

产丁二酸谷氨酸棒状杆菌基因缺失代谢 工程菌株的构建

刘学胜 贾全栋 张伟国*

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】提高谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 厌氧条件下的丁二酸产量, 并降低发酵产物中副产物的含量。【方法】以谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 为出发菌, 首先敲除乳酸形成的关键酶乳酸脱氢酶基因(*ldh*), 构建 *ldh* 缺失株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh*; 然后以缺失株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 为出发菌, 敲除该菌的丙酮酸脱氢酶系的 E1p 酶基因(*aceE*), 构建一株双缺失突变菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE*。【结果】与供试菌比较, 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 的丁二酸产量和转化率分别提高了 94.9% 和 32%, 并且主要的副产物乳酸产量由出发菌产量的 63.5 g/L 降低到很微量的程度。丙酮酸脱氢酶的失活并不能完全消除副产物乙酸的形成, 但乙酸的产量较 ATCC13032 Δ *ldh* 降低了 37.9%, 丁二酸的产量略有提高。【结论】该重组菌具有较强的丁二酸生产工业化潜力, 并且该研究方法为微生物代谢育种提供参考。

关键词: 谷氨酸棒状杆菌, 丁二酸, 基因敲除, 厌氧转化

*通讯作者: Tel: 86-510-85129312; 信箱: zhangwg186@163.com

收稿日期: 2012-06-21; 接受日期: 2012-12-13

Construction a metabolic engineering strain to produce succinic acid from *Corynebacterium glutamicum* by gene deletion mutation

LIU Xue-Sheng JIA Quan-Dong ZHANG Wei-Guo*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] In order to improve the production of succinic acid and decrease the accumulation of by-products under the oxygen deprivation by *Corynebacterium glutamicum* 13032. [Methods] From the *C. glutamicum* ATCC13032, firstly, the gene of lactic dehydrogenase (*ldh*) was knocked-out and the single deletion mutation strain *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *ldh* was constructed. Secondly, we interrupted the pathway of pyruvic acid flux to acetic acid by marker-free deletion the *E1p* gene (*aceE*) which encode the essential part of the pyruvate dehydrogenase complex (PDHC). [Results] The production and yield of succinic acid of recombination strain improved 94.9% and 32%, respectively, compared to the parent strain *C. glutamicum* ATCC13032 and what's more, the main by-product lactic acid was eliminated to none from 63.5 g/L. The inactive of the pyruvate dehydrogenase complex could not prevent the formation of acetic acid absolutely, but the production of acetic acid decreased 37.9%, compared to *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *ldh* and the production of succinic acid improved a little. [Conclusion] This recombination bacteria has a potential in industrial applications, and this study methods could provide reference for microbial metabolism breeding.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Succinic acid, Gene deletion, Anaerobic conversion

丁二酸, 又名琥珀酸, 被广泛用于食品、制药、化学等工业, 并且可作为聚合材料的前体^[1]。目前琥珀酸大多是通过化学合成的方法获得, 该方法是建立在依赖于石油、高污染、高成本的基础之上的^[2]。生物法制备丁二酸利用的是可再生能源, 不依赖于日渐枯竭的石油资源, 并且通过微生物发酵制备丁二酸的过程中可以吸收温室气体 CO₂, 而传统化学法制备丁二酸会释放大量的 CO₂^[3]。

近些年通过微生物制备丁二酸的研究逐渐成为热点, 人们已经发现多种微生物可以通过

发酵来生产丁二酸。其中研究主要集中在 *Escherichia coli*、*Mannheimia succiniciproducens*、*Actinobacillus succinogenes* 以及 *Corynebacterium glutamicum* 等^[2]。谷氨酸棒状杆菌是一种好氧微生物, 其生产氨基酸的过程大多是在好氧的条件下完成的。近些年谷氨酸棒状杆菌在厌氧条件下进行有机酸的生产正在受到人们的关注。

基因工程是改良微生物代谢途径的十分有效的方法。大量的报道显示, 谷氨酸棒状杆菌的代谢合成途径是可以通过调节某些基因的表达来实现控制谷氨酸棒状杆菌中碳源的代谢流向问

题^[4-6], 如谷氨酸棒状杆菌在氨基酸生产中的代谢调控^[7]。本文通过同源重组的方法敲除野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 基因组上乳酸脱氢酶基因(*ldh*)和丙酮酸脱氢酶系 *aceE* 基因(*aceE*)。构建了谷氨酸棒状杆菌染色体上的单缺失菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 以及双缺失菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE*。该研究构建的产丁二酸工程菌不仅在同类菌种处于先进的水平, 而且该研究方法为谷氨酸棒状杆菌中目标基因的缺失及其菌株相关功能的研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 详见表 1。

1.1.2 主要试剂及仪器: 蛋白胨和酵母提取物, OXOID 公司; 各种用于分子生物学操作的试剂盒, 上海生工生物工程有限公司; SBA-40E 生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; PCR 仪, Bio-Rad; 高效液相色谱仪, Diamon 公司; 限制性内切酶、DNA 聚合酶及 T4 连接酶, TaKaRa 公司; 酶标仪, BIOTEK。

表 1 本研究所使用的菌株、质粒和引物
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	相关特性或序列 Relevant characteristics or sequence	来源或作用 Source or purpose
<i>E. coli</i>		
JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, Δ (lac-proAB)/F, (traD36 proAB ⁺ lac ^q lacZ Δ M15)	Stratagene
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Wild-type <i>C. glutamicum</i>	ATCC
ATCC13032 Δ <i>ldh</i>	Derived from ATCC13032 with deletion of <i>ldh</i>	This work
ATCC13032 Δ <i>ldh</i> Δ <i>aceE</i>	Derived from ATCC13032 Δ <i>ldh</i> with deletion of <i>aceE</i>	This work
Pucm-T	Amp ^r pBR322 ori 2.7 kb	Sangon, Shanghai
pk18mobsacB	Integration vector; Km ^r <i>oriV_{Ec}</i> <i>oriT</i> <i>sacB</i>	Schäfer ^[8]
pk18mobsacB/ Δ <i>ldh</i>	pk18mobsacB carrying a truncated <i>ldh</i> gene	This work
pk18mobsacB/ Δ <i>aceE</i>	pk18mobsacB carrying a truncated <i>aceE</i> gene	This work
Oligonucleotides	5'→3' sequence	
<i>ldh</i> -L-F	<u>CCGGAATTCTTT</u> CATACGACCACGGGCTACC	<i>Eco</i> R I
<i>ldh</i> -L-R	GCGT <u>CGAC</u> CGGCCACACAACACCATG	<i>Sal</i> I
<i>ldh</i> -R-F	GCGT <u>CGACA</u> AATACGGTGAGGAAGACATCTACATC	<i>Sal</i> I
<i>ldh</i> -R-R	CCCA <u>AGCTT</u> AAAAACCCTGGTCACGGTGAATGCT	<i>Hind</i> III
<i>aceE</i> -L-F	CGCGGATCCAGGAGTCAACACCCAGATAC	<i>Bam</i> H I
<i>aceE</i> -L-R	GAAGCCATCGAGATCGTCTTC	
<i>aceE</i> -R-F	GAAGACGATCTCGATGGCTTCCCCAGGCGACTA	
<i>aceE</i> -R-R	CCCA <u>AGCTT</u> CTTGACCCCAACGATATGAAGG	<i>Xba</i> I

注: 引物的划线部分为酶切位点, 引物的黑体部分为用于 cross-over PCR 的反向重叠部分。

Note: The underline primers were the restriction enzyme cutting site, the bold part of the primers were the part of reverse the overlap during cross-over PCR.

1.2 方法

1.2.1 培养基: LB (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, pH 7.0。用于培养大肠杆菌及谷氨酸棒状杆菌。

Epo (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 异烟肼 4, 甘氨酸 25, Tween 80 1, pH 7.0。用于培养谷氨酸棒状杆菌制备电转化感受态。

LBHIS (g/L): 脑心浸提物 18.5, 蛋白胨 5.0, 酵母提取物 2.5, 氯化钠 5.0, 山梨醇 91.0, 卡那霉素 30 mg/L。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, 玉米浆 35, 尿素 5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4, pH 7.0–7.2。用于培养生产丁二酸的菌种, 双突变的菌株在好氧生长阶段需添加 0.5%的乙酸钾作为生物合成的前体。

转化培养基: 葡萄糖 56.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 6.0 mg/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 4.2 mg/L, 生物素 0.2 mg/L 及维生素 B1 0.2 mg/L, pH 7.5, 间歇性的添加葡萄糖和 $NaHCO_3$, 用于生产丁二酸。

1.2.2 感受态制备及电转化方法: 大肠杆菌感受态制备参见《分子克隆实验指南》^[9], 谷氨酸棒状杆菌电转化感受态的制备参考《Handbook of *Corynebacterium glutamicum*》^[10]。电转化条件: 100 Ω , 50 μF , 1.8 kV, 5 ms。

1.2.3 *ldh* 和 *aceE* 基因敲除自杀质粒的构建方法: *ldh* 基因敲除质粒是通过酶连的方法将用于同源重组的左右同源臂依次连接到 pk18mobsacB 上。过程如下, 通过引物 *ldh*-L-F、*ldh*-L-R 以野生型的谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 的基因组为模板进行常规 PCR 获得左同源臂(1 175 bp), 将 pk18 质粒和左同源臂用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 将左同源臂连接到质粒上。引物 *ldh*-R-F、*ldh*-R-R 以野生型的谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 的基因组为模板进行常规 PCR 获得右同源臂(1 155 bp),

将连接有左同源臂的重组质粒和右同源臂进行 *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切后进行酶连, 获得重组质粒 pk18mobsacB/ Δ *ldh* 如图 1A 所示。

用于 *aceE* 基因敲除的重组质粒 pk18mobsacB/ Δ *aceE* 是通过 Cross-over PCR 获得^[11]。左同源臂(1 519 bp)引物 *aceE*-L-F、*aceE*-L-R 和右同源臂(1 226 bp)引物 *aceE*-R-F、*aceE*-R-R 分别以野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 为模板进行常规 PCR 分别获得左右同源臂。纯化后的左右同源臂等量混合为模板, *aceE*-L-F、*aceE*-R-R 为引物进行 Cross-over PCR, 获得将左右同源臂连接到一起的 *aceE* 内部有缺失的片段。将该片段经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后与相同酶切的质粒 pk18mobsacB 进行连接。获得用于基因敲除的重组质粒 pk18mobsacB/ Δ *aceE* 如图 1B 所示。

1.2.4 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中 *ldh* 和 *aceE* 基因敲除方法: 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中 *ldh* 和 *aceE* 基因敲除是通过两次同源重组的原理, 其大意如图 2 所示。通过电转化先将 pk18mobsacB/ Δ *ldh* 重组质粒转入 ATCC13032 的感受态中进行基因打靶。在 LBHIS 平板上筛选经过第一次同源重组的卡那霉素抗性克隆, 即 pk18mobsacB/ Δ *ldh* 质粒通过同源重组整合到 ATCC13032 的基因组上。将转化子转接到 LB 液体培养基中, 32 $^{\circ}C$ 、100 r/min 振荡培养过夜后涂布于含 10%蔗糖的 LB 平板上, 通过蔗糖致死基因 (*sacB* 基因)负筛选出经过第 2 次同源重组的克隆。将转化子分别转接到含有 30 mg/L 卡那霉素的 LB 平板和 LB 平板上。能在 LB 平板上生长, 但对卡那霉素敏感的菌株即是经过第 2 次同源重组的克隆。经过第 2 次同源重组的不一定是基因缺失的突变, 也可能是恢复突变, 需要对基因组进一步的 PCR 验证。谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE* 双缺失菌株是在谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 单缺失的基础上进行, 方法同上所述。

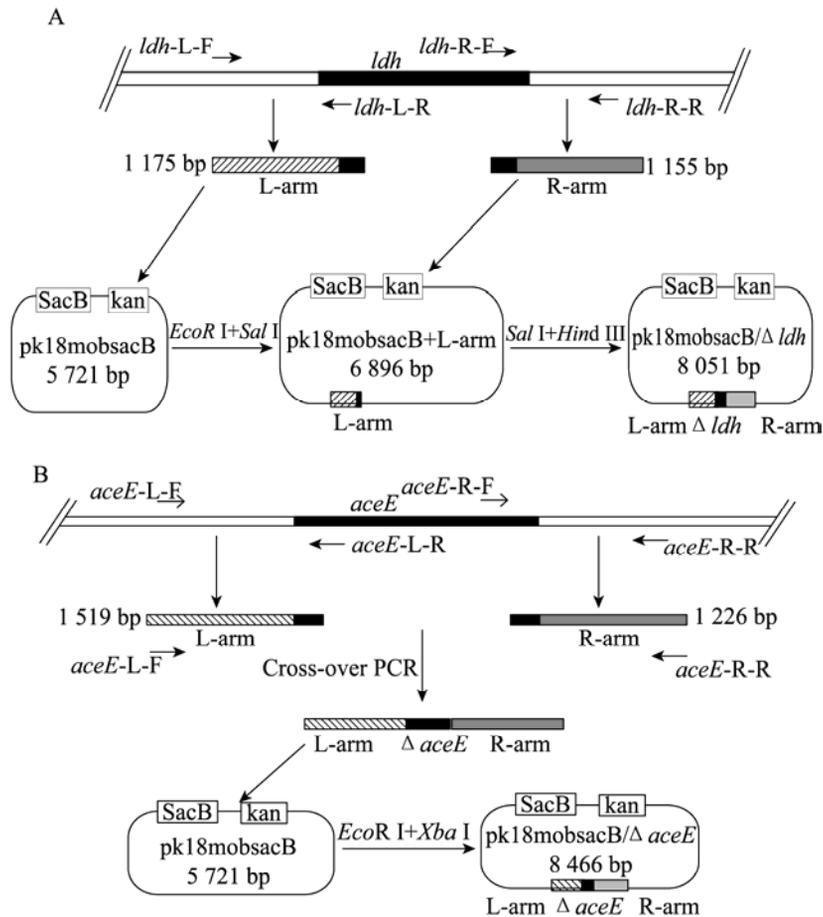


图1 重组质粒构建策略

Fig. 1 Strategy used for construction the recombinant plasmid

注: A: 通过两次酶连构建重组质粒 $pk18mobsacB/\Delta ldh$; B: 通过 Cross-over PCR 获得重组片段构建重组质粒 $pk18mobsacB/\Delta aceE$.

Note: A: Construction of the recombination vector $pk18mobsacB/\Delta ldh$ by twice ligation; B: Construction of the recombination vector $pk18mobsacB/\Delta aceE$ through the recombination fragment from cross-over PCR.

1.2.5 有机酸发酵方法: 从斜面上将菌种挑取两环于种子培养基中, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 100 r/min 培养 14 h ; 将种子液离心($5\text{ }000\text{ r/min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min), 收集菌体, 菌体在转化培养基中洗涤 1 次, 菌体浓度按照 30 g/L (以细胞干重计)重悬到转化培养基中, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 缺氧振荡培养。在发酵过程中间歇性地补加碳酸氢钠和葡萄糖。

1.2.6 分析方法: 菌浓测定: 采用 UV2100 型可见紫外分光光度计; 葡萄糖测定: SBA-40E 生物传感器; 乳酸、乙酸、丁二酸测定: 高效液相色谱(戴安高效液相系统, KromasilC18 $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$,

柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 210 nm 紫外检测, 流动相 $20\text{ mmol/L KH}_2\text{PO}_4$, 流速 0.8 mL/min)。

1.2.7 酶活测定方法: LDH 酶活测定^[12]: 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 加入 1.0 mmol/L DTT , 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液($\text{pH } 7.2$), 10 mmol/L 丙酮酸钠, 0.3 mmol/L NADH , 粗酶液 $100\text{ }\mu\text{L}$ (发酵液菌体经离心、洗涤、超声再离心的上清液), 测定 OD_{340} 吸光值。测量时用总体积为 1 mL 的石英比色皿(反应体系为 1 mL), 然后在酶标仪上进行测量, 每隔 5 s 读数一次, 测定时间 10 min 。酶活单位定义为: 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 7.0$ 时, 每分钟氧化 $1\text{ }\mu\text{mol}$

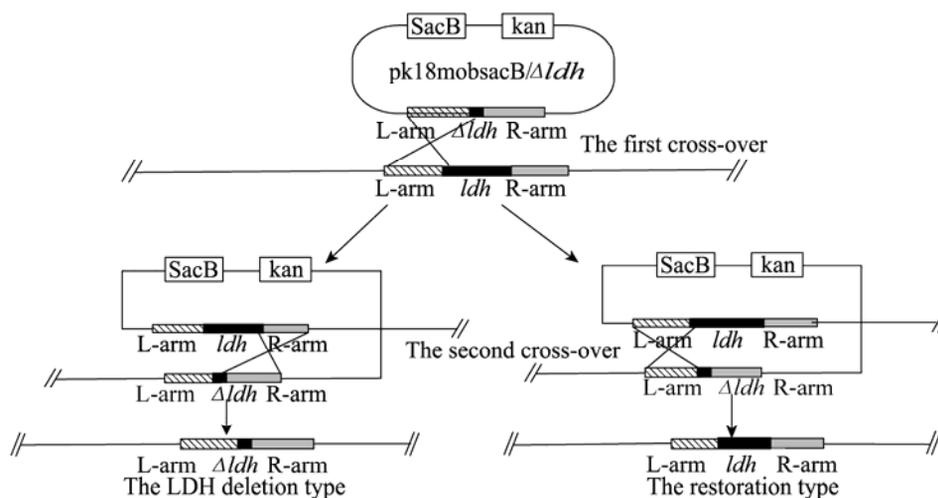


图 2 同源双交换原理示意图

Fig. 2 The theory of double allelic exchange schematic diagram

的 NADH 所用的酶量为 1 U。

丙酮酸脱氢酶酶活测定^[13-14]: 在 30 °C 下, 加入 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.2), 1.0 mmol/L MgCl₂, 0.05 mmol/L CoAS-Na, 3.0 mmol/L 半胱氨酸盐, 0.2 mmol/L TPP, 2.0 mmol/L NAD, 2.0 mmol/L 丙酮酸钠, 粗酶液 100 μL (制备方法如上)。酶活单位定义为: 30 °C, pH 7.2 时, 每分钟催化生成 1 μmol 的 NADH 所需的酶量为 1 U。

比酶活定义为: 每毫克酶蛋白所含的酶活单位(U/mg)。粗酶液中蛋白量的测定通过 Bradford 法测定, 标准物为牛血清白蛋白。

2 结果与讨论

2.1 用于基因敲除的重组质粒 pk18mobsacB/Δldh 及 pk18mobsacB/ΔaceE 的鉴定

通过采用同源重组的技术对目的基因进行敲除, 首先对构建好用于基因打靶的重组质粒 pk18mobsacB/Δldh 通过酶切鉴定左右同源臂是否连接到重组质粒上。左同源臂为 *ldh* 基因上游 1 000 bp 到 *ldh* 起始密码子 175 bp 的地方, 片段长为 1 175 bp。右同源臂为 *ldh* 基因下游的

1 000 bp 到 *ldh* 终止密码子之后 155 bp, 片段长 1 155 bp。重组质粒 pk18mobsacB/Δldh 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后出现大小约 1 175 bp 左同源臂序列及大小为 5 721 bp 线性化 pk18mobsacB 条带(图 3A, 1 道)。由于右同源臂序列会被 *EcoR* I 酶切, 所以 pk18mobsacB/Δldh 的验证是通过 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切后出现大小 1 155 bp 右同源臂序列及大小为 6 896 bp 连有左同源臂的线性化序列(图 3A, 2 道)。aceE 缺失片段是通过 Cross-over PCR 获得, 与 pk18 连接后的重组质粒 pk18mobsacB/ΔaceE 通过 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切验证。经琼脂糖凝胶电泳出现 2 745 bp 大小为 aceE 缺失的片段以及大小为 5 721 bp 线性的 pk18mobsacB 质粒条带(图 3B, 1 道)。

2.2 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中 *ldh* 和 *aceE* 基因敲除菌株验证

根据图 2 可知, 经过第 2 次同源重组筛选出的基因突变株有两种可能。一种是基因缺失突变, 还有一种是基因恢复突变。所以需要通过对经过第 2 次同源重组的突变株进行再一次的验证。根据 NCBI 中谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 基因组的序

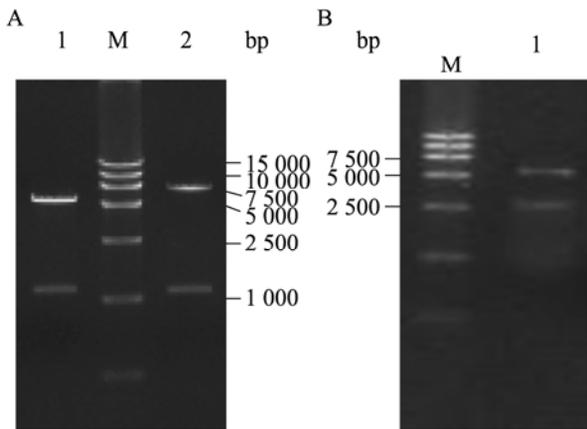


图3 *pk18mobsacB/Δldh* (A)及 *pk18mobsacB/ΔaceE* (B)酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 The agarose gel electrophoresis of the *pk18mobsacB/Δldh* (A) and *pk18mobsacB/ΔaceE* (B) by digestion with restriction endonuclease

注: A: M: DNA marker DL15000; 1: *pk18mobsacB/Δldh* *EcoR* I+*Sal* I 的双酶切; 2: *pk18mobsacB/Δldh* 的 *Hind* III+*Sal* I 双酶切。B: M: DNA marker DL10000; 1: *pk18mobsacB/ΔaceE* 的 *Bam* H I+*Xba* I 双酶切。

Note: A: M: DNA marker DL15000; 1: Digestion *pk18mobsacB/Δldh* by *EcoR* I+*Sal* I; 2: Digestion *pk18mobsacB/Δldh* by *Hind* III+*Sal* I. B: M: DNA marker DL10000; 1: Digestion *pk18mobsacB/ΔaceE* by *Bam* H I+*Xba* I.

列可知 *ldh* 和 *aceE* 序列大小分别为 945 bp、2 769 bp。对突变株基因组为模板, 左同源臂的上游引物和右同源臂的下游引物为组合引物对 *ldh* 和 *aceE* 基因进行 PCR 后经琼脂糖凝胶验证(图 4)及基因序列测定的比对验证。扩增的产物包括 *ldh* 和 *aceE* 上下游 1 000 bp 及 *ldh* 和 *aceE* 缺失后部分片段。理论预期 *ldh* 和 *aceE* 回复突变株扩增总长度分别约为 2 900 bp (图 4A, 3 道、4 道)和 4 700 bp (图 4B, 3 道), 对应的缺失突变株基因的扩增长度应该分别为 2 300 bp (图 4A, 1 道、2 道)和 2 700 bp (图 4B, 1 道、2 道)左右。琼脂糖凝胶电泳及酶活比较(表 2)符合理论预期结果, 可以充分的说明 *ldh* 和 *aceE* 基因被成功敲除。并且其好氧生长阶段细胞生长结果显示单缺失菌株 ATCC13032 Δ *ldh* 较之原始出发菌生长略有迟缓, 而双缺失菌株谷氨酸棒状杆菌

ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE* 在好氧条件下生长情况较原始出发菌明显减弱。

2.3 分批补料发酵产丁二酸

与野生菌谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 相比较, 缺陷型的菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 及谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE* 生长相对缓慢, 并且在双突变的菌株种子培养基中需要添加少量的乙酸钾(0.5%)生长周期延长。通过高效液相色谱检测厌氧条件下谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 发酵液中乳酸、丁二酸和乙酸终浓度分别为 63.5、22.1 和 9.8 g/L(图 5A)。乳酸脱氢酶缺陷型菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 发酵液中丁二酸、乙酸终浓度分别为 39.5、22.5 g/L(图 5B), 发酵液中几乎没有检测到乳酸的存在。丁二酸的产量和转化率分别调高了 94.9%和 32%。试验结果说明乳酸脱氢酶是谷氨酸棒状杆菌在厌氧条件下催化乳酸合成的主要酶, 并且没有其他同工酶, 也没有其他的乳酸合成途径。

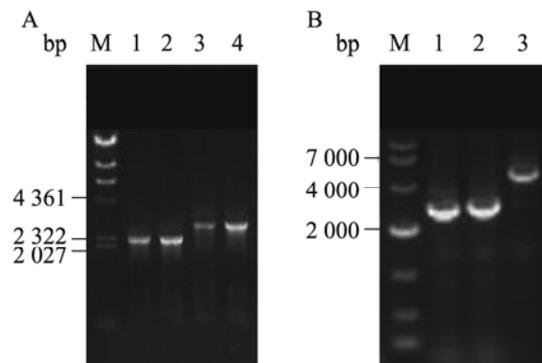


图4 PCR 验证缺失突变和回复突变琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 4 The agarose gel electrophoresis of identification the deflection mutation and the restoration mutation by PCR

注: A: M: λ -*Hind* III digest DNA marker; 1, 2: *ldh* 基因缺失突变 PCR 扩增; 3, 4: *ldh* 基因回复突变 PCR 扩增。B: M: DNA marker DL10000; 1, 2: *aceE* 基因缺失突变 PCR 扩增; 3: *aceE* 基因回复突变 PCR 扩增。

Note: A: M: λ -*Hind* III digest DNA marker; 1, 2: The PCR products of *ldh* deletion mutation; 3, 4: The PCR products of *ldh* reversion mutation. B: M: DNA marker DL10000; 1, 2: The PCR products of *aceE* deletion mutation; 3: The PCR products of *aceE* reversion mutation.

乳酸脱氢酶的失活不仅阻断了乳酸的生成,而且提高了丁二酸的产量,所以 *ldh* 基因趋势改变了菌体内的碳代谢流途径,有利于降低副产物积累,提高目的产物的产量。

为进一步降低副产物乙酸的含量,阻断丙酮酸流向乙酰辅酶 A 的代谢途径,该途径由 PDHC 催化, *aceE* 缺陷的菌株中 PDHC 的 E1 失活使得丙酮酸不能流向乙酰辅酶 A,进而阻断了乙酸的生成代谢途径。在 *ldh* 缺陷的菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* 基础上构建的双缺陷型菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE* 阻断丙酮酸向乙酰辅酶 A 的代谢流。其结果显示,乙酸的产量由 21.9 g/L 降低到 13.6 g/L,丁二酸的产量提高到 45.5 g/L,乳酸的产量仍然几乎为 0 (图 5C)。连续传代 5 次并对每次进行厌氧发酵试验,结果表明该基因缺失工程菌在传代过程中产酸性能保持稳定(表 3)。其丁二酸的厌氧条件下转化水平较之同类的研究处于优势水平,特别是单位体积的转化率,该缺失菌株处于领先水平^[15-18]。通过 *aceE* 基因敲除使得丙酮酸脱氢酶系的失活,并不能完全消除乙酸的产生。其原因可能是由于

丙酮酸脱氢酶系(PDHC)的失活使得丙酮酸在细胞内大量的累积,而丙酮酸的过量累积使得胞内的丙酮酸:醌氧化还原酶(PQQ)活性代替了 PDHC 的活性,在 PDO 催化丙酮酸氧化脱羧形成乙酸和 CO₂^[12]。

3 讨论

传统的诱变育种手段存在盲目性和偶然性高,产生正向突变体频率低^[19],遗传稳定性差等缺点。近年来通过代谢工程对工业微生物育种正成为国内外学者的研究热点。基因敲除技术可分为同源重组、插入失活和 RNAi 基因敲除技术。本文是研究谷氨酸棒状杆菌中同源重组的方法来进行敲除,改变细胞相应的遗传特性。通过基因敲除技术阻断谷氨酸棒状杆菌中细胞的代谢旁路,从而改变目的产物的产量或质量^[20]。近年来对棒状杆菌家族的遗传背景、代谢途径等研究深入的基础上,为棒状杆菌的基因工程育种做出了较好的基础。

本文以谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 为出发菌,对其厌氧条件下产丁二酸中的副产物乳酸和

表 2 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 及基因缺失菌株酶活比较

Table 2 Comparison the enzymatic activities of *C. glutamicum* ATCC13032 to the gene deletion strains

菌株 Strains	酶活 Enzyme activity (U/mg protein)	
	LDH	PDHC
ATCC13032	0.934±0.044	0.086±0.034
ATCC13032 Δ <i>ldh</i>	ND	0.083±0.054
ATCC13032 Δ <i>ldh</i> Δ <i>aceE</i>	ND	ND

Note: ND: Not detectable.

表 3 菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE* 的遗传稳定性

Table 3 Stability of descendibility of *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *ldh* Δ *aceE* strain

传代次数 Passages	1	2	3	4	5
丁二酸 Succinic acid (g/L)	46.6	43.6	47.7	49.3	47.4
乙酸 Acetic acid (g/L)	14.6	13.3	15.6	14.5	12.5

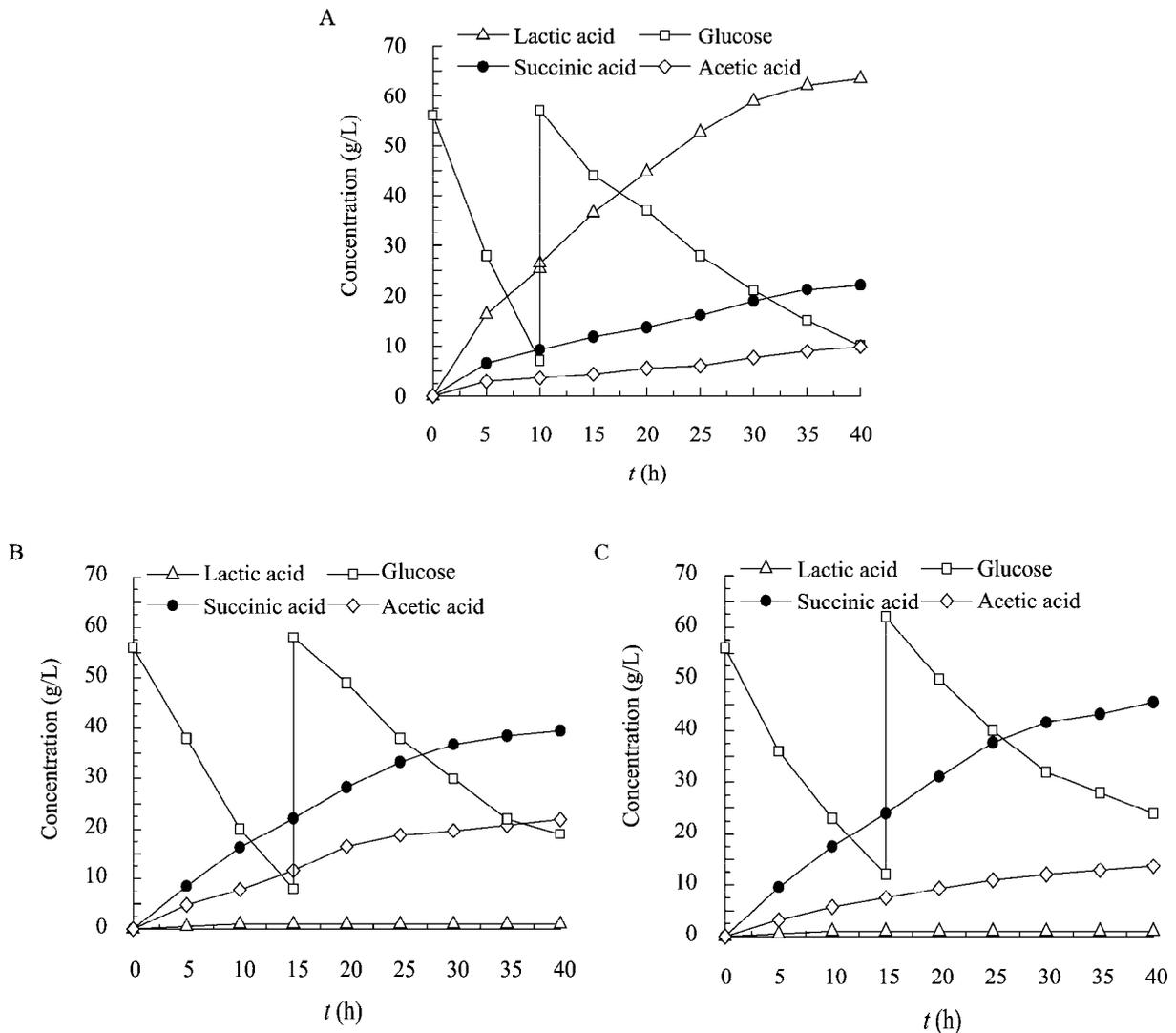


图5 厌氧条件下分批补料发酵产有机酸过程曲线图

Fig. 5 Fed batch bioconversion curve of organic acid production under oxygen deprivation conditions

注: A, B, C 分别为 ATCC13032, ATCC13032 Δ ldh, ATCC13032 Δ ldh Δ aceE 厌氧条件下产酸曲线.

Note: A, B, C is the curve of bioconversion organic acid under oxygen deprivation by ATCC13032, ATCC13032 Δ ldh, ATCC13032 Δ ldh Δ ace E, respectively.

乙酸的代谢调节。虽然乙酸合成能力未被完全阻断,但发酵液中乙酸的含量得以大幅降低。通过基因敲除的手段阻断乳酸乙酸的合成途径,一方面改变了碳代谢分布,增加了目的产物丁二酸的累积,另一方面减少了发酵液中难分离的副产物的含量。同时有利于降低丁二酸的生产成本。

参考文献

- [1] Fukui K, Koseki C, Yamamoto Y, et al. Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 154(1): 25–34.
- [2] Mckinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(4):

- 727-740.
- [3] Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(3): 352-361.
- [4] Inui M, Murakami S, Okino S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 7(4): 182-196.
- [5] Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2004, 8(4): 243-254.
- [6] Becker J, Klopprogge C, Wittmann C. Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 8.
- [7] Hou X, Chen X, Zhang Y, et al. (L)-Valine production with minimization of by-products' synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum*[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(6): 2301-2311.
- [8] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids Pk18 and Pk19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73.
- [9] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 91-93.
- [10] Eggeling L, Bott M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*[M]. CRC, Boca Raton, 2005: 535-545.
- [11] Horton RM. PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes[J]. *Molecular Biotechnology*, 1995, 3(2): 93-99.
- [12] 李建武, 萧能, 余瑞元, 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 351-353.
- [13] Schreiner ME, Fiur D, Holátko J, et al. E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(17): 6005-6018.
- [14] Guest JR, Creaghan IT. Further studies with lipoamide dehydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12[J]. *Journal of General Microbiology*, 1974, 81(1): 237-245.
- [15] 曹剑磊. 产琥珀酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2010.
- [16] 于芳, 郑璞, 倪晔, 等. 碳酸盐对谷氨酸产生菌在缺氧条件下产有机酸的影响[J]. *生物加工过程*, 2011, 9(5): 22-26.
- [17] 岳方方, 姜岷, 马江锋, 等. 产琥珀酸大肠杆菌工程菌株的构建[J]. *中国酿造*, 2010(2): 25-29.
- [18] Litsanov B, Brocker M, Bott M. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [19] 张红岩, 申乃坤, 周兴. 基因敲除技术及其在微生物育种中的应用[J]. *酿酒科技*, 2010(4): 21-25.
- [20] 谢承佳, 何冰芳, 李霜. 基因敲除技术及其在微生物代谢工程方面的应用[J]. *生物加工过程*, 2007, 5(3): 10-14.