 相关基因转录水平变化

Figure 7 Changes in transcription levels of genes related to strain AC-pZM1-ramB-glxR.

激活了蔗糖摄取基因 *ptsS*，以及糖酵解关键基因 *pfk* 和 *pgk* 的表达，从而使 L-丝氨酸产量得到提升。

3 讨论

为了提高微生物细胞工厂中目标化合物的合成效率，传统的调控策略是直接加强表达合成途径、下调或敲除 L-丝氨酸代谢途径中的基因。Peters-Wendisch 等^[15]通过加强表达 L-丝氨酸合成途径关键酶基因 *serA*、*serC* 和 *serB*，敲除 L-丝氨酸脱水酶编码基因 *sdaA*，并抑制丝氨酸羟甲基转移酶基因 *glyA* 的表达后，最终所得重组谷氨酸棒杆菌积累了 86 mmol/L L-丝氨酸；Zhu 等^[12]敲除了谷氨酸棒杆菌中编码转氨酶的基因 *alaT* 和 *avtA*，并降低 L-缬氨酸合成酶的活性，所得重组菌株的副产物 L-丙氨酸和 L-缬氨酸积累量分别减少了 87% 和 60%，使更多的碳源流向了 L-丝氨酸的合成。上述研究通过敲除降解途径、副产物合成途径或者直接加强表达途径关键酶等方法有效提高了 L-丝氨酸产量，但除此之外，全局转录因子可以基于特定途径同时激活或抑制多个基因的协同表达，从而增强工程微生物菌株的性能^[26]。例如，Cao 等^[25]对枯草芽孢杆菌中全局转录因子 CodY 和 CcpA 进行

连续几轮诱变,通过对中央代谢网络的微调,将 β -半乳糖苷酶的产量提高了290%;Deng等^[16]通过对谷氨酸棒杆菌中的全局转录因子进行加强表达,发现转录因子RamA的加强表达最有利于GlcNAc的积累,并且发现全局转录调控策略更加高效,可以触发多个基因转录水平的调节。

本研究首先对谷氨酸棒杆菌中与碳代谢相关的7个全局转录因子GlxR、RamA、RamB、LldR、GntR1、SigB和SigH分别进行了加强表达,结果表明,单独加强表达转录因子RamB和GlxR提高了L-丝氨酸的产量。随后,本研究进一步对二者进行组合加强表达,最终重组菌株的L-丝氨酸产量较出发菌株提高15.9%,生产强度提高16.1%。已有研究表明,转录因子RamB和GlxR可以激活糖酵解中部分关键酶编码基因和碳水化合物磷酸转移酶(phosphotransferase, PTS)系统中的 $ptsS$ 的表达^[19,27-28],PTS系统是大多数细菌中主要的糖摄取系统,在谷氨酸棒杆菌中具有对葡萄糖、果糖和蔗糖特异性摄取的酶II,分别由 $ptsG$ 、 $ptsF$ 和 $ptsS$ 编码^[28]。Toyoda等^[27]通过ChIP-chip分析检测到糖酵解途径中的 pgi 、 pfk 、 $gapA$ 、 pgk 和 eno 启动子区域的GlxR结合位点,并证明了GlxR的确对上述基因具有激活作用。本研究也对组合加强表达菌株中碳代谢关键酶基因 $ptsS$ 、 pfk 、 $gapA$ 、 pgk 进行转录水平分析,发现加强表达转录因子RamB和GlxR后, $ptsS$ 、 pfk 和 pgk 的表达量分别较出发菌株提高了1.73、3.90和4.77倍。加强糖酵解途径关键酶的表达也是提高菌株底物利用的策略之一,本实验室前期研究发现,加强表达糖酵解关键酶 pgi 、 pfk 、 $gapA$ 可以提高L-丝氨酸的产量^[29]。然而,重组菌株的生长相较出发菌株稍慢,推测是由于碳流更多流向L-丝氨酸,从而影响了菌株的生长。同时,本实验室前期对获得的不同表型的菌株做过多组比较代谢组学分析,发现当流向L-丝氨酸的碳流增多时,L-丝氨酸产量提高;同时,TCA循

环的中间产物苹果酸、琥珀酸等含量明显下降^[30]。赵阔等^[31]在谷氨酸棒杆菌中加强表达 $ilvBN$ 所获得的工程菌株也有类似情况,其L-缬氨酸产量和糖酸转化率分别较出发菌株提高了1260%和390%,菌株的最大生长 OD_{610} 却比出发菌株降低了10%;刘佳峰等^[32]改造谷氨酸棒杆菌后,谷氨酸最大积累量较原始菌提高了41.2%,菌株的糖酸转化率较原始菌提高了11.6%,而重组菌株的生长速率相对于原始菌也略有降低,推测可能是由于重组菌株利用更多的碳源合成了产物谷氨酸。

4 结论

本研究首先在产L-丝氨酸的出发菌株A36-AC中分别加强表达了7个碳代谢全局转录因子,考察其对菌株生长和L-丝氨酸产量的影响。结果表明,加强表达转录因子RamB和GlxR对于L-丝氨酸产量和生产强度的提升最为明显,将二者组合加强表达后,L-丝氨酸产量和生产强度分别提升至43.10 g/L和0.36 g/(L·h)。进一步通过转录水平分析揭示了组合加强表达菌株碳代谢途径关键酶的变化。本研究为进一步研究谷氨酸棒杆菌中的碳代谢全局转录因子提供了参考,也为微生物发酵生产L-丝氨酸奠定了基础。

作者贡献声明

张薇:实验设计、实验研究、图表绘制、结果分析;张晓梅:研究思路设计、结果分析、校核审查;史劲松:研究思路设计、校核审查;许正宏:研究思路设计、校核审查。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] ZHA J, ZHAO Z, XIAO ZY, ENG T, MUKHOPADHYAY A, KOFFAS MA, TANG YJ. Biosystem design of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction[J]. Current Opinion in Biotechnology,

- 2023, 79: 102870.
- [2] YU SZ, ZHENG B, CHEN ZY, HUO YX. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 230.
- [3] TSUGE Y, MATSUZAWA H. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(3): 49.
- [4] SHENG Q, WU XY, XU XY, TAN XM, LI ZM, ZHANG B. Production of L-glutamate family amino acids in *Corynebacterium glutamicum*: physiological mechanism, genetic modulation, and prospects[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(4): 302-325.
- [5] ZHANG XM, XU GQ, SHI JS, KOFFAS MAG, XU ZH. Microbial production of L-serine from renewable feedstocks[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(7): 700-712.
- [6] Phone Myint, Soe Maung Maung, SUN LY. L-serine: neurological implications and therapeutic potential[J]. Biomedicines, 2023, 11(8): 2117.
- [7] METCALF JS, DUNLOP RA, POWELL JT, BANACK SA, COX PA. L-serine: a naturally-occurring amino acid with therapeutic potential[J]. Neurotoxicity Research, 2018, 33(1): 213-221.
- [8] MAUGARD M, VIGNERON PA, BOLAÑOS JP, BONVENTO G. L-serine links metabolism with neurotransmission[J]. Progress in Neurobiology, 2021, 197: 101896.
- [9] YE LS, SUN YC, JIANG ZL, WANG GH. L-serine, an endogenous amino acid, is a potential neuroprotective agent for neurological disease and injury[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2021, 14: 726665.
- [10] 张晓娟, 窦文芳, 许泓瑜, 许正宏. 维生素对谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 直接发酵合成 L-丝氨酸的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(5): 50-55.
- [11] ZHANG XJ, DOU WF, XU HY, XU ZH. Effects of vitamins on the direct fermentative production of L-serine in *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062[J]. China Biotechnology, 2007, 27(5): 50-55 (in Chinese).
- [12] XU GQ, ZHU QJ, LUO YC, ZHANG XJ, GUO W, DOU WF, LI H, XU HY, ZHANG XM, XU ZH. Enhanced production of L-serine by deleting *sdaA* combined with modifying and overexpressing *serA* in a mutant of *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 from sucrose[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 103: 60-67.
- [13] ZHU QJ, ZHANG XM, LUO YC, GUO W, XU GQ, SHI JS, XU ZH. L-Serine overproduction with minimization of by-product synthesis by engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1665-1673.
- [14] ZHANG X, ZHANG XM, XU GQ, ZHANG XJ, SHI JS, XU ZH. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(14): 5939-5951.
- [15] 刘安倩. 谷氨酸棒杆菌中 L-丝氨酸合成的组合调控[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- [16] LIU AQ. Combinatorial regulation of L-serine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [17] PETERS-WENDISCH P, STOLZ M, ETTERICH H, KENNERKNECHT N, SAHM H, EGGELING L. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7139-7144.
- [18] DENG C, LV XQ, LI JH, ZHANG HZ, LIU YF, DU GC, AMARO RL, LIU L. Synergistic improvement of N-acetylglucosamine production by engineering transcription factors and balancing redox cofactors[J]. Metabolic Engineering, 2021, 67: 330-346.
- [19] TOYODA K, INUI M. Global transcriptional regulators involved in carbon, nitrogen, phosphorus, and sulfur metabolisms in *Corynebacterium glutamicum*[M]// *Corynebacterium glutamicum*. Cham: Springer International Publishing, 2020: 113-147.
- [20] SUBHADRA B, RAY D, HAN JY, BAE KH, LEE JK. Identification of the regulators binding to the upstream region of *glxR* in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(8): 1216-1226.
- [21] AUCHTER M, CRAMER A, HÜSER A, RÜCKERT C, EMER D, SCHWARZ P, ARNDT A, LANGE C, KALINOWSKI J, WENDISCH VF, EIKMANN BJ. RamA and RamB are global transcriptional regulators in *Corynebacterium glutamicum* and control genes for enzymes of the central metabolism[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 154(2/3): 126-139.
- [22] GAO YG, SUZUKI H, ITOU H, ZHOU Y, TANAKA Y, WACHI M, WATANABE N, TANAKA I, YAO M. Structural and functional characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a transcriptional repressor involved in L-lactate and sugar utilization[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(22): 7110-7123.
- [23] TANAKA Y, TAKEMOTO N, ITO T, TERAMOTO H, YUKAWA H, INUI M. Genome-wide analysis of the role of global transcriptional regulator GntR1 in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(18): 3249-3258.
- [24] WANG ZH, LIU JM, CHEN L, ZENG AP, SOLEM C, JENSEN PR. Alterations in the transcription factors GntR1 and RamA enhance the growth and central metabolism of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 1-12.
- [25] EHIRA S, SHIRAI T, TERAMOTO H, INUI M, YUKAWA H. Group 2 sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5146-5152.
- [26] TOYODA K, TERAMOTO H, YUKAWA H, INUI M. Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor σ^H in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(3): 483-496.
- [27] CAO HJ, VILLATORO-HERNANDEZ J, WEME RDO, FRENZEL E, KUIPERS OP. Boosting heterologous protein production yield by adjusting global nitrogen and carbon metabolic regulatory networks in *Bacillus*

- subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 143-152.
- [26] XU JZ, RUAN HZ, CHEN XL, ZHANG F, ZHANG WG. Equilibrium of the intracellular redox state for improving cell growth and L-lysine yield of *Corynebacterium glutamicum* by optimal cofactor swapping[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 65.
- [27] TOYODA K, TERAMOTO H, INUI M, YUKAWA H. Genome-wide identification of *in vivo* binding sites of GlxR, a cyclic AMP receptor protein-type regulator in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(16): 4123-4133.
- [28] RUAN HZ, YU HB, XU JZ. The glucose uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: a review[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(9): 126.
- [29] ZHANG XM, LAI LH, XU GQ, ZHANG XJ, SHI JS, KOFFAS MAG, XU ZH. Rewiring the central metabolic pathway for high-yield L-serine production in *Corynebacterium glutamicum* by using glucose[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(6): e1800497.
- [30] 陈剑. 调控碳代谢流高效合成 L-丝氨酸[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- CHEN J. Regulate carbon metabolism flow to synthesize L-serine efficiently[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [31] 赵阔, 程金宇, 郭亮, 高聪, 宋伟, 吴静, 刘佳, 柳亚迪, 刘立明, 陈修来. 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3253-3272.
- ZHAO K, CHENG JY, GUO L, GAO C, SONG W, WU J, LIU J, LIU YD, LIU LM, CHEN XL. Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3253-3272 (in Chinese).
- [32] 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 JF, QIAO ZN, ZHAO YX, XU MJ, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient synthesis of L-glutamate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3273-3289 (in Chinese).