NCgl1221 敲除和 *pyc* 过表达对谷氨酰胺发酵的影响

江衍哲，张成林，王志刚，谢希贤，徐庆阳，陈宁
（天津科技大学生物工程学院，代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室，天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室，天津 300457）

摘要：谷氨酰胺在生命活动中具有重要的作用，已被广泛应用于食品、医药等诸多领域。谷氨酸是谷氨酰胺生物合成的前体物质，也是谷氨酰胺生产过程中最常见的副产物。研究发现，*NCgl1221* 基因的编码蛋白是谷氨酸分泌的重要载体，丙酮酸羧化酶是谷氨酸棒杆菌回补途径中的关键酶。为减少谷氨酰胺发酵过程中谷氨酸的积累量并提高谷氨酰胺产量，本研究利用同源重组技术敲除谷氨酰胺生产菌 GM34 的谷氨酸分泌载体编码基因 *NCgl1221*，获得 GM34ΔNCgl1221 菌株；构建了丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 过表达菌株 GM34-pXMJ19pyc。5 L 罐发酵实验表明，*NCgl1221* 基因缺失可以使得谷氨酸积累量降低 19.05%，过表达 *pyc* 基因使得谷氨酰胺产量和转化率分别提高 5.54%和 2.37%。可见，敲除 *NCgl1221*、过表达 *pyc* 能够有效降低谷氨酸分泌并提高谷氨酰胺产量。

关键词：谷氨酰胺；谷氨酸；丙酮酸羧化酶；谷氨酸棒杆菌；*NCgl1221* 基因
文章篇号：1673-9078(2014)10-96-101 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.017

Effects of *NCgl1221* Knockout and *pyc* Overexpression on Glutamine Fermentation

JIANG Yan-zhe, ZHANG Cheng-lin, WANG Zhi-gang, XIE Xi-xian, XU Qing-yang, CHEN Ning
(College of Biotechnology, National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, Tianjin 300457, China)

Abstract: Glutamine has important effects in biological systems and has been widely used in many areas, including in the food and medicine industries. Glutamic acid is the precursor for glutamine biosynthesis, and is the most common by-product in glutamine fermentation. Previous studies have shown that the protein encoded by *NCgl1221* is an important glutamic acid exporter and that pyruvate carboxylase is a key enzyme in the feedback pathway of *Corynebacterium glutamicum*. In order to reduce glutamic acid accumulation during glutamine fermentation and to improve the yield of glutamine, in this study, *NCgl1221* of the glutamine-producing strain GM34 was knocked out using homologous recombination technology, resulting in the construction of the mutant strain GM34ΔNCgl1221. *Pyc* encoding pyruvate carboxylase was also overexpressed in the constructed strain GM34-pXMJ19pyc. Fermentation carried out in 5-L bottles showed that *NCgl1221* knockout reduced glutamic acid accumulation by 19.05%. Overexpression of *pyc* resulted in a promotion of glutamine production and conversion rate by 5.54% and 2.37%, respectively. Taken together, these results demonstrate that *NCgl1221* knockout and *pyc* overexpression can effectively reduce glutamic acid accumulation and improve glutamine production.

Key words: glutamine; glutamic acid; pyruvate carboxylase; *Corynebacterium glutamicum*; *NCgl1221*

谷氨酰胺是人体内含量非常丰富的氨基酸，占游离氨基酸的 61%[1]。谷氨酰胺不仅参与蛋白质的合成，还为嘌呤、嘧啶、其它氨基酸等许多重要化合物的合成提供氨基，在维持人体正常机能方面具有极其重要的作用，被称为“条件性必需氨基酸”[1]。谷氨酰胺已被广泛应用于食品、保健、医药等诸多领域。

收稿日期：2014-04-25
基金项目：国家高技术研究发展计划“863 计划”(2013AA102106)
作者简介：江衍哲（1987-），男，硕士研究生，研究方向为氨基酸代谢控制发酵；张成林，并列第一作者
通讯作者：陈宁（1963-），男，教授，博士生导师，研究方向为代谢工程

目前主要采用谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）发酵法生产谷氨酰胺。谷氨酸是谷氨酰胺生物合成的前体物，也是谷氨酰胺生产过程中最常见的副产物。原材料的改变及发酵过程控制的失当均可导致谷氨酸的大量积累，从而使得糖酸转化率低、提取精制困难，最终造成生产成本的提高。最近研究发现，*NCgl1221* 基因的编码蛋白是谷氨酸分泌的重要载体[2~3]。因此采用分子生物学手段敲除该基因，可能会减少谷氨酰胺发酵过程中谷氨酸的分泌。

有研究表明在谷氨酸棒杆菌中回补途径是限制谷氨酰胺合成的重要制约因素[4]。而丙酮酸羧化酶

（Pyruvate carboxylase，PCx，由 *pyc* 基因编码）被认为是在回补途径中发挥重要作用的酶[5~7]，该酶能够催化丙酮酸和 CO_2 生成草酰乙酸，从而进入 TCA 循环。在谷氨酰胺生产菌中，过表达 *pyc* 以加强其回补途径，可能对提高谷氨酰胺产量及糖酸转化率有积极作用。

本文通过构建 *NCgl1221* 基因缺失菌株 GM34ΔNCgl1221 及 *pyc* 基因过表达菌株 GM34-pXMJ19pyc 研究其对谷氨酰胺发酵的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌种及质粒如表 1 所示。

1.1.2 引物

根据 GenBank 公布的 C. glutamicum ATCC 13032 *pyc* 基因序列和 *NCgl1221* 上下游核苷酸序列分别设计 PCR 扩增引物（表 2）。

1.1.3 试剂

限制性内切酶、ExTaq 酶及连接酶，购自 Takara 公司。Heart GOT，购自上海叶舟生物科技有限公司。质粒快速提取试剂盒，购于北京博迈德生物技术有限公司。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	特性	来源
菌株		
GM34	Glutamine producing strain C. Glutamicum ($(NH_4^+)^r$+SG^r+DON^r)	Preserved in this laboratory
GM34ΔNCgl1221	GM34 with *NCgl1221* deletion	This work
GM34-pXMJ19	GM34 harboring pXMJ19	This work
GM34-pXMJ19pyc	GM34 harboring pXMJ19pyc	This work
DH5αMCR	deoR, recA1, endA1, phoA, supE44 E. coli host strian	[8]
DH5αMCR-pXMJ19pyc	DH5αMCR harboring pXMJ19pyc	This work
DH5αMCR-pK18mobsacBΔNCgl1221	DH5αMCR harboring pK18mobsacBΔNCgl1221	This work
质粒		
pK18mobsacB	Integration vector, Km^r $oriV_{Ec}$oriT sacB	[9]
pK18mobsacBΔNCgl1221	pK18mobsacB carrying the *ΔNCgl1221*	This work
pXMJ19	Expression vector, ptac, Cm^r	[10]
pXMJ19pyc	Plasmid carrying the *pyc*	This work

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

引物	序列(5'-3')	用途
N1-A	ACACGTCTGTAATCAGCGTCAAGTAGCGGGAGCCTGCCTGAAC	*NCgl1221* 上游片段扩增
N1-S	AACCGGATCCGGAACGGAGTCCAAGTTTGCATCA (BamHⅠ)	
N2-A	AACCAAGCTTTCTAAAGAGCGGCGGGTGGTTGT (Hind Ⅲ)	*NCgl1221* 下游片段扩增
N2-S	GTTCAGGCAGGCTCCCGCTAGACGCTGATTACAGACGTGTCCCAT	
PY-A	AACCGAGCTCTTAGGAAACGACGACGATCAAGTC (SacⅠ)	*pyc* 扩增
PY-S	AACCAAGCTTTGAAAGGAATAATTACTCTAATGTCGACTC (Hind Ⅲ)	

1.2 方法

1.2.1 *NCgl1221* 敲除菌株的构建

1.2.1.1 敲除质粒 pK18mobsacBΔNCgl1221 的构建

以 GM34 基因组 DNA 为模板，分别以 N1-A 和 N1-S、N2-A 和 N2-S 为引物经 PCR 扩增得到上游片段 N1 和下游片段 N2。再以 N1-S 和 N2-A 为引物，以 N1、N2 为模板，通过重叠 PCR 获得敲除片段 Δ*NCgl1221*（图 1）。将获得的片段克隆到穿梭载体 pK18mobsacB 上，获得敲除质粒 pK18mobsacBΔNC

gl1221。

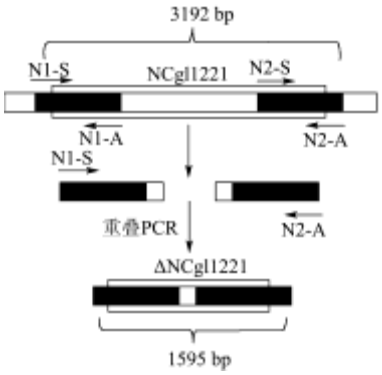


图 1 敲除片段Δ*NCgl1221* 构建示意图

Fig.1 Construction of the knockout section Δ*NCgl1221*

1.2.1.2 *NCgl1221* 敲除菌株的构建

平板上挑取 GM34 单菌落转接到 BHIS[11]摇管中，过夜培养。以 2%的接种量转接到 50 mL BHIS 培养基中，32 ℃，200 r/min 培养至 OD_{578} 为 1.75 时离心收集菌体，用无菌去离子水重悬后，再次离心收集菌体，重复 3 次。最后以 10%的甘油重悬并分装，－80 ℃保藏备用。电转方法参考文献[12]。将电转后的菌液涂布于含卡纳霉素(10 μg/mL)的 LB 固体培养基平板上，32 ℃倒置培养 36 h 后，挑取单菌落活化后提取其基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定。将阳性转化子在 10%蔗糖的 LB 摇管中反复传代后，筛选在 LB 板上正常生长、在含 10 μg/mL 卡纳霉素抗性板上不生长的单菌落，提取其基因组 DNA 验证，获得 *NCgl1221* 基因缺失菌株 GM34ΔNCgl1221（图 2）。

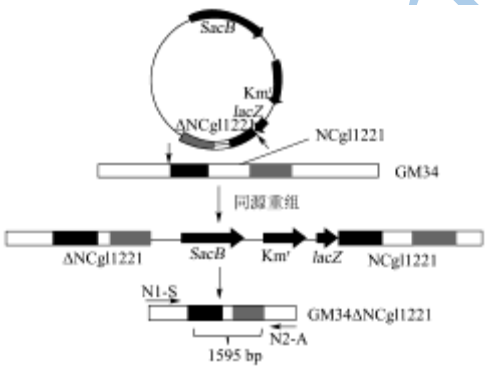


图 2 GM34ΔNCgl1221 菌株构建示意图

Fig.2 Construction of strain GM34ΔNCgl1221

1.2.2 *pyc* 过表达菌株的构建

1.2.2.1 重组质粒 pXMJ19pyc 的构建

以 GM34 基因组 DNA 为模板，利用引物 PY-A 和 PY-S 通过 PCR 扩增获得 *pyc* 基因片段并克隆至 pXMJ19 上，获得重组质粒 pXMJ19pyc。将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5αMCR，获得 DH5αMCR-pXMJ19pyc。

1.2.2.2 GM34-pXMJ19pyc 菌株的构建

提取重组质粒 pXMJ19pyc 电转化至 GM34，经活后涂布于含 10 μg/mL 的氯霉素抗性平板进行筛选，得到阳性菌株 GM34-pXMJ19pyc。提取质粒后经酶切和测序验证，获得 *pyc* 表达菌 GM34-pXMJ19pyc。

1.2.3 丙酮酸羧化酶活性的测定

丙酮酸羧化酶活性的测定参见文献[13]。其主要反应为：丙酮酸羧化酶在 ATP、HCO_3^-存在的条件下，将底物丙酮酸转化为草酰乙酸，再经 GOT 酶催化生成天冬氨酸。酶活力的定义为：每分钟生成 1 μmol 天冬氨酸所需丙酮酸羧化酶的量。

1.2.4 培养基及发酵条件

摇瓶种子培养基：葡萄糖 40 g/L，玉米浆 40 mL/L，尿素 3 g/L，$KH_2PO_4·3H_2O$ 1.50 g/L，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g/L，$MnSO_4·H_2O$ 0.01 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.40 g/L。

发酵培养基：葡萄糖 100 g/L，玉米浆 6 mL/L，VB_1 0.01 g/L，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g/L，$MnSO_4·H_2O$ 0.01 g/L，$ZnSO_4·7H_2O$ 0.01 g/L，$K_2HPO_4·3H_2O$ 3 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.40 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 40 g/L。

发酵条件：以 10%接种量将种子培养物接至含 3 L 发酵培养的 5 L 发酵罐中，初始通气量 2 L/min，搅拌转速 500 r/min~800 r/min；0 h~9 h 溶氧控制为 20%，流加氨水控制 pH 为 7.0，9 h 以后控制 pH 6.0，溶氧控制在 10%以下，残糖浓度 2.00~4.00 g/L。

1.2.5 谷氨酰胺含量的测定

谷氨酸和谷氨酰胺的含量测定分别参见文献[4]和[14]。

1.2.6 数据分析

每组实验均设三个平行并重复三次，利用 Origin 8.0 和 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 *NCgl1221* 敲除对谷氨酸积累的影响

2.1.1 *NCgl1221* 敲除菌株的构建

以谷氨酰胺生产菌 GM34 为出发菌株，采用同源重组技术敲除其 *NCgl1221* 基因，获得重组菌株 GM34ΔNCgl1221。分别以 GM34 和 GM34ΔNCgl1221 基因组 DNA 为模板、以 N1-S 和 N2-A 为引物进行 PCR 扩增，分别获得分子量约为 3200 bp 和 1600 bp 的片段，如图 3 所示，与预期分子量（分别为 3192 bp 和 1595 bp）一致，表明 *NCgl1221* 基因敲除成功。

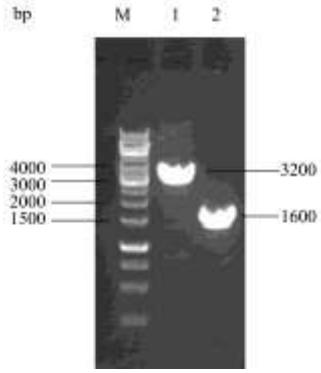


图 3 *NCgl1221* 敲除 PCR 鉴定图谱

Fig.3 Electrophoretic analysis of PCR products of the *NCgl1221*

注：M：1 kb DNA marker; 1: GM34; 2: GM34ΔNCgl1221。

2.1.2 *NCgl1221* 的敲除对谷氨酰胺发酵的影响

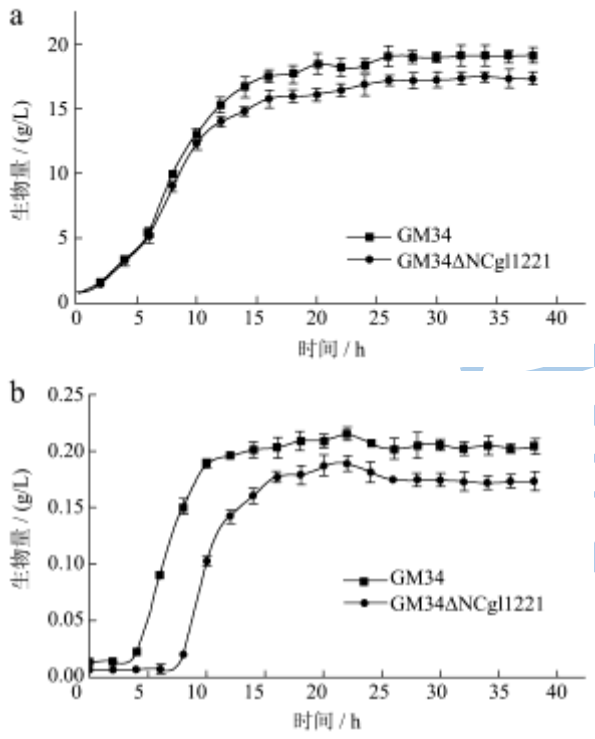


图 4 *NCgl1221* 基因敲除对生物量（a）及谷氨酸积累量（b）的影响

Fig.4 Effects of *NCgl1221* knockout on biomass (a) and glutamate accumulation (b)

注：每组实验均设三个平行并重复三次。

为了考察基因*NCgl1221*敲除对菌体生物量及谷氨酸分泌的影响，分别将 GM34ΔNCgl1221 和出发菌株 GM34 于 5 L 发酵罐中进行发酵实验。每 2 h 取适量发酵液测定菌体生物量和谷氨酸积累量，实验结果如图 4 所示。发酵前期两菌株生物量相近，但于中后期后，二者生物量差异逐渐增加，GM34ΔNCgl1221 的最终生物量约为出发菌的 91.15% ($p<0.05$，出发菌和 GM34ΔNCgl1221 分别为 19.07±0.76 g/L 和 17.38±0.48 g/L)。在发酵过程中 GM34 于 4 h 时开始分泌谷氨酸，单位菌体谷氨酸积累量最高为 0.21±0.01 g/g DCW，而 GM34ΔNCgl1221 在 7 h 时才开始分泌谷氨酸，单位菌体谷氨酸积累量最高为 0.17±0.01 g/g DCW，比出发菌株降低了 19.05%（$p<0.05$）。其原因可能是，在发酵前期生物素过量，TCA 循环未受抑制；但随着发酵的进行生物素被大量消耗，TCA 循环因 α-酮戊二酸脱氢酶受到抑制而减弱，致使谷氨酸浓度不断增加，谷氨酸开始通过 *NCgl1221* 基因编码的分泌蛋白被分泌到发酵液中，GM34ΔNCgl1221 因丧失谷氨酸分泌功能而无明显的谷氨酸积累；进入对数中期后，随着生物素浓度进一步降低，细胞膜结构更加不完整使得谷氨酸溢出，因此 7 h 时 GM34ΔNCgl1221 发酵液中也出现谷氨酸。

利用谷氨酸棒杆菌生产谷氨酸已有将近 60 年的历史，人们发现许多因素都可以诱导谷氨酸的分泌，如表面活性剂、青霉素、生物素亚适量等。2007 年日本学者 Nakamura 等[3]发现一株 *NCgl1221* 基因突变株，使谷氨酸能在不经诱导的条件下分泌出来。并且过表达该基因能够提高谷氨酸的分泌量，经研究认为 *NCgl1221* 编码的机械敏感性离子通道蛋白可能是谷氨酸的分泌通道。Hashimoto 等[2]通过电生理学研究证实谷氨酸是通过 *NCgl1221* 编码的通道蛋白分泌出胞外。因此敲除 *NCgl1221* 基因可以减少谷氨酸的分泌透。

2.2 *pyc* 表达谷氨酰胺发酵的影响

2.2.1 *pyc* 过表达菌株的构建

将筛选得到的 GM34-pXMJ19pyc 经培养后提取质粒，经 Sac Ⅰ和 Hind Ⅲ双酶切后进行琼脂糖凝胶泳，得到分子量分别为 3400 bp 和 6600 bp 的条带，如图 5 所示，与 *pyc* 和 pXMJ19 分子量（分别为 6601 bp 和 3426 bp）一致，证明 GM34-pXMJ19pyc 构建成功。

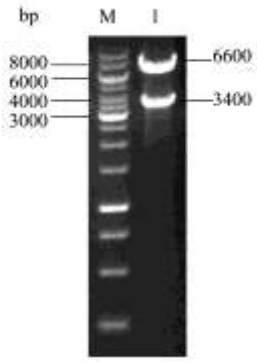


图 5 pXMJ19pyc 的双酶切图谱

Fig.5 Illustration of double restriction digestion of pXMJ19pyc

注：M：1 kb DNA marker；1：Sac Ⅰ和Hind Ⅲ双酶切 pXMJ19pyc。

2.2.2 丙酮酸羧化酶活力测定

分别取 8 h 和 16 h 的发酵液，按照参考文献[13]的方法测定丙酮酸羧化酶活性。结果表明，在 8 h 和 16 h 丙酮酸羧化酶的酶活分别为对照组的 2.39 倍和 1.59 倍（$p<0.05$），表明 *pyc* 能够在重组菌中表达出具有活性的酶。

表 3 丙酮酸羧化酶酶活力的测定

Table 3 Evaluation of pyruvate carboxylase activities

培养时间	丙酮酸羧化酶酶活性/[μM/(min·mg DCW)]	
	GM34-pXMJ19	GM34-pXMJ19pyc
8 h	10.30±1.20*	24.60±2.20*
16 h	3.20±0.50	5.10±0.80*

注：数值表示为平均值±标准差（n=3），*表示差异显著（P<0.05）。

2.2.3 表达 *pyc* 对谷氨酰胺发酵的影响

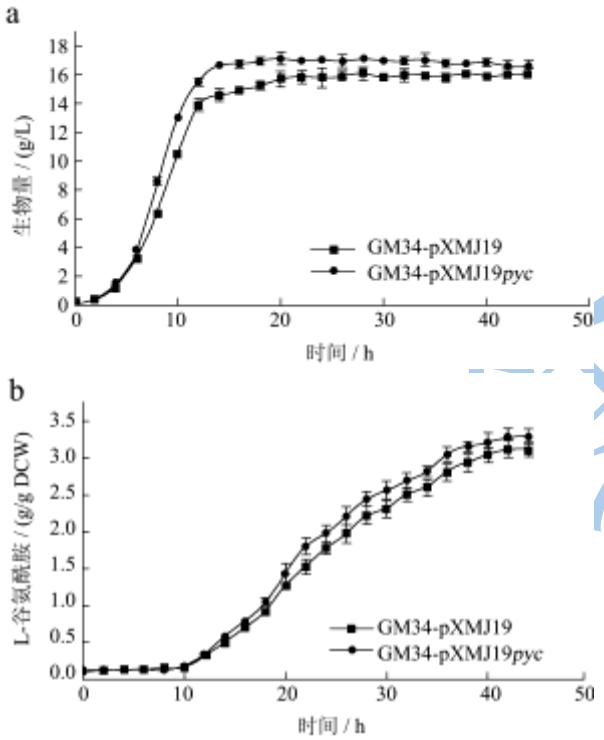


图 6 过表达 *pyc* 对生物量（a）及谷氨酰胺产量（b）的影响

Fig. 6 Effects of *pyc* expression on biomass (a) and glutamine production (b)

注：每组实验均设三个平行并重复三次。

采用 GM34-pXMJ19pyc 于 5L 罐进行发酵实验，以含 pXMJ19 空质粒的菌株 GM34-pXMJ19 为对照。发酵过程中每 2 h 取适量发酵液测定菌体生物量和谷氨酰胺含量，结果如图 6 所示。GM34-pXMJ19pyc 的生物量较 GM34-pXMJ19 高，二者分别于 16 h 和 20 h 时生物量达到最大值。GM34-pXMJ19pyc 单位菌体谷氨酰胺积累量为 3.29±0.07 g/g DCW，对照组为 3.11±0.08 g/g DCW，比对照组提高了 5.54%（$p<0.05$），糖酸转化率提高 2.37%。其原因可能是过表达 *pyc* 使回补作用加强、TCA 循化代谢流增加，致使菌体生长速度、产酸水平以及糖酸转化率得到提升。

在谷氨酰胺的生物素亚适量发酵工艺中，由于生物素的限制使部分回补途径被抑制，增强 CO_2 固定反应可能是提高产酸量的关键。Peters 等[5]研究发现，在表面活性剂诱导的谷氨酸发酵中，过表达丙酮酸羧化酶的菌株产量提高了 7 倍以上，而该基因失活后，谷氨酸产量降低至原来的 1/2。但有研究发现丙酮酸羧化酶的活性在生物素亚适量谷氨酸发酵过程中会降低，其回补作用也随之变弱[15~16]。因此在谷氨酸棒杆菌中过表达非生物素依赖的、具有回补作用的酶（如磷酸烯醇丙酮酸羧羧化酶）可能会有更好的效果。

3 结论

在谷氨酸棒杆菌 GM34 的发酵过程中，基因 *NCgl1221* 缺失能够减少谷氨酸的积累，过表达 *pyc* 能使丙酮酸羧化酶的活性提高并有效促进菌体的生长、谷氨酰胺的产量以及糖酸转化率。

参考文献

[1] Wakisaka S, Ohshima Y, Ogawa M, et al. Characteristics and efficiency of glutamine production by coupling of a bacterial glutamine synthetase reaction with the alcoholic fermentation system of baker's yeast [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2952-2957

[2] Hashimoto K, Nakamura K, Kuroda T, et al. The protein encoded by *NCgl1221* in *Corynebacterium glutamicum* functions as a mechanosensitive channel [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(12): 2546-2549

[3] Nakamura J, Hirano S, Ito H, et al. 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

[4] Sauer U, Eikmanns BJ. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29: 765-94

[5] Peters-Wendisch PG，Schiel B，Wendisch VF, et al. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001, 3(2): 295-300

[6] Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum*

genome information to generate a new L-lysine-producing mutant [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(2): 217-223

[7] Shirai1 T, Fujimura K, Furusawa C, et al. Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis [J]. Microbial Cell Factories, 2007, dol:10.1186/1475-2859-6-19

[8] Grant SG, Jessee J, Bloom FR, et al Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation- restriction mutants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(12): 4645-4649

[9] 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

[10] Jakoby M, Ngoutou-Nkili CE, Burkovski. A Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors [J]. Biotechnology Techniques, 1999, 13(6): 437-441

[11] Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(17): 5595-5603

[12] Wolf H, Pühler A, Neumann E. Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 30(3): 283-289

[13] Peters-Wendisch P G, Wendisch V F, Paul S, et al. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microbiology, 1997, 143(4): 1095-1103

[14] 苏芳,冯朴纯.高效液相色谱法测定L-谷氨酰胺及其制剂的含量[J].药物分析杂志,2002,22(2):132-134
SU Fang, ZHOU Li-chun. Determination of l-glutamine in its preparation by HPLC [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2002, 22(2): 132-134

[15] Hasegawa T, Hashimoto K, Kawasaki H, et al. Changes in enzyme activities at the pyruvate node in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(1): 12-19

[16] Sato H, Orishimo K, Shirai T, et al. Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2008，106(1): 51-58

现代食品科技