

理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌 高效合成 *L*-谷氨酰胺

乔邱钠, 吕青兰, 李翔飞, 王 晴, 徐美娟, 饶志明*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: *L*-谷氨酰胺(*L*-glutamine, *L*-Gln)是人体液中含量最丰富的一种半必需氨基酸,具有多种营养和药理功能,被广泛应用于医药、食品添加剂、营养保健品、饲料等领域。目前,微生物发酵法是生产 *L*-Gln 的主要方法,发酵产酸效率低、副产物多、菌种性能欠缺等问题严重限制了其工业化应用。为解决这一问题,作者以实验室前期构建的 *L*-Gln 生产菌株 CGQ03 为出发菌株,通过强化谷氨酸脱氢酶表达及辅因子 NADPH 供应促进前体 *L*-谷氨酸合成、增强辅因子 ATP 胞内含量、过表达溶氧相关蛋白 Vhb 提高细胞携氧能力、增强关键酶谷氨酰胺合成酶催化活性及发酵工艺优化等策略提高了 *L*-Gln 产量。最终的基因工程菌 CGQ08/pDXW10-*glnA*^{sc}-*gdh*^C在 5 L 发酵罐上补料分批发酵 66 h, *L*-Gln 的产量最高达(94.5±1.8) g/L,糖酸转化率为 34.8%,生产强度为 1.43 g/(L·h)。本研究为 *L*-Gln 及其相关化合物的工业化生产提供了借鉴。

关键词: *L*-谷氨酰胺;谷氨酸棒杆菌;谷氨酰胺合酶;NADPH 供应;ATP 供应;发酵工艺优化

中图分类号:Q 815 文章编号:1673-1689(2022)08-0065-10 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.007

Efficient Synthesis of *L*-Glutamine by *Corynebacterium glutamicum* Promoted via Rational Metabolic Engineering

QIAO Zhina, LYU Qinglan, LI Xiangfei, WANG Qing, XU Meijuan, RAO Zhiming*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *L*-glutamine is the most abundant semi-essential amino acid in human fluids. It has a variety of nutritional and pharmacological functions and is widely used in medicine, food additives, nutritional health products, feed and other fields. At present, microbial fermentation is the main method to produce *L*-Gln, but its industrial application is seriously limited by the problems of low fermentation acid production efficiency, many by-products, and lack of bacterial performance. In order to solve those problems, the *L*-Gln production strain CGQ03 constructed early in our laboratory was used as the starting strain in this study. The synthesis of precursor *L*-glutamate was promoted by enhancing the expression of glutamate dehydrogenase and the supply of cofactor NADPH. The yield of *L*-Gln production was increased by enhancing the intracellular content of cofactor ATP, overexpressing the dissolved oxygen-related protein Vhb to improve the oxygen carrying capacity of

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2100900)。

* 通信作者: 饶志明(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物代谢工程与合成生物学方面的研究。

E-mail:raozhm@jiangnan.edu.cn

cells, enhancing the catalytic activity of key enzyme glutamine synthetase, and optimizing the fermentation process. The final genetically engineered strain CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} was fed-batch fermented in a 5 L fermenter for 66 h, and the yield of L-Gln was up to (94.5±1.8) g/L, with the sugar-acid conversion rate of 34.8% and the production intensity of 1.43 g/ (L·h). This study could provide an important reference for the industrial production of L-Gln and its related compounds.

Keywords: L-glutamine, *Corynebacterium glutamicum*, glutamine synthase, NADPH supply, ATP supply, fermentation process optimization

L-谷氨酰胺(L-glutamine, L-Gln)是L-谷氨酸γ-羧基酰胺化产物,是人体液中含量最丰富的一种半必需氨基酸。L-Gln具有α-氨基和末端酰胺基2个氨基,是生命体氮代谢的重要物质之一,参与胞内蛋白质、嘧啶、嘌呤等化合物的生物合成。L-Gln在临床上主要用于抗胃溃疡、减少术后病人并发症、改善脑神经机能、治疗急性酒精中毒等方面;在食品保健品方面主要用于保护肌肉量、提高机体免疫力、预防衰老、抗癌等;在动物饲料方面主要是提高动物幼崽存活率、促进其生长发育;在细胞培养方面主要是促进细胞增殖分化和产酸^[1-4]。随着L-Gln的功能不断被开发,L-Gln市场将供不应求。

目前,L-Gln的生产方法主要有发酵法^[5-7]、酶法^[8]和化学合成法^[9]。化学法是以L-谷氨酸和甲醇为原料,通过甲酯法或水合肼法制备得到的L-Gln,反应过程烦琐、试剂毒性大、反应条件苛刻;酶法合成过程中需要制备纯酶和投入大量昂贵的ATP,成本巨大,因此都不适用于L-Gln的工业化生产。相比之下,微生物直接发酵生产L-Gln具有原料廉价易得、反应条件温和等优点,是目前工业上生产L-Gln的主要方法。

L-Gln生产菌种有棒杆菌属(*Corynebacterium* sp.)和短杆菌属(*Brevibacterium* sp.),主要是通过传统诱变育种和基因工程改造获得的。夏海平等^[10]人以GB20为出发菌株,通过亚硝基胍诱变结合磺胺胍抗性筛选方法选育出一株性能稳定的L-Gln高产菌株,5 L发酵罐产酸达75.0 g/L。白婧等^[11]在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)13032中过表达不受腺苷酰化作用影响的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS, EC 6.3.1.2)基因*glnA*,并通过启动子工程筛选了适用的Ptac启动子,构建了基因工程菌BJ2,L-Gln的积累量为32.5 g/L。Liu等人通过*glnA*

基因定点突变Y405F提高GS的催化活性及过表达透明颤菌来源的*vgb*基因提高细胞溶氧水平的组合策略使重组*C. glutamicum*中L-Gln产量达40.5 g/L^[12]。日本株式会社Hayashi和Tabata^[13]发现并验证了大肠杆菌(*Escherichia coli*)中DNA旋转酶突变能够促进L-Gln的积累,并通过敲除竞争支路、增强GS活性等一系列理性代谢工程改造策略构建了一株工程菌JMQ08,L-Gln产量提高至74.8 g/L。

我国在L-Gln发酵研究方面较日本、韩国等国家起步晚,工业生产L-Gln仍然存在着发酵用菌株遗传稳定性差、发酵产酸效率低、副产物分离成本高等问题,基于系统代谢工程和合成生物学的菌株开发对改善我国L-Gln工业化生产具有重大现实意义。

谷氨酸棒杆菌是FDA认证的食品安全级GRAS(Generally Recognized As Safe)菌株,同时也是工业生产氨基酸、糖类、核苷等化学品及其衍生物的重要菌种。CGQ03/pXMJ19-R5-*glnA*^{Sc}-*ppk*^{Ec}是本课题组前期通过理性代谢工程改造获得的一株L-Gln高产菌株(L-Gln产量为73.5 g/L)^[14],在研究过程中发现,溶氧水平和能量供应不足是影响菌体生长及L-Gln发酵的关键因素。为解决这一问题,作者在前期研究基础上继续强化谷氨酸脱氢酶GDH表达及辅因子NADPH供应,促进前体L-谷氨酸合成、增强辅因子ATP胞内含量、过表达溶氧相关蛋白VHb提高细胞携氧能力、增强关键酶谷氨酰胺合成酶的催化活性及优化发酵工艺等策略,进一步提高L-Gln的产量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 本研究所用到的菌株大肠杆菌*E. coli* JM109、谷氨酸棒杆菌*C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* G01、CGQ03、CGQ03/pXMJ19-

R5-*glnA^{Sc}*-*ppk^{Ec}*和质粒 pJC1-*tac*-*vgb*、pDXW10、pK18*mobsacB*均为作者所在实验室保藏。

1.1.2 试剂 高保真酶 PhantaR Max (p515) DNA polymerases、同源重组连接试剂盒、2×Ex Taq DNA 聚合酶:购于南京诺唯赞生物科技有限公司;限制性内切酶、DNA Marker、蛋白质 Marker、大肠杆菌感受态制备试剂盒:购自 Takara 公司;培养基所需原料:购于国药集团。

1.1.3 培养基 LB 培养基:NaCl 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L,固体培养基则添加 1.5~2.0 g/dL 的琼脂粉;10%LBGS 培养基:LB 培养基、葡萄糖 5 g/L、蔗糖 100 g/L;BHI 培养基:脑心浸液肉汤干粉 38.5 g/L,固体培养基则添加 1.5~2.0 g/dL 的琼脂粉;谷氨酸棒杆菌电转感受态培养基:NaCl 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、葡萄糖 5 g/L、甘氨酸 30 g/L、吐温-80 体积分数 0.2%;种子培养基:葡萄糖 30 g/L、尿素 6 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、玉米浆 30 mL,初始 pH 7.0;发酵培养基:葡萄糖 120 g/L、硫酸铵 40 g/L、尿素 2 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、ZnSO₄·7H₂O 71.2 mg/L、FeSO₄·7H₂O 146.4 mg/L、MnSO₄·H₂O 44.8 mg/L、L-脯氨酸 0.5 g/L、玉米浆 10 mL,初始 pH 7.0;摇瓶发酵培养基:发酵培养基中加入 30 g/L CaCO₃和 0.1%苯酚红溶液(显色剂,变色范围为 6.8~8.4,由黄到红),用于 pH 调控;补料培养基 1:800 g/L 葡萄糖;补料培养基 2:玉米浆 50 mL、K₂HPO₄ 12.5 g/L、MgSO₄ 5 g/L、硫酸铵 200 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建

1) pK18*mobsacB* 整合质粒的构建 以构建质粒 pK18-P_{pgk}-*vgb* 为例:利用引物 31/引物 32 从 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组上扩增添加同源

臂的 P_{pgk} 启动子序列,利用引物 33/引物 34 从质粒 pJC1-*tac*-*vgb* 中扩增出添加同源臂的 *vgb* 基因,分别以引物 29/引物 30 和引物 35/引物 36 从 CGQ03 基因组中扩增出编码腺苷酸转移酶 GlnE 基因 *glnE* 部分片段缺失位点,左右添加同源臂的上下游 500 bp,然后用引物 29/引物 36 进行重叠延伸 PCR,融合片段与经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 消化的线性质粒 pK18*mobsacB* 进行同源重组获得质粒 pK18-P_{pgk}-*vgb*。重组质粒 pK18-P_{pgk}-*icd*、pK18-P_{pgk}-*gapA*、pK18-P_{pgk}-*gapAm*、pK18-P_{pgk}-*pyk* 和 pK18-P_{pgk}-*pgk* 同样依此采用重叠延伸 PCR 的方法进行构建(*gapAm* 的扩增模板为谷氨酸生产菌株 *C. glutamicum* G01 基因组,其全基因组测序发现 *gapA* 基因的核苷酸序列含 4 个突变位点 D35G、L36R、T37K 和 P192S)。

2) pDXW10 过表达质粒构建 分别以重组质粒 pXMJ19-R5-*glnA^{Sc}*-*ppk^{Ec}* 和 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组为模板,利用引物 37/引物 38、引物 40/引物 42 进行 PCR 扩增获得添加同源臂的 *glnA^{Sc}* 和 *gdh^{Cg}* 基因片段,纯化后分别与经 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切的 pDXW10 线性化质粒进行同源重组连接,从而构建获得 pDXW10-*glnA^{Sc}* 和 pDXW10-*gdh^{Cg}*。

重组质粒 pDXW10-*glnA^{Sc}*-*gdh^{Cg}* 的构建则是以重组质粒 pDXW10-*glnA^{Sc}* 和 pDXW10-*gdh^{Cg}* 为模板,利用引物 37/引物 39 和引物 41/引物 42 进行 PCR 扩增获得添加同源臂的 *glnA^{Sc}* 和含 *tacM* 启动子的 *gdh^{Cg}* 基因片段,接着使用引物 37/引物 42 通过重叠延伸 PCR 程序将两个 DNA 片段融合,纯化后的 *glnA^{Sc}*-*gdh^{Cg}* 融合片段与经 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切的 pDXW10 线性化质粒进行同源重组连接。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers in this study

引物序号	引物名称	引物序列
1	pK18-P _{pgk} - <i>icd</i> -LF	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCGCGCATCCTCGAAGACCTCG (<i>Bam</i> H I)
2	pK18-P _{pgk} - <i>icd</i> -LR	AGCATCGATCGCCACGTGAGTCTCCTTGGTTGATG
3	pK18-P _{pgk} - <i>icd</i> -MF	CATCAACCAAGGAGACTCACGTGGCGCATCGATGCT
4	pK18-P _{pgk} - <i>icd</i> -MR	CCAGATGATCTTAGCCATGCCGTACTCCTTGGAGAT
5	pK18-P _{pgk} - <i>icd</i> -RF	ATCTCCAAGGAGTACGGCATGGCTAAGATCATCTGG
6	pK18-P _{pgk} - <i>icd</i> -RR	TATGACCATGATTACGAATTCGAATCTGCAGACCACTCGCCCA (<i>EcoR</i> I)
7	pK18-P _{pgk} - <i>gapA</i> -LF	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCTCGCAGCCGGCGCCTTTCAAC (<i>Bam</i> H I)

续表 1

引物序号	引物名称	引物序列
8	pK18-P _{pgk} -gapA-LR	AGCATCGATCGCCACGTAAGTCTTCACTGAC
9	pK18-P _{pgk} -gapA-MF	GTCAGTGAAGACTTTTACGTGGGCGATCGATGCT
10	pK18-P _{pgk} -gapA-MR	CTTGTGGTTGTGCGTCATGCCGTACTCCTTGGAGAT
11	pK18-P _{pgk} -gapA-RF	ATCTCCAAGGAGTACGGCATGACGCACAACCACAAG
12	pK18-P _{pgk} -gapA-RR	TATGACCATGATTACGAATTCACCAGGTCTTCTTACCATTCTT (<i>EcoR</i> I)
13	pK18-Δ <i>proB</i> -1F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCAAACCGAGCACTTTTCAAGTCTA (<i>Bam</i> H I)
14	pK18-Δ <i>proB</i> -P _{pgk} -1R	AGCATCGATCGCCACGTGCATGAGGTGAACCTTGCC
15	pK18-Δ <i>proB</i> -P _{pgk} -2F	GGCAAGTTCACCTCATGCACGTGGGCGATCGATGCT
16	pK18-P _{pgk} -pyk-2R	CTTAGTTCGTCTATCCATGCCGTACTCCTTGGAGAT
17	pK18-P _{pgk} -pyk-3F	ATCTCCAAGGAGTACGGCATGGATAGACGAACATAAG
18	pK18-pyk-Δ <i>proB</i> -3R	CCGTCATCGAGTCGGATCTTAGAGCTTTGCAATCCTTG
19	pK18-pyk-Δ <i>proB</i> -4F	CAAGGATTGCAAAGCTCTAAGATCCGACTCGATGACGG
20	pK18-Δ <i>proB</i> -4R	TATGACCATGATTACGAATTCGAGGCCTGCACGAACCTTGATGT (<i>EcoR</i> I)
21	pK18-Δ <i>Ncgl1221</i> -1F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCAAATTCACCCCAAACTCC (<i>Bam</i> H I)
22	pK18-Δ <i>Ncgl1221</i> -P _{pgk} -1R	AGCATCGATCGCCACGTTCACCCACGCCGAATTGC
23	pK18-Δ <i>Ncgl1221</i> -P _{pgk} -2F	GCAATTCGGCGTGGGTGAACGTGGGCGATCGATGCT
24	pK18-P _{pgk} -pgk-2R	GAGGGTCTTAACAGCCATGCCGTACTCCTTGGAGAT
25	pK18-P _{pgk} -pgk-3F	ATCTCCAAGGAGTACGGCATGGCTGTAAAGACCCCTC
26	pK18-pgk-Δ <i>Ncgl1221</i> -3R	CAACAGGGACGTGCTCATTTACTGAGCGAGAATTGC
27	pK18-pgk-Δ <i>Ncgl1221</i> -4F	GCAATTCGCTCAGTAAATGAGCACGTCCCTGTTG
28	pK18-Δ <i>Ncgl1221</i> -4R	TATGACCATGATTACGAATTCGCGTGAATTTTTCGGAAAGC (<i>EcoR</i> I)
29	pK18-Δ <i>glnE</i> -1F	CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTTGATCAAGAGATTCCGCAGGA (<i>Bam</i> H I)
30	pK18-Δ <i>glnE</i> -P _{pgk} -1R	AGCATCGATCGCCACGTTGAATCAACCGGCTTTTC
31	pK18-Δ <i>glnE</i> -P _{pgk} -2F	GAAAAGCCGGTTGATTCAACGTGGGCGATCGATGCT
32	pK18-P _{pgk} -vgb-2R	GGTTTGCTGGTCTAACATGCCGTACTCCTTGGAGAT
33	pK18-P _{pgk} -vgb-3F	ATCTCCAAGGAGTACGGCATGTTAGACCAGCAAACC
34	pK18-vgb-Δ <i>glnE</i> -3R	CGGCTACCGGCTCGCATATTATTCAACCGCTTGAGC
35	pK18-vgb-Δ <i>glnE</i> -4F	GCTCAAGCGGTTGAATAATATGCGAGCCGGTAGCCG
36	pK18-Δ <i>glnE</i> -4R	TATGACCATGATTACGAATTCGACGTATGTGCAGTCCGGA (<i>EcoR</i> I)
37	pDXW10- <i>glnA</i> ^{Sc} -LF	TTACACACAGGAAACAGAATTCAGGAGGAGGGTTATTAGATGGC (<i>EcoR</i> I)
38	pDXW10- <i>glnA</i> ^{Sc} -R	CATCCGCCAAAACAGAAGCTTTTATGAAGATTCTCTTTCAAAT (<i>Hind</i> III)
39	pDXW10- <i>glnA</i> ^{Sc} -LR	GATAAGCTCCTTATGAAGATTCTCTTTCAA
40	pDXW10- <i>gdh</i> ^{Cg} -F	TTACACACAGGAAACAGAATTCAGGAGGAGGGTTATTAGATGACAGTTGATGAGCAGGTCTC (<i>EcoR</i> I)
41	pDXW10- <i>gdh</i> ^{Cg} -RF	ATCTTCATAAGGAGCTTATCGACTGCACGG
42	pDXW10- <i>gdh</i> ^{Cg} -RR	CATCCGCCAAAACAGAAGCTTTTATGATGACGCCCTGTGCCAGC (<i>Hind</i> III)
43	pDXW10-F/R	GACAGTTTTATTGTTTCATGA/TGGGGTCAGGTGGGACCACC
44	pK18-F/R	GCGGATAACAATTTACACACAGGAAAC/GTTTTCCAGTCACGACGTTG

注:下划线部分表示限制性酶切位点,粗斜体表示 RBS 序列。

1.2.2 重组菌株的构建与表达

1) 大肠杆菌重组菌株的构建 *E.coli* JM109 用于整合质粒 pK18*mobsacB*、pDXW10-*glnA*^{Sc}、pDXW10-*gdh*^{Cg} 和 pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} 的宿主菌。

将 1.2.1 部分的连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞中,转化子菌落 PCR 所用引物为通用引物(引物 43 或 44), 条带大小完全正确的即为阳性转化子。阳性转化子进行扩增培养并提取质粒送金唯智(中

国,苏州)Sanger 测序,测序完全正确即大肠杆菌重组菌株构建成功。

2) 谷氨酸棒杆菌中过表达菌株的构建 将构建好的 pDXW10-*glnA*^{Sc}、pDXW10-*gdh*^{Cg}和pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg}重组质粒电转至谷氨酸棒杆菌感受态细胞中,挑取形态正确的转化子,利用引物 43 进行菌落 PCR 验证,条带大小正确即重组谷氨酸棒杆菌构建成功。

3) 谷氨酸棒杆菌中基因整合菌株的构建 将测序正确的含整合片段的 pK18 质粒电转入谷氨酸棒杆菌感受态细胞,具体筛选方法参照文献[14]。验证所用引物为:引物 1/引物 6、引物 7/引物 12、引物 13/引物 20、引物 21/引物 28 和引物 29/引物 36。

1.2.3 酶的诱导表达 GS 和 GDH 酶的诱导表达方法按照参考文献[15]方法进行。

1.2.4 重组菌株发酵

1) 摇瓶发酵 将冻管谷氨酸棒杆菌于 BHI 平板上进行多次活化,按照文献[14]所述发酵方法进行摇瓶发酵。

2) 5 L 发酵罐补料分批发酵 按照文献[14]所述方法进行谷氨酸棒杆菌 5 L 发酵罐(迪必尔,上海)补料分批发酵,其中发酵过程中 pH 值的调控是通过自动流加体积分数 50%/100%氨水实现的,可分为两阶段:细胞生长期(0~20 h)pH 值设置为 7.0~7.2;产酸期(20 h 及以后),使 pH 自然下降至 6.2 并维持 pH 恒定。溶氧控制方式根据不同的需要进行设置。

1.2.5 相关参数测定 谷氨酰胺合成酶 GS 酶活性的测定参照文献[14]的方法;谷氨酸脱氢酶 GDH 酶活测定参照文献[16];胞内 NADPH/NADP⁺测定采用 NADP⁺/NADPH Quantification Colorimetric Kit (BioVision, Inc., Milpitas, CA) 试剂盒测定[17];胞内 ATP 含量测定采用 ATP 试剂盒[18]。

发酵过程菌体浓度 OD₆₀₀ 通过 UV-VIS 分光光度计(Aoesh, 中国上海)测定;葡萄糖和副产物 L-谷氨酸通过生物传感器 SBA-40E(山东省科学院生物研究所)测定;L-Gln 含量通过高效液相色谱 HPLC-OPA 法测定[19]。

2 结果与讨论

2.1 强化前体 L-谷氨酸合成途径促进 L-Gln 合成 L-谷氨酸是 L-Gln 生物合成的重要前体物质。

作者所在实验室前期通过敲除谷氨酸分泌通道蛋白 NCgl1221 减少了 L-谷氨酸的细胞外泄,增强了胞内 L-谷氨酸的积累量,改善了 L-Gln 的合成[14]。谷氨酸脱氢酶 GDH 作为 L-谷氨酸合成的关键酶,其催化 α-酮戊二酸生成 L-谷氨酸的过程中需要消耗辅因子 NADPH。

前期研究发现,通过利用翻译起始速率 4 000 AU 的强 RBS 序列调控 6-磷酸葡萄糖异构酶 PGI (*pgi* 编码)能够显著提高胞内 NADPH 的水平,促进 L-精氨酸的积累,但是会影响 EMP 途径,因此在一定程度上会抑制细胞的生长[16]。而 Zhang 等[20]研究发现,强化 NADP⁺依赖的异柠檬酸脱氢酶 ICD(*icd* 编码)和甘油醛 3-磷酸脱氢酶 GAPDH(*gapA*)表达时,可提高 *C. glutamicum* 胞内的 NADPH 水平并促进 δ-氨基-γ-酮戊酸的合成,且不会影响细胞生物量。Shang 等[21]研究发现,组成型启动子 P_{pgk} 的表达强度比 P_{lac} 高约 1.35 倍。因此,本研究用于强化基因表达时均选用 P_{pgk} 启动子。

为进一步增加胞内 L-谷氨酸含量,在 CGQ03 的基础上,利用组成型启动子 P_{pgk} 强化 ICD 和 GAPDH 的表达,并将 4 个突变位点 D35G、L36R、T37K 和 P192S 整合到 GAPDH 上(GAPDHm),分别构建了工程菌 CGQ04、CGQ05 和 CGQ06,见图 1。

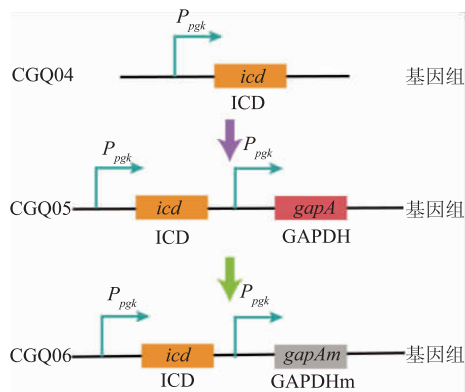


图 1 菌株 CGQ04、CGQ05 和 CGQ06 构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of strains CGQ04, CGQ05 and CGQ06

通过测定菌株 CGQ04、CGQ05 和 CGQ06 胞内 NADPH 的质量摩尔浓度发现,CGQ05、CGQ06 和 CGQ07 胞内 NADPH 质量摩尔浓度逐渐提高,分别为(0.78±0.05)、(0.92±0.04)、(0.98±0.06) μmol/g。其中 CGQ07 胞内 NADPH 质量摩尔浓度较 CGQ04 的(0.62±0.02) μmol/g 提高了 58.06%,说明 ICD 和

GAPDH 的强化能够促进胞内 NADPH 的水平,为谷氨酸脱氢酶 GDH 提供更加丰富的辅因子。

摇瓶发酵结果见图 2。CGQ04、CGQ05 和 CGQ06 积累 L-Gln 的水平逐渐增加,分别为 38.1 g/L、38.4 g/L 和 39.3 g/L,且细胞生物量以及葡萄糖利用率基本变化不大。

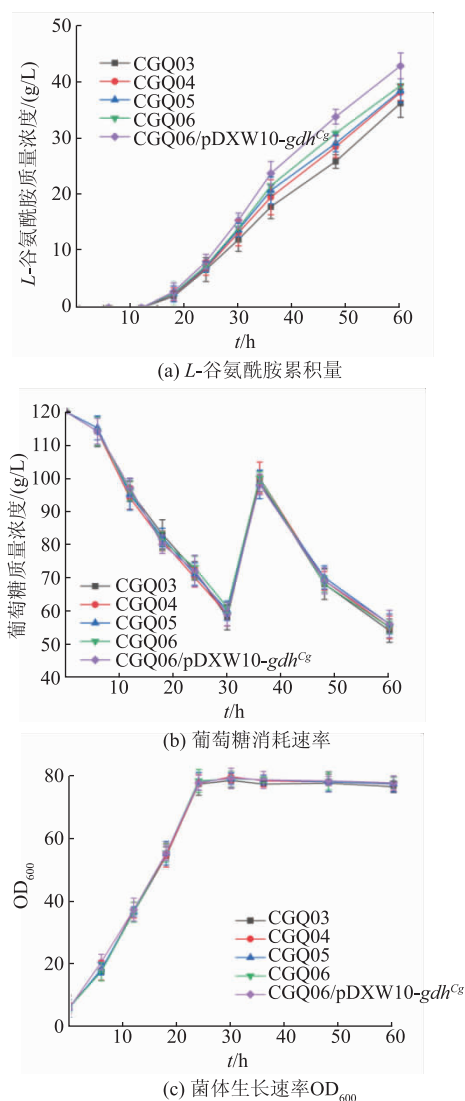


图 2 强化 NADPH 供应及 GDH 表达对 L-Gln 合成的影响
Fig. 2 Effects of enhanced NADPH supply and GDH expression on L-Gln synthesis

为了在 CGQ06 基础上增强 GDH 表达,将 pDXW10-gdh^{Cg} 质粒电转 CGQ06 感受态,构建了重组菌株 CGQ06/pDXW10-gdh^{Cg}。SDS-PAGE 分析和胞内 GDH 酶活的测定结果显示,在 49 000 附近有条带加粗,即 CgGDH 成功表达,见图 3,且酶活为 (275.42±2.54) U/mg。摇瓶发酵 60 h, L-Gln 产量达

到 (42.8±2.3) g/L, 菌体生长及葡萄糖消耗变化不大。以上结果表明,强化胞内辅因子 NADPH 供应及 GDH 表达能够增强前体 L-谷氨酸的胞内积累从而促进 L-Gln 的合成。

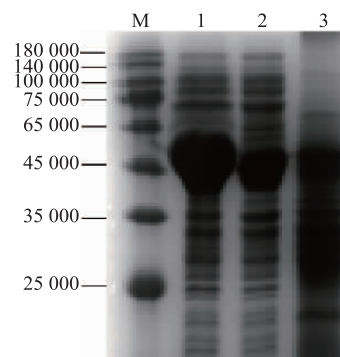


图 3 CGQ06/pDXW10-gdh^{Cg} 菌株 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of strain CGQ06/pDXW10-gdh^{Cg}

2.2 增强胞内 ATP 供应促进 L-Gln 合成

ATP 不仅能为细胞生长提供能量,同时也会影响糖酵解通量的速率,从而影响产物的代谢与合成。通过调控胞内 ATP 供应,可以有效实现目标产物的更高浓度和更高转化率^[22]。氨基酸发酵过程中 ATP 供应不足往往会造成乳酸的大量积累进而导致发酵失败^[18]。目前,谷氨酸棒杆菌中 ATP 调控主要可以通过操纵代谢通量、电子传递链、辅因子 NADH、ADP 等来实现^[22]。作者所在实验室前期通过对丙酮酸激酶编码基因 *pgk* 和甘油酸-3-磷酸激酶编码基因 *pyk* 同时过表达,使得胞内 ATP 水平显著提高,促进了 L-精氨酸合成^[16]。在利用谷氨酸棒杆菌发酵生产 L-Gln 的过程中,需要充足的 ATP 和高溶氧环境以满足菌体的生长和 L-Gln 的合成。在前期研究中,异源表达大肠杆菌来源的多聚磷酸盐激酶 PPK 已成功使 L-Gln 增产,但发酵过程需要额外添加六偏磷酸钠,增加了生产成本。因此,作者通过增强 *pgk* 和 *pyk* 基因表达提高胞内 ATP 含量,以更好应用于 L-Gln 的工业化生产。

在 γ -谷氨酸激酶编码基因 *proB* 缺失片段位点整合插入 P_{pgk}-*pyk* (起始密码子 CTG 改为 ATG),谷氨酸外泌蛋白 *Ncgl1221* 基因缺失片段位点整合插入 P_{pgk}-*pgk*,构建获得 CGQ07 菌株,见图 4。

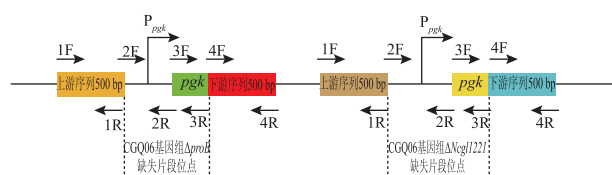


图4 CGQ07菌株构建示意图

Fig. 4 Construction diagram of CGQ07 strain

胞内ATP测定结果显示,CGQ07菌株胞内ATP质量摩尔浓度为 $4.8 \mu\text{mol/g}$,较CGQ06菌株($3.5 \mu\text{mol/g}$)提高了37.1%,说明强化 pyk 和 pgk 基因表达水平能够提高胞内ATP水平。摇瓶发酵结果显示,CGQ07菌株L-Gln产量为 $(42.5 \pm 2.5) \text{ g/L}$,较CGQ06菌株提高了8.15%,菌体生长略有改善,见图5。

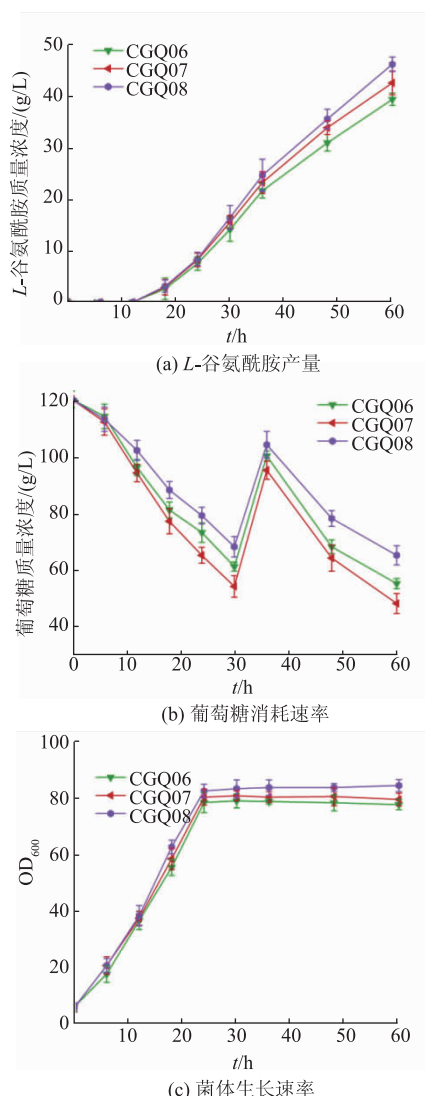


图5 CGQ07和CGQ08菌株的摇瓶发酵

Fig. 5 Shake flask fermentation of strains CGQ07 and CGQ08

2.3 提高细胞携氧能力促进能量代谢平衡

谷氨酸棒杆菌发酵过程中对氧的需求量非常大,据文献报道,过表达VHb蛋白(编码基因 vgb)是改善菌体氧供应、提高胞内ATP能量供应的一种有效措施^[12,23]。因此,作者在CGQ07菌株基因组腺苷酸转移酶GlnE缺失基因位点上整合插入了透明颤菌来源的添加了 P_{pgk} 启动子的 vgb 基因,获得了CGQ08菌株,见图6。

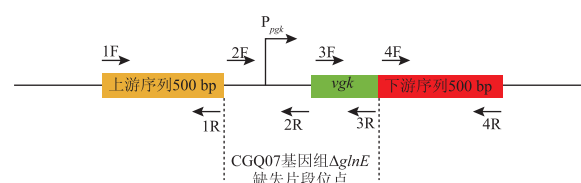


图6 CGQ08菌株构建示意图

Fig. 6 Construction diagram of CGQ08 strain

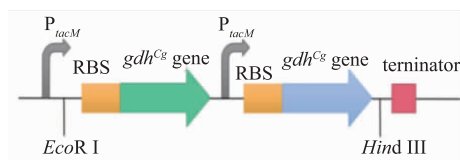
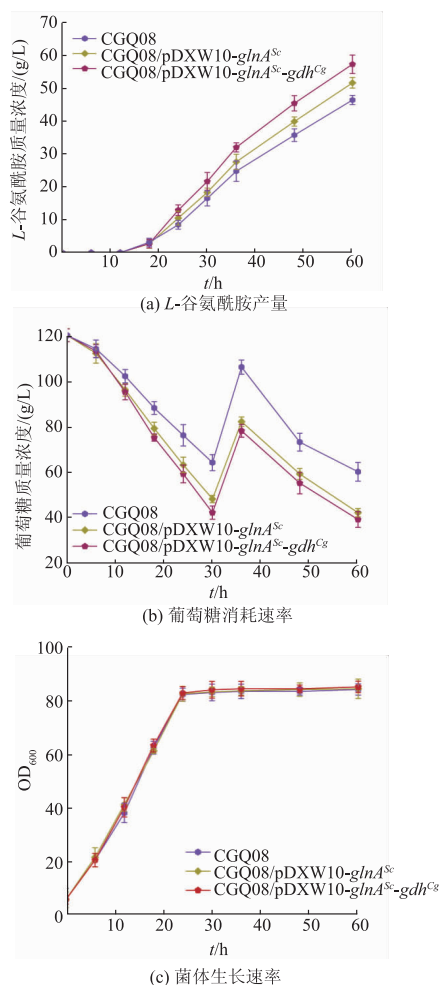
CGQ07和CGQ08菌株摇瓶发酵结果显示,CGQ08菌株菌体生长更快,L-谷氨酰胺产量为 $(46.1 \pm 1.4) \text{ g/L}$,较CGQ07菌株的 $(42.5 \pm 2.5) \text{ g/L}$ 提高了8.47%。由此可见, vgb 基因的整合表达一定程度上改善了菌体生长速率,促进了L-Gln的合成。

2.4 增强关键酶谷氨酰胺合成酶GS催化活性促进L-Gln合成

由 $glnA$ 基因编码的GS是氮素代谢的核心,是负责L-谷氨酰胺合成的关键酶,它催化L-谷氨酸与铵盐的ATP依赖性反应。作为L-谷氨酸进行L-Gln生物合成的唯一酶,GS的酶活性是决定L-谷氨酰胺产量的关键因素^[12,24-25]。作者所在实验室通过对不同来源的GS酶进行挖掘,发现酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)来源的ScGS酶活较高,过表达后进一步增强了GS酶活,促进了L-Gln的积累^[4]。因此,在CGQ08基础上,过表达酿酒酵母来源的ScGS,以期进一步提高L-Gln产量。

将携带ScGS基因的pDXW10质粒电转入CGQ08感受态细胞中,构建了过表达菌株CGQ08/pDXW10- $glnA^S$,见图7。SDS-PAGE分析和胞内GS酶活的测定结果显示,在40 000附近有条带加粗,即ScGS成功表达,且酶活为 $(165.668 \pm 3.484) \text{ U/mg}$ 。

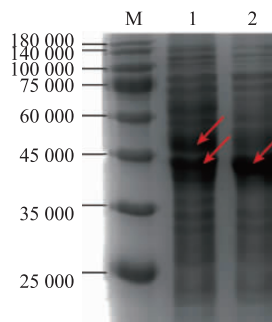
摇瓶发酵结果显示,菌株CGQ08/pDXW10- $glnA^S$ 的生长速率变缓,耗糖速度加快,发酵60 h后L-Gln的产量为 $(51.3 \pm 1.4) \text{ g/L}$,糖酸转化率为34.2%,较CGQ08分别提高了27.1%和4.5%,见图8。此结果表明,过表达酿酒酵母来源的ScGS可显著增产L-Gln。

图7 pDXW10质粒上 *glnA*^{Sc} 与 *gdh*^{Cg} 串联构建示意图Fig. 7 Schematic diagram of tandem construction of *glnA*^{Sc} and *gdh*^{Cg} on plasmid pDXW10图8 CGQ08、CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc} 和CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} 菌株的摇瓶发酵Fig. 8 Shake flask fermentation of strains CGQ08, CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc} and CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg}

2.5 ScGS 与 CgGDH 共表达促进 *L*-Gln 高效合成

将酿酒酵母来源的谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*^{Sc} 与谷氨酸棒杆菌来源的谷氨酸脱氢酶基因 *gdh*^{Cg} 利用 pDXW10 质粒进行串联表达，并转入 *E. coli* JM109 中构建重组大肠杆菌 *E. coli* JM109/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg}。测序正确后电转入 CGQ08，

获得重组菌 CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg}，SDS-PAGE 结果见图9。ScGS 与 CgGDH 分别在40 000和49 000左右条带明显加粗，成功实现了在CGQ08中的共表达。

M: 蛋白质marker; 泳道1: CGQ07/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg}菌株细胞破碎上清液; 泳道2: CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}菌株细胞破碎上清液。图9 CGQ07/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} 菌株 SDS-PAGE 分析
Fig. 9 SDS-PAGE analysis of CGQ07/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} strain

从摇瓶发酵结果来看，与菌株 CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc} 相比，菌株 CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} 细胞量无明显变化，但是耗糖速率提高，同时 *L*-Gln 的产量提高了 10.92%，达到 (56.9±2.8) g/L。以上结果表明，共表达 *glnA*^{Sc} 和 *gdh*^{Cg} 是实现 *L*-Gln 增产的有效策略。

2.6 溶氧条件优化提升 *L*-谷氨酰胺产量

作者所在实验室前期通过优化两阶段 pH 控制策略有效提高了 *L*-Gln 产量水平，5 L 发酵罐中 CGQ03/pXMJ19-R5-*glnA*^{Sc}-*ppk*^{Ec} 的 *L*-Gln 产量高达 73.5 g/L。基因组上整合溶氧相关蛋白 VHb，在一定程度上改善了菌体生长，并提高了 *L*-Gln 产量。因此，尝试在 5 L 发酵罐水平上进一步采用分阶段溶氧 (Dissolved oxygen, DO) 控制方式，联合两阶段 pH 控制策略进行 *L*-Gln 发酵，以期实现 *L*-Gln 的高效生产。

为探究 DO 控制对基因工程菌 CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg} *L*-Gln 发酵的影响，设置两组实验：①恒定转速和通气量分别为 600 r/min 和 3.5 L/min；②利用转速偶联 DO 协同手动控制通气量将发酵罐中 DO 水平维持在 20%~30%，结果见图10。实验组②比实验组①菌体浓度得到了改善，且 *L*-Gln 产量提高了 16.4%，66 h 发酵液中积累量达 (94.5±1.8) g/L，而实验组① *L*-Gln 产量为 (81.2±2.6) g/L。副产物 *L*-谷氨酸变化不大，由 14.2 g/L 变

为15.3 g/L,糖酸转化率则由35.2%变为34.8%,见图10。以上结果表明,菌株在发酵生产L-Gln时过表达溶氧相关蛋白VHb,DO维持在20%~30%即可保证较高的溶氧水平,实现菌体生长与产酸的相对平衡,促进L-Gln合成。而恒定转速和通气量无法满足发酵后期菌体对溶氧和能量的需求,从而造成菌体生长变缓、产酸能力下降。

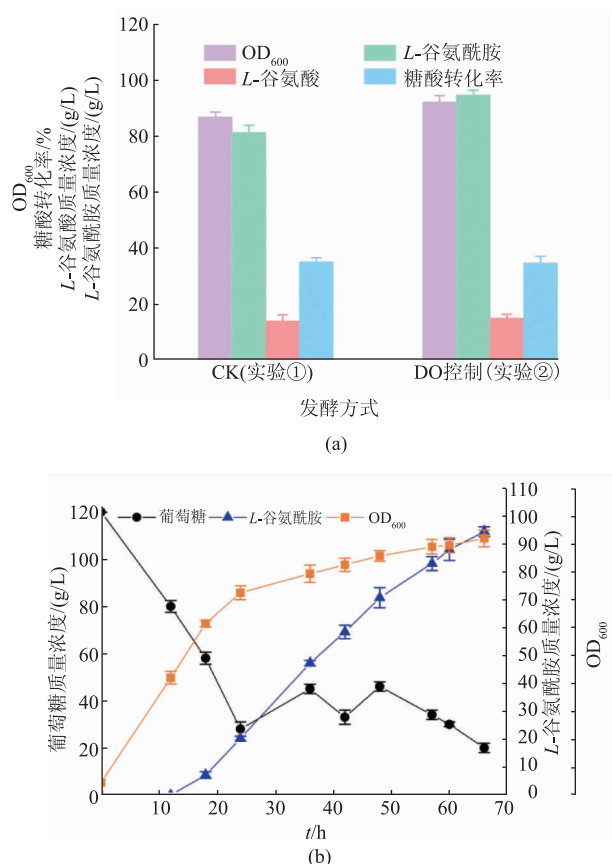


图10 溶氧控制对L-Gln发酵的影响和工程菌补料分批发酵
Fig. 10 Effect of dissolved oxygen control on L-glutamine fermentation and fed-batch fermentation by engineered strain

基因工程菌CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg}在最优的发酵工艺条件下,在5 L发酵罐上补料分批发酵66 h,L-Gln的最高产量为(94.5±1.8) g/L,糖酸转化率为34.8%,平均生产强度为1.43 g/(L·h)。

3 结语

近年来,系统生物学和合成生物学快速发展,为理性系统改造微生物代谢过程、构建高效生物合成途径提供了技术手段,有利于推动生物制造业可持续发展^[26]。基于系统代谢工程改造、合成生物学策略和发酵工艺优化等策略打造微生物高效细胞工厂的研究非常多,如Mu等通过系统代谢工程改造和发酵工艺改进,使得L-高丝氨酸发酵水平突破84 g/L^[27]。Li等通过代谢工程改造分别获得了以葡萄糖和木质素单体为底物的原儿茶酸高产菌株,PCA发酵产量分别为21.7 g/L^[28]和12.7 g/L^[29]。

我国L-Gln生产研究起步较晚,且主要集中于微生物诱变育种研究,运用系统代谢工程构建基因工程菌生产L-Gln报道较少,存在产酸低、转化率低、生产菌非食品安全级等问题。作者所在实验室前期已通过代谢工程改造结合两阶段pH控制发酵策略实现了谷氨酸棒杆菌中L-Gln的高产,产量达73.5 g/L。作者在前期研究基础上继续通过代谢工程改造强化谷氨酸脱氢酶GDH表达及辅因子NADPH供应以促进前体L-谷氨酸合成、增强辅因子ATP胞内质量摩尔浓度、过表达溶氧相关蛋白VHb提高细胞携氧能力、增强关键酶GS催化活性等策略构建获得了一株基因工程菌CGQ08/pDXW10-*glnA*^{Sc}-*gdh*^{Cg},并进行了发酵工艺优化。在最佳的发酵工艺条件下,工程菌在5 L发酵罐中补料分批发酵66 h,L-Gln的产量最高达(94.5±1.8) g/L,糖酸转化率为34.8%,生产强度为1.43 g/(L·h),为L-Gln及其相关化合物的工业化生产提供了参考。

参考文献:

- [1] ALBRECHT J, ZIELINSKA M, NORENBORG M D. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: a critical appraisal[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(9): 1303-1308.
- [2] XI P, JIANG Z, ZHENG C, et al. Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2011, 16(1): 578-597.
- [3] WU G, WU Z, DAI Z, et al. Dietary requirements of "nutritionally non-essential amino acids" by animals and humans[J]. *Amino Acids*, 2013, 44(4): 1107-1113.
- [4] 薛辉,王媛,张鸿,等. 乙酰谷酰胺注射液联合纳洛酮对急性重症酒精中毒复苏疗效及抗氧化功能的机制研究[J]. *药物生物*

- 技术, 2021, 28(2): 181-184.
- [5] 柴进凯, 张伟国. L-谷氨酰胺高产菌的选育和发酵条件[J]. 生物加工过程, 2011, 9(1): 29-34.
- [6] 解云峰. 调整菌种培养基 pH 以提高谷氨酰胺产量[J]. 工业微生物, 2020, 50(5): 60-61.
- [7] NABE K, UJIMARU T, YAMADA S, et al. Influence of nutritional conditions on production of L-glutamine by *Flavobacterium rigense*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1981, 41(1): 159-163.
- [8] BEHENSKY P, STENZL V, ADAMEK F, et al. Conversion of glutamate to glutamine by permeabilized *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Folia Microbiologica**, 1999, 44(5): 487-490.
- [9] 黄宜基, 周承文, 翟元凤. L-谷氨酰胺的化学合成[J]. 氨基酸杂志, 1985(4): 7-11.
- [10] 夏海平, 汤海达, 黄红芳. L-谷氨酰胺生产菌的选育和发酵工艺优化[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 41-43.
- [11] 白婧, 吴桐思雨, 王期, 等. 利用谷氨酸棒状杆菌高效表达枯草芽孢杆菌的谷氨酰胺合成酶发酵生产 L-谷氨酰胺[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2015, 38(2): 78-85.
- [12] LIU Q, ZHANG J, WEI X, et al. Microbial production of L-glutamate and L-glutamine by recombinant *Corynebacterium glutamicum* harboring *Vitreoscilla* hemoglobin gene vgb[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 77(6): 1297-1304.
- [13] HAYASHI M, TABATA K. Metabolic engineering for L-glutamine overproduction by using DNA gyrase mutations in *Escherichia coli*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(9): 3033-3039.
- [14] LV Q, HU M, TIAN L, et al. Enhancing L-glutamine production in *Corynebacterium glutamicum* by rational metabolic engineering combined with a two-stage pH control strategy[J]. **Bioresource Technology**, 2021, 341: 125799.
- [15] 乔郅钠, 徐美娟, 龙梦飞, 等. 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.
- [16] 满在伟. 高产 L-精氨酸钝齿棒杆菌的系统途径工程改造[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [17] XU J, RUAN H, CHEN X, et al. 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): 1-12.
- [18] WANG Q, JIANG A, TANG J, et al. Enhanced production of L-arginine by improving carbamoyl phosphate supply in metabolically engineered *Corynebacterium crenatum*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021, 105(8): 3265-3276.
- [19] SONG C W, LEE J, KO Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-aminopropionic acid[J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 30(3): 121-129.
- [20] ZHANG C, LI Y, ZHU F, et al. Metabolic engineering of an auto-regulated *Corynebacterium glutamicum* chassis for biosynthesis of 5-aminolevulinic acid[J]. **Bioresource Technology**, 2020, 318: 124064.
- [21] SHANG X, CHAI X, LU X, et al. Native promoters of *Corynebacterium glutamicum* and its application in L-lysine production[J]. **Biotechnology Letters**, 2018, 40, 383 - 391.
- [22] 宋卓琳, 黄明珠, 陈雪岚. 三磷酸腺苷供应优化促进谷氨酸棒杆菌产氨基酸的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(3): 311-316.
- [23] YOU J, YANG C, PAN X, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for enhancing riboflavin production by alleviating dissolved oxygen limitation[J]. **Bioresource Technology**, 2021, 333: 125228.
- [24] NOLSEN L, FARWICK M, KRMER R, et al. Glutamine synthetases of *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control and regulation of activity[J]. **Fems Microbiology Letters**, 2001, 201(1): 91-98.
- [25] ZUO W, NIE L, BASKARAN R, et al. Characterization and improved properties of glutamine synthetase from *Providencia vermicola* by site-directed mutagenesis[J]. **Scientific Reports**, 2018, 8(1): 15640.
- [26] 袁海波, 李江华, 刘龙, 等. 基于系统生物学和合成生物学的重要平台化学品生物制造的研究进展[J]. 化工学报, 2016, 67(1): 129-139.
- [27] MU Q, ZHANG S, MAO X, et al. Highly efficient production of L-homoserine in *Escherichia coli* by engineering a redox balance route[J]. **Metabolic Engineering**, 2021, 67: 321-329.
- [28] LI J, YE B C. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for high-yield production of protocatechuic acid[J]. **Bioresource Technology**, 2021, 319(319): 124239.
- [29] LI J, YUE C, WEI W, et al. Construction of a p-coumaric and ferulic acid auto-regulatory system in *Pseudomonas putida* KT2440 for protocatechuate production from lignin-derived aromatics[J]. **Bioresource Technology**, 2022, 344: 126221.