

增强磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性对谷氨酸棒状杆菌积累 α -酮戊二酸的影响

孙兰超, 刘涛, 赵岩, 谢希贤, 徐庆阳, 张成林, 陈宁

(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, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶是谷氨酸棒状杆菌中催化合成 TCA 循环中重要代谢物草酰乙酸的关键酶, 本文以谷氨酸棒状杆菌 GDK-10 为出发菌株, 通过同源重组技术对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *pepc* 进行以下改造: 将 GDK-10 的 P_{pepc} 启动子替换为强启动子 P_{nuf} , 获得菌株 GDK-11; 构建 *pepc* 双拷贝菌株 GDK-12; 对 GDK-10 基因组 *pepc* 进行定点突变(N917G), 获得菌株 GDK-13。实时荧光定量 PCR 检测表明, 菌株 GDK-11 和 GDK-12 的 *pepc* 表达量是 GDK-10 的 47.05 倍和 2.03 倍。发酵结果表明, 菌株 GDK-11 和 GDK-12 的产酸量相对于出发菌株分别下降 45.50% 和 13.90%, 但 GDK-12 的单位菌体产量较 GDK-10 提高 38.59%。菌株 GDK-13 产酸量无明显变化, 但其单位菌体产量和糖酸转化率分别提高 21.14% 和 8.97%。可见, 适量过量表达 *pepc* 和将 GDK-10 基因组 *pepc* 替换为解除天冬氨酸反馈抑制的 *pepc* (N917G) 均可提高 α -KG 的单位菌体产量且后者可显著提高糖酸转化率。本研究结果可对 α -KG 的基因工程改造奠定基础。

关键词: 谷氨酸棒状杆菌; α -酮戊二酸; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 同源重组

文章编号: 1673-9078(2016)6-63-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.011

Effect of Enhanced Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity on α -Ketoglutarate Accumulation in *Corynebacterium glutamicum*

SUN Lan-chao, LIU Tao, ZHAO Yan, XIE Xi-xian, XU Qing-yang, ZHANG Cheng-lin, CHEN Ning

(National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, College of Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxylase is a key enzyme that performs the catalytic synthesis of oxaloacetate, an important metabolite, in the tricarboxylic acid (TCA) cycle of *Corynebacterium glutamicum*. In this study, *C. glutamicum* GDK-10 was used as the parent strain, and homologous recombination was adopted to modify the *pepc* gene. The promoter P_{pepc} of GDK-10 was replaced with the strong promoter P_{nuf} to obtain strain GDK-11, the *pepc* double-copy strain GDK-12 was constructed, and site-directed mutagenesis (N917G) was conducted on the *pepc* sequence of GDK-10 to yield strain GDK-13. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis indicated that expression of the *pepc* gene in GDK-11 and GDK-12 strains were about 47.50 and 2.03 times the expression in strain GDK-10, respectively. Fermentation experiments showed that the acid yields in GDK-11 and GDK-12 strains were decreased by 45.50% and 13.90%, respectively, compared with the parent strain. However, the yield of product/substrate consumed (YP/S) in strain GDK-12 was increased by 38.59% when compared with GDK-10. For GDK-13, the α -KG yield was not significantly different from the parental strain, but the YP/S and the conversion rate of glucose to α -KG were increased by 21.14% and 8.97% respectively. Therefore, both the appropriate overexpression of *pepc* and mutation of the GDK-10 *pepc* gene (N917G) to remove aspartic acid feedback inhibition can increase the YP/S of α -KG and the point mutation (N917G) into the *pepc* gene can significantly increase the conversion rate of glucose. These results provide a basis for the further genetic modification of α -KG

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; α -ketoglutarate; phosphoenolpyruvate carboxylase; homologous recombination

收稿日期: 2015-07-31

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (20120630)

作者简介: 孙兰超 (1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事有机酸生产菌株的定向改造及发酵条件优化的研究; 通讯作者: 陈宁 (1963-), 男, 教授

α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)作为 TCA 循环中重要的中间代谢产物, 可以作为膳食营养补充剂、输液药制品中的组成成分以及创伤愈合的化合物^[1,2]。同时, 作为一种多功能的有机酸, 在食品、医药、化工行业以及科学研究中都有广泛的应用^[3,4]。现阶段, 国内外研究合成积累 α -KG 的微生物大多为真菌, 这些微生物的发酵过程具有发酵周期长、产酸速率低、副产物过高等制约因素。本文以谷氨酸棒状杆菌 GDK-10 作为供试菌, 该菌株是在谷氨酸高产菌 *C. glutamicum* GDK-9 (生物素 V_H 缺陷型) 的基础上缺失谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdh* 得到的, 通过控制发酵液中 NH₄⁺ 和生物素的浓度, 具有大量积累 α -KG 的性状, 发酵 30 h 可以积累 43.93 g/L 的 α -KG。

目前国内外对于磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase, PPC) 和丙酮酸羧化酶 (Pyruvate carboxylase, PYC) 的研究, 大多是关于赖氨酸和谷氨酸生产菌的菌株改造^[5,6], 但还未有研究是关于 α -KG 生产菌株的改造。在合成 α -KG 的代谢途径中 (如图 1), PPC 和 PYC 作为合成 TCA 循环重要代谢物草酰乙酸的关键酶, 在菌体的生长阶段, 由 PYC 催化丙酮酸生成草酰乙酸的反应是三羧酸循环主要的回补途径, 此时, PPC 几乎不发挥作用, 而在产酸积累期, PYC 因为受到辅酶生物素缺乏的限制, 导致酶活性受到很大抑制, 此时, PPC 就成为合成 α -KG 重要代谢前体物草酰乙酸的关键酶^[7], 所以通过分子生物学手段增强 PPC 酶活性, 理论上有利于 α -KG 的积累。

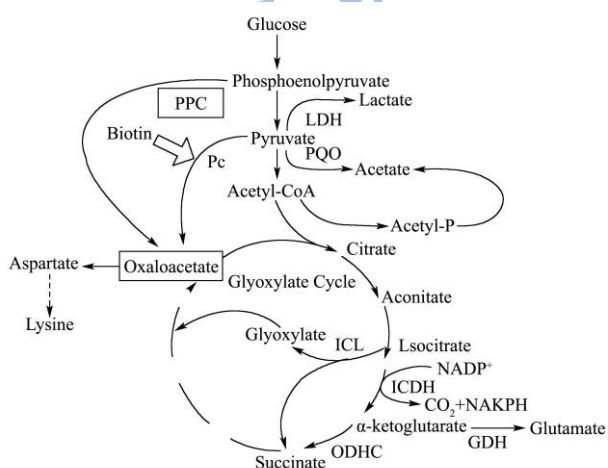


图 1 谷氨酸棒状杆菌中 α -KG 生物合成途径

Fig. 1 Metabolic pathway of α -KG biosynthesis in *C. glutamicum*

注: PPC: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; Pc: 丙酮酸羧化酶; LDH: 乳酸脱氢酶; PQQ: 丙酮酸脱氢酶 (醌); GDH:

谷氨酸脱氢酶; ODHC: α -酮戊二酸脱氢酶; ICDH: 异柠檬酸脱氢酶。

Lee 等^[7]在大肠杆菌积累苏氨酸的研究中表明过量增强 PPC 编码基因 *pepc* 的转录水平并不利于苏氨酸的积累, 而适量增强其转录水平, 可以将苏氨酸的产量提高 27.70%, 所以本文通过同源重组技术对谷氨酸棒状杆菌 GDK-10 进行以下改造: (1) 使用强启动子 P_{trf} 替换菌株自身的 P_{pepc} 启动子, 构建菌株 GDK-11; (2) 在 *gdh* 基因缺失位点插入 *pepc* 基因, 构建 *pepc* 双拷贝重组菌株 GDK-12, 以研究 PPC 酶活性不同程度的增强, 对于谷氨酸棒状杆菌合成积累 α -KG 的影响。此外, Zhen 等^[8]对 *C. glutamicum* 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *pepc* 引入定点突变(N917G), 在一定程度上解除了天冬氨酸对 PPC 的抑制作用, 增加了草酰乙酸的合成量, 使赖氨酸的产量提高了 37%, 因此本文对 *pepc* 进行定点突变(N917G), 构建菌株 GDK-13, 以研究其对 α -KG 合成代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 LB 培养基

蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, 氯化钠 1%。

1.1.2 活化斜面/平皿培养基 (g/L)

牛肉膏 10.00, 酵母粉 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 5.00, 玉米浆 150.00 mL/L, 琼脂条 30.00, pH 7.0~7.2, 121 °C, 15 min。

1.1.3 种子培养基 (g/L)

葡萄糖 30.00, 玉米浆 35.00 mL/L, 豆粕水解液 20.00 mL/L, K₂HPO₄ 3H₂O 2.20, MgSO₄ 7H₂O 0.90, pH 7.0~7.2, 121 °C, 15 min。

1.1.4 发酵培养基 (g/L)

葡萄糖 80.00, Na₂HPO₄ 3.00, KCl 1.50, MgSO₄ 7H₂O 2.00, MnSO₄ 7H₂O 10.00 mg, FeSO₄ 7H₂O 10.00 mg, ZnSO₄ 10.00 mg, VB₁、VB₃、VB₅、VB₁₂ 10.00 mg, VH 4.00 μ g, 豆粕水解液 30.00 mL/L, MSG 2.00, pH 7.0~7.2, 121 °C, 20 min。

1.2 菌株、质粒和引物

所有的菌株和质粒如表 1, 主要的引物及其序列如表 2。

1.3 质粒提取、酶切、连接、大肠杆菌转化等分子操作

均参照《分子克隆实验指南》进行。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Bacteria and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>C. glutamicum</i> GDK-10	L-glutamate producing strain with <i>gdh</i> mutation	Stored in this lab
<i>Escherichia coli</i> DH5 α MCR	F, ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1,endA1,hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺), <i>deoRsupE44,λ,thi⁻¹,gyrA96,relA1</i>	Grant et al. 1990
<i>C. glutamicum</i> GDK-11	P _{<i>pepc</i>} ::P _{<i>tuf</i>}	This work
<i>C. glutamicum</i> GDK-12	Δ <i>gdh</i> :: <i>pepc</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> GDK-13	<i>pepc</i> (N917G)	This work
Plasmids		
pK18 <i>modsacB</i>	suicide vector	Schafer et al. 1997
pK18- <i>pepc</i> (N917G)	pK18 <i>modsacB</i> containing the <i>pepc</i> fragment with point mutation of N917G	This work
pK18-P _{<i>pepc</i>} ::P _{<i>tuf</i>}	pK18 <i>modsacB</i> containing the <i>pepc</i> and <i>tuf</i> fragment	Stored in this lab
pK18- Δ <i>gdh</i> :: <i>pepc</i>	pK18 <i>modsacB</i> the <i>pepc</i> and <i>gdh</i> fragment	This work

表 2 引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PEP-S	5'-GCTGGCAAAGTTGAACTGCTCTT-3'
PEP-A	5'-AGCTTGTAGTAGCGCAGCCCTACT-3'
G01-S	5'-GCGCGGTCGACCAACTGGTCTCATTGCGCTGGT-3'(Sal I)
G01-A	5'-CTTACCGGATTTCTCGTTCCCATCTCG-3'
P02-S	5'-GGAAATCCGGTGAAGCATTGCGCCAAG-3'
P02-A	5'-CGGCGTAGGCCACCTGATTTGCAATAACT-3'
G03-S	5'-GGTGGGCTACGCCGACGAAGTTGAAGG-3'
G03-A	5'-GCGCGTCTAGACCACCAGCCACCAAGATGC-3'(Xba I)
dp01-S	5'-GCGCAAGCTTGTGGAAGATTTGCGAGCCATCCCAT-3'(Hind III)
dp01-A	5'-CCGGAGCCGCGCAGCGCAGTGGAAAGACCGTTC-3' ^a
dp02-S	5'-CTGCGCTGCGCGGCTCCGGCTAGTCCAGC-3'
dp02-A	5'-GCGCTCTAGATGGGGAGACAACAGGTGACAAAAC-3'(Xba I)
<i>pepc</i> -S	5'-TTCAGGTTTTTCGACGGCATTAC-3'
<i>pepc</i> -A	5'-GGCATCAAGAGTGCTGTCCG-3'
16S-S	5'-GTGGTTTGTGCGTCTGTGT-3'
16S-A	5'-TGCCTTCGCCATGGTGTTC-3'

注: ^a. 斜体加粗部分为突变碱基。

1.4 重组菌株 GDK-11、GDK-12 和 GDK-13

的构建

取适宜浓度的 pK18-P_{*pepc*}::P_{*tuf*} 并电转化至 *C. glutamicum* GDK-10 电转感受态中。将电转并活化后的菌液涂布于含卡那霉素(10 μ g/mL)的 LB 固体培养基平板上, 32 $^{\circ}$ C 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 μ g/mL 卡那霉素抗性板上不生长的单菌落, 提取其基因组 DNA 进行 PCR 验证, 获得重组菌株 GDK-11。

根据 Genbank 中的谷氨酸棒杆菌野生型 *C. glutamicum* ATCC13032, 获取磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶编码基因 *pepc* 和谷氨酸脱氢酶编码基因 *gdh*

的 DNA 序列, 利用 PrimerPrimer 5.0 设计扩增引物 G01-S、G01-A、P02-S、P02-A、G03-S 和 G03-A, 通过重叠 PCR 获得含 *pepc* 的用于敲除 *gdh* 的片段 (图 2)。对 pK18*modsacB* 质粒和上述重叠片段经 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切、电泳回收并连接后转化至 *E. coli* DH5 α 中。经筛选后提取重组质粒进行酶切验证, 将验证正确的重组质粒命名为 pK18-*gdh::pepc*。将 pK18-*gdh::pepc* 电转至 *C. glutamicum* GDK-10 电转感受态中, 经筛选获得重组菌株 *C. glutamicum* GDK-12 (图 3)。

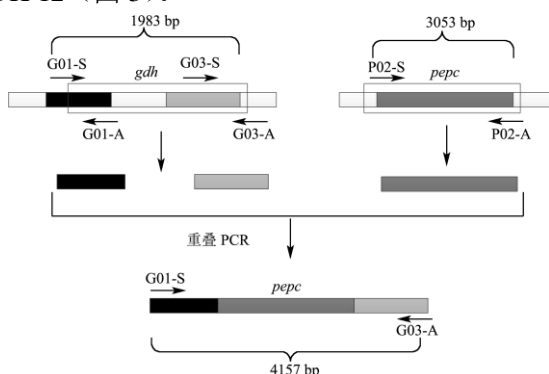


图 2 谷氨酸编码基因 *gdh* 敲除片段构建示意图

Fig.2 Schematic diagram of constructing the fragment to knock out the glutamate-encoding gene *gdh*

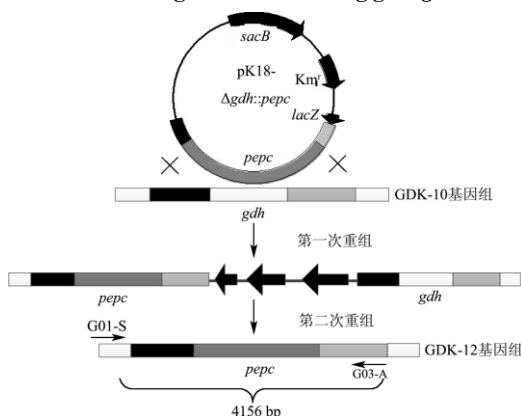


图 3 GDK-12 菌株构建示意图

Fig.3 Construction of GDK-12

根据 *C. glutamicum* ATCC13032 的 *pepc* 序列利用 PrimerPrimer 5.0 设计用于扩增 *pepc* (N917G) 的引物 dp01-S、dp01-A、dp02-S 和 dp02-A, 其突变位点如表 2 所示。经重叠 PCR 将突变位点引入 *pepc* 中。PCR 产物经电泳并回收后连接至克隆载体 pMD19-T 并转化至 *E. coli* DH5 α , 然后委托金唯智生物科技有限公司测序。将结果正确的重组质粒利用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后连接至经相同酶切的 pK18*modsacB*, 经转化、筛选并酶切验证正确后, 提取重组质粒并电转化于 *C. glutamicum* GDK-10 电转感受态中, 经筛选获得重组菌株 *C. glutamicum*

GDK-13。

1.5 HPLC 分析 α -酮戊二酸的含量

色谱条件: 高效液相色谱 Agilent 1200, 色谱柱 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm, L \times I.D.), 在 215 nm 处检测发酵液中 α -KG 及其他有机酸的含量^[9]。流动相: 0.005 mol/L H₂SO₄, 流速为 0.50 mL/min, 进样量为 20.00 μ L。

1.6 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 检测

目的基因的表达量

根据 *pepc* 及 *C. glutamicum* 13032 16S rDNA (内参) 基因序列, 采用 Primer 5.0 软件设计得到用于 RT-qPCR 的引物 *pepc*-S、*pepc*-A、16S-S 和 16S-A。总 RNA 的提取方法参照 RNAiso Plus 提取试剂说明书, 将提出的总 RNA 进行反转录反应获得其 cDNA。反转录的方法参照反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)。RT-PCR 体系及方法参照 SYBR Premix EX-TaqTM II 试剂盒。

1.7 分析发酵过程中的比产酸速率

利用如下公式计算不同菌株比产酸速率 q_p

$$q_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} \text{ (g/h.g)}$$

其中 X 为产酸量; t (h) 为培养时间。

1.8 数据分析

实时定量 PCR, 每组实验均设 3 个平行并重复 3 次, 利用 Origin 8.0 和 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行分析 and 处理。7.50 L 发酵罐实验共重复 5 次。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株 GDK-11 和 GDK-12 的鉴定

利用同源重组技术, 在出发菌株 GDK-10 中分别使用强启动子 P_{tuf} 替换原始的 P_{pepc} 启动子和在 *gdh* 缺失位点插入 *pepc* 基因, 转化子 PCR 验证实验如图 4 所示。

对筛选到的转化子进行菌落 PCR 扩增验证, 以菌株 GDK-11 为例, 对出发菌株 *C. glutamicum* GDK-10、pK18- $P_{pepc}::P_{tuf}$ 整合至其基因组的菌株以及消除抗性基因的重组菌株进行 PCR 扩增(利用引物

PEP-S 和 PEP-A), 其产物理论分子量为 1317 bp、1317 bp 和 1717 bp 以及 1717 bp。结果如图 4 (a)所示, PCR 扩增产物分子量与理论值相近, 同时测序结果表明 GDK-11 构建成功。采用相同的方法对 GDK-12 进行验证(利用引物 G01-S 和 G03-A), 结果表明该菌株构建成功。

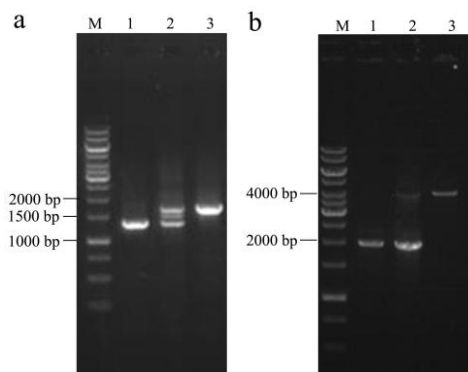


图 4 GDK-11 和 GDK-12 PCR 验证

Fig.4 PCR products of GDK-11 and GDK-12

注: M: 1kb DNA marker; a1、b1: 对照菌株的PCR产物; a2、b2: 质粒单交换整合与基因组上的阳性菌基因组为模板扩增的PCR产物; a3: 以GDK-11基因组为模板扩增的PCR产物; b3: 以GDK-12基因组为模板扩增的PCR产物。

2.2 重组菌株 GDK-13 的鉴定

利用重叠PCR技术获得 *pepc* 突变体, 如图5 (a)所示, 将其PCR产物经切胶回收后连接至克隆载体 pMD19-T 并进行测序, 测序结果表明成功获得 *pepc*(N917G)。提取上述重组质粒, 采用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切后经电泳并切胶回收连接至经相同酶切的 pK18modsacB, 经转化并经酶切验证正确后的重组质粒命名为 pK18mobsacB*pepc* (N917G), 如图5 (b)所示。将重组质粒电转入菌株 GDK-10感受态中, 通过筛选、PCR验证(利用引物 dp01-S和dp02-A)、测序最终获得在目的碱基上发生了点突变的重组菌, 将其命名为GDK-13。

2.3 重组菌中基因 *pepc* 相对表达量的检测及

分批补料发酵试验

2.3.1 不同重组菌中基因 *pepc* 的相对表达量检测

采用实时定量PCR测定不同重组菌株中 *pepc* 的转录水平, 结果如图6所示。GDK-11和GDK-12

中 *pepc* 转录水平较出发菌株 GDK-10 分别提高了 47.50倍和 2.03倍, 表明替换 P_{uff} 启动子及增加拷贝数均能提高 *pepc* 转录水平且前者增加的强度更大, 而菌株 GDK-13 中 *pepc* 的表达量无明显变化。

2.3.2 各菌株的发酵结果分析

采用 7.50 L 发酵罐进行分批补料发酵以考察基因改造对 α -KG 发酵的影响, 以出发菌株 GDK-10 作为对照, 结果如图 7、图 8 及表 3 所示。

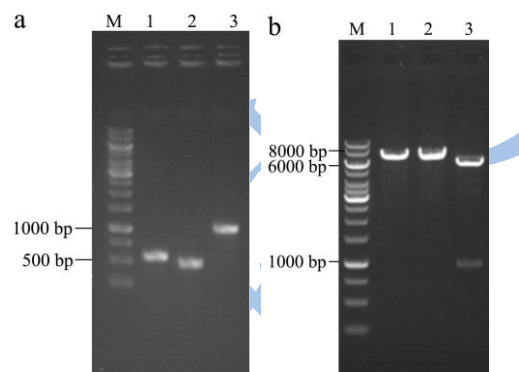


图 5 载体 pK18mobsacB*pepc*(N917G) 的构建

Fig.5 Construction of the plasmid pK18mobsacB*pepc*(N917G)

注: M: 1 kb DNA marker; a1: *pepc* 上游片段 DP01; a2: *pepc* 下游片段 DP02; a3: 重叠 PCR 片段 DP12; b1、b2: *Hind* III 和 *Xba* I 单酶切质粒 pK18mobsacB*pepc*(N917G) 产物; b3: *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切质粒 pK18mobsacB*pepc*(N917G) 产物。

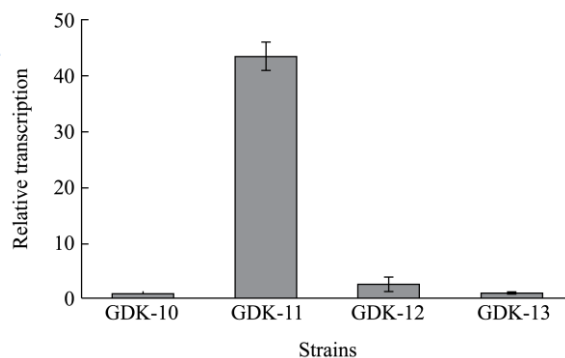


图 6 GDK-10、GDK-11、GDK-12 和 GDK-13 中 *pepc* 的转录水平

Fig.6 Relative mRNA level of the *pepc* gene in GDK-10, GDK-11, GDK-12, and GDK-13 strains

由图 7 和表 3 可知, 出发菌株 GDK-10 最大生物量为 19.48 g/L, 产酸量为 43.93 g/L。而菌株 GDK-11 和 GDK-12 的最大生物量较出发菌株下降了 26.83% 左右, 这可能与 *pepc* 转录水平的增强, 菌体的正常代谢受到影响有关。

表 3 α -KG 补料分批发酵的参数

Table 3 Parameters of the different fed-batch α -KG fermentations

参数	菌株			
	GDK-10	GDK-11	GDK-12	GDK-13
发酵周期/h	30.0	26.0	30.0	30.0
最大细胞干重/(g DCW/L)	19.47	14.26	14.26	17.54
α -KG 浓度/(g/L)	43.93	23.94	32.45	42.03
糖酸转化率/%	26.33	22.18	15.27	28.69
单位菌体产酸量/(g/g DCW)	2.98	2.33	4.13	3.61
L-谷氨酸浓度/(g/L)	11.21	10.34	12.87	9.98
乙酸浓度/(g/L)	9.33	7.47	19.42	10.12
乳酸浓度/(g/L)	0.31	0.32	27.19	0.45
琥珀酸浓度/(g/L)	13.42	5.46	17.61	13.89

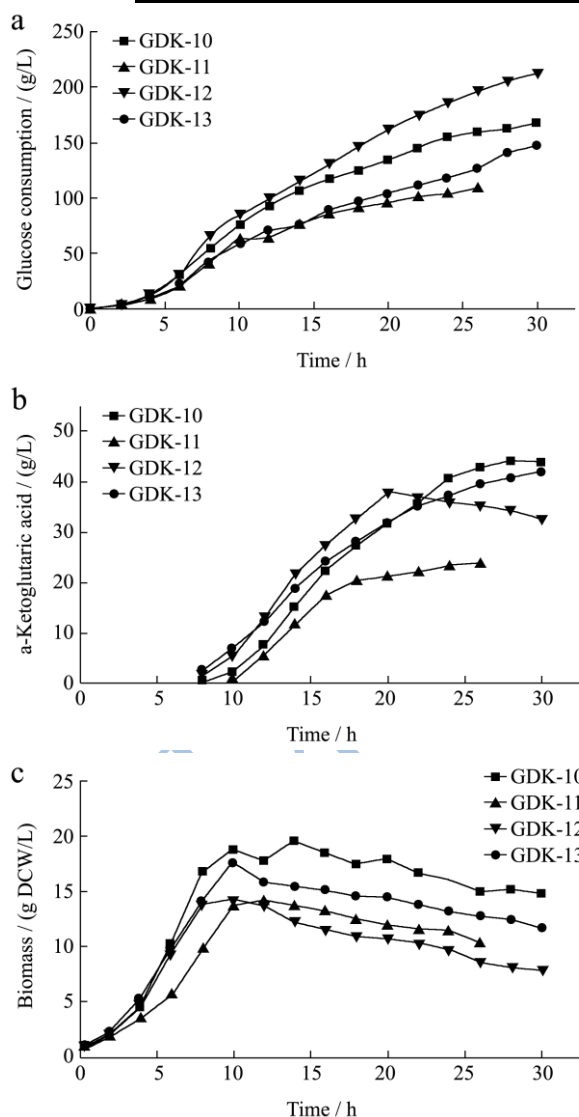


图 7 GDK-10、GDK-11、GDK-12 和 GDK-13 的发酵过程曲线
 Fig.7 Glucose consumption (a), α -ketoglutaric acid production (b), and biomass (c) of GDK-10, GDK-11, GDK-12, and GDK-13

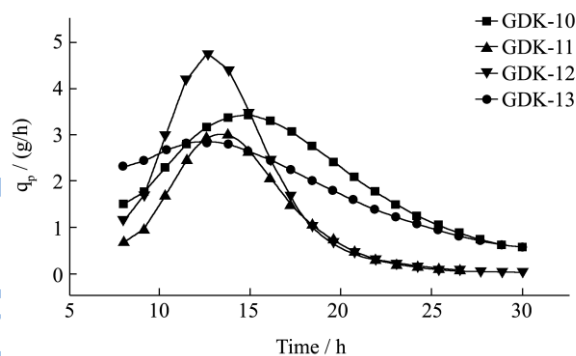


图 8 GDK-10、GDK-11、GDK-12 和 GDK-13 的 q_p 值

Fig.8 Specific α -ketoglutaric acid formation rate (q_p) among GDK-10, GDK-11, GDK-12, and GDK-13

由图 8 可知，菌株 GDK-10 在发酵 15 h 时，达到最大 q_p 值 3.42 g/h，而重组菌株 GDK-11 的 q_p 值在整个发酵阶段明显低于出发菌株，最终 α -KG 的产量仅为 23.94 g/L，较出发菌株下降了 45.50%，这可能是由于 PPC 活性的过度增强，导致 EMP 途径的代谢紊乱，影响了 α -KG 的合成途径^[8]。有研究表明，天冬氨酸对 PPC 有强烈的抑制作用，仅 0.50 mmol/L 天冬氨酸即可使 PPC 酶活丧失 92% 以上^[11]，而由菌株 GDK-12 的发酵结果可知，在发酵 12.5 h 时，达到最大 q_p 值 4.73 g/h，14 h 时产酸量达到 21.64 g/L，相比出发菌株在 14 h 时的产酸量提高了 44.01%，但 14 h 之后 q_p 值开始急剧下降，发酵 20 h 时， α -KG 的产量达到 37.82 g/L，之后停止积累，由此说明，相对于重组菌株 GDK-11，低拷贝 *pepc* 的重组菌株 GDK-12 可以在发酵的一定时期提高 α -KG 的合成速率，但在发酵后期，可能随着天冬氨酸的积累，抑制了 PPC 活性，最终 α -KG 停止积累^[10,12]。此外，菌株 GDK-12 的生物量虽然相对出发菌株下降了 26.83%，但耗糖量并没有减

少,反而增加了 9.02%,同时在发酵过程中检测到了大量的副产物乳酸和乙酸的生成,说明在发酵后期,因为 CO₂ 固定反应代谢通量的减少,菌体利用葡萄糖所产生的能量主要流向了丙酮酸的支路代谢。虽然菌株 GDK-12 的单位菌体产酸量为 4.13 g/g,较出发菌株提高了 38.59%,但因为总的生物量下降严重,最终的产酸量为 32.45 g/L,较出发菌株下降了 26.13%。虽然菌株 GDK-13 的 α -KG 和副产物含量没有明显变化,但其糖酸转化率为 28.69%,相对于出发菌株提高了 8.97%,在发酵 8 h 到 12 h 的 q_p 值明显高于出发菌株 GDK-10。此外,菌株 GDK-13 的单位菌体产酸量较出发菌株提高了 21.14%,综合糖酸转化率、菌体生物量、产酸量等多个关键参数,说明该定向突变有利于 α -KG 的合成积累。

3 结论

3.1 本研究以谷氨酸棒状杆菌 GDK-10 为出发菌株,利用同源重组技术,构建了 GDK-11、GDK-12 和 GDK-13 三株重组菌,旨在通过增加磷酸烯醇式丙酮酸到草酰乙酸的代谢通量,以提高 α -KG 的积累量。结果表明,使用强启动子 P_{tnf} 替换原始的 P_{pepc} 启动子,虽然使 *pepc* 的转录水平提高了 47.50 倍,但并不能增加 α -KG 的产量,反而会大幅度降低菌体的耗糖能力,对菌体的生长也极为不利。构建双拷贝 *pepc* 的重组菌株,在发酵前期可以显著提高 α -KG 的合成速率,说明适量增强 *pepc* 可以增加 α -KG 的代谢通量但其终产量较低。将 GDK-10 基因组 *pepc* 突变为解除天冬氨酸反馈抑制的 *pepc* (N917G)后,显著提高单位菌体的产酸量。

3.2 本文分析了增强 *pepc* 转录水平对菌株生长、 α -KG 产量及主要副产物含量的影响。结果表明,适量增强 PPC 酶活性可以显著提高 α -KG 的合成速率,对谷氨酸棒状杆菌积累 α -KG 的相关研究提供了一定的参考。

参考文献

- [1] Ur-Rehman S, Fox PF. Effect of added α -ketoglutaric acid, pyruvic acid or pyridoxal phosphate on proteolysis and quality of Cheddar cheese [J]. Journal of Food Chemistry, 2002, 76 (1): 21-26.
- [2] Matzi V, Lindenmann J, Muench A, et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined α -ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural [J]. European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 2007, 32 (5): 776-782
- [3] Stottmeister U, Aurich A, Wilde H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(11/12): 651-664
- [4] Barrett DG, Yousaf M N. Poly (triol α -ketoglutarate) as biodegradable, chemoselective, and mechanically tunable elastomers [J]. Journal of Macromolecules, 2008, 41 (17): 6347-6352
- [5] Ridet C, Rittmann D, Danqel P, et al. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001, 3(4): 573-583
- [6] Peter P G, Schiel B, Wendisch V F, 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
- [7] Kwang Ho L, Jin H P, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production [J]. Journal of Molecular Systems Biology, 2007, 3: 149
- [8] Zhen C, Rajesh R B, et al. Dereglulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Applied Environmental Microbiology, 2014, 80(4): 1388
- [9] 毛影, 毕中周. HPLC 法测定酮戊二酸的含量 [J]. 中国药事, 2008, 22(10): 895-896
MAO Ying, BI Zhong-zhou. The method for the determination of α -ketoglutaric acid by HPLC. Chinese Pharmaceutical Affairs [J], 2008, 22(10): 895-896
- [10] Otto C, Yovkova V, Aurich A, et al. Variation of the by-product spectrum during α -ketoglutaric acid production from raw glycerol by overexpression of fumarase and pyruvate carboxylase genes in *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95 (4): 1-13
- [11] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536
ZHAO Kai, XUE Peng-ju, GU Guang-ye. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method [J]. Food Science, 2008,

- 29(8): 534-536
- [12] van der Maarel M J E C, Leemhuis H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(1): 116-121
- [13] LI Xingfei, MIAO Ming, Jiang Huan, et al. Partial branching enzyme treatment increases the low glycaemic property and α -1,6 branching ratio of maize starch [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 502-509
- [14] MIAO Ming, JIANG Bo, Steve W C, et al. Slowly digestible starch-a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(12): 1642-1657

现代食品科技