不同辅因子 NADPH 水平对谷氨酸棒杆菌生长及产物合成的影响

王路平[1,2]，徐建中[*1,2]，张伟国[1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：由谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）分泌的初级代谢产物赖氨酸，其合成与胞内 NADPH 水平密切相关，但目前对谷氨酸棒杆菌中赖氨酸的生物合成与辅因子 NADPH 之间调节机制的理解仍然有限。作者以赖氨酸高产菌 *C. glutamicum* XQ-5 为出发菌株，通过阻断磷酸戊糖途径构建了低 NADPH 水平的重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi*，使胞内每 1 万个细胞的 NADPH 量从 3.57×10^{-8} μmol 降低至 1.12×10^{-8} μmol。接着通过强化磷酸戊糖途径构建了高 NADPH 水平的工程菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)，使胞内每 1 万个细胞的 NADPH 量从 3.57×10^{-8} μmol 提高至 1.80×10^{-7} μmol。通过摇瓶发酵，不同 NADPH 水平下菌株的菌体生长情况、菌体量和胞内副产物积累明显不同。利用转录组学和其他实验，发现重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)中的 *panD* 基因表达水平明显提高。当 *panD* 基因被敲除后，重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)的赖氨酸质量浓度从 41 g/L 提高至 55 g/L，比出发菌 *C. glutamicum* XQ-5 提高了 14.3%。数据表明，通过过表达磷酸戊糖途径来提高 NADPH 水平导致赖氨酸水平下降的原因之一，是 *panD* 基因表达水平的提高。这为进一步探究辅因子 NADPH 对赖氨酸生物合成的调控机制提供了坚实基础。

关键词：谷氨酸棒杆菌；NADPH；L-赖氨酸；天冬氨酸-α-脱羧酶；辅因子工程

中图分类号：Q 939.97　**文章编号**：1673-1689(2021)04-0044-14　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.006

Different NADPH Levels Affected Growth and Metabolites Accumulation in *Corynebacterium glutamicum*

WANG Luping[1,2]，*XU Jianzhong*[*1,2]，*ZHANG Weiguo*[1,2]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lysine, as a primary metabolite, is normally produced by *Corynebacterium glutamicum*, and its synthesis is closely related to intracellular NADPH levels. However, the regulatory mechanisms between L-lysine biosynthesis and the cofactor NADPH in *C. glutamicum* are still

收稿日期：2019-11-30

基金项目：国家自然科学基金项目(31601459)；国家轻工业技术与工程一流学科计划项目(授权号 LITE2018-07)；江苏省高等学校学术计划项目和江苏省科技支撑计划项目(BE2018316)。

* **通信作者**：徐建中(1984—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事应用微生物代谢工程及合成生物学技术研究。E-mail：xujianzhong@jiangnan.edu.cn

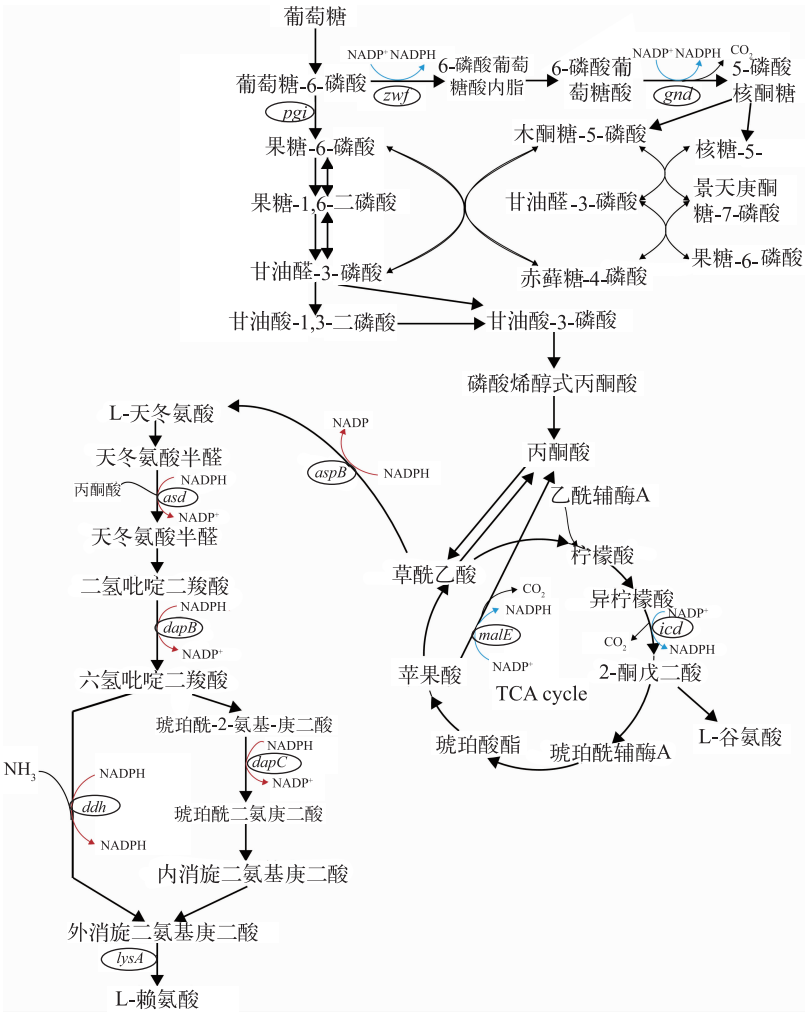
poorly understood. In this paper, the lysine-producing strain *C. glutamicum* XQ-5 was used as the starting strain, and the recombinant strain *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf::pgi* with low NADPH levels was constructed by blocking the pentose phosphate pathway, reducing the intracellular NADPH level in each 10^4 cells from 3.57×10^{-8} μmol to 1.12×10^{-8} μmol. In addition, the recombinant strain *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi::(zwf–gnd)* with high NADPH level was constructed by enhancing the pentose phosphate pathway. It increased the intracellular NADPH level in each 10^4 cells from 3.57×10^{-8} μmol to 1.8×10^{-7} μmol. Cell growth, bacterial mass and intracellular by-product accumulation of strains under different NADPH levels were significantly different through shake-flask fermentation. Based on the results of transcriptomics and other experiments, the expression level of the *panD* gene in the recombinant strain *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi::(zwf–gnd)* was significantly increased. The lysine production of recombinant strain *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi::(zwf–gnd)* with inactivated *panD* gene increased to 55 g/L, an increase of 14.3% to the original strain *C. glutamicum* XQ-5, which suggested that the increased expression level of *panD* gene was one of the reasons for the decline in lysine levels based on the over-expression of pentose phosphate pathway. This study provides a solid theoretical basis for further studies on the regulation mechanism of cofactor NADPH on L-lysine biosynthesis.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, NADPH, L-lysine, aspartate-α-decarboxylase, cofactor engineering

L–赖氨酸是人类和动物所必需的、自身不能合成的八大必需氨基酸之一。研究报道，自赖氨酸发酵开始以来，谷氨酸棒状杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）及其亚种是发酵赖氨酸的主要选择，但最近大肠杆菌（*Escherichia coli*）也在赖氨酸发酵过程中发挥着重要作用[1-3]。以葡萄糖为原料时，*C. glutamicum* 中有 5 个途径参与 L–赖氨酸合成：糖酵解途径、磷酸戊糖途径（PPP）、三羧酸（TCA）循环、补给途径（CO_2 固定反应）和 L–赖氨酸终端合成途径（图 1）。20 世纪 80 年代末和 90 年代，开发了用于该微生物的各种基因工程工具，并将这些分子技术应用于菌株改良，旨在增强赖氨酸生产能力[4-5]。这使得理论代谢工程不仅可以用于赖氨酸生物合成途径，而且可用于中枢代谢，从而，增加前体供应和 NADPH 再生成为研究者用于增强赖氨酸生物合成的着力点。

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）是细胞代谢中最重要的氧化还原载体，不仅作为催化底物分解代谢的电子受体，也为能量依赖型的氧化还原反应提供还原力[6]，是多种代谢产物合成中的主要驱动力。其影响的代谢产物包括赖氨酸[7]、缬氨酸[8]、精氨酸[9]、鸟氨酸[10]、氯丙酸酯[11]、番茄红素[11]和萜类化合物[12]。已有文献报道，在 *C. glutamicum* 中每合成 1 mol L–赖氨酸需要消耗 4 mol 的 NADPH[13]。因此，为了增加 *C. glutamicum* 生物合成途径中 L–赖氨酸的积累，提高 *C. glutamicum* 代谢途径中 NADPH 量或降低 L–赖氨酸合成途径中 NADPH 需求量是辅因子工程育种常用的策略。然而，作者前期研究发现，胞内过量的 NADPH 会阻碍细胞对糖的利用，降低菌体生长量和 L–赖氨酸积累量。虽然有文献指出，控制胞内辅因子平衡是维持细胞正常代谢的一项基本需求[14]，但辅因子 NADPH 是如何调控细胞内代谢水平，进而影响产物合成的机制还不清晰。

为了在辅因子层面上深入调控碳代谢流，实现对目标碳代谢流的高效调节，有学者提出了辅因子工程，即采用分子生物学的手段，改造细胞内辅因子的再生途径，调控微生物细胞内辅因子的形式和浓度，定向改变和优化微生物细胞代谢功能，实现代谢流最大化、快速化地导向目标代谢产物[15]。Hou 等通过在 *S. cerevisiae* 中分别表达 NOX、AOX1、POS5、UdhA 和 PntAB，分析 NADH/NAD^+、NADPH/$NADP^+$和 ATP/ADP 的变化范围对发酵动力学参数



蓝色线条和字体为NADPH 的合成途径,红色线条和字体为 NADPH 消耗途径。

图 1　谷氨酸棒杆菌中 L–赖氨酸和 NADPH 合成代谢网络示意图

Fig. 1　Metabolic pathways of L–lysine and NADPH in *C. glutamicum*

的影响,研究初步建立了辅因子变化与碳流分布的关联[16]。Bera 等为了改善木糖发酵,通过表达 NADP⁺依赖型的甘油醛–3–磷酸脱氢酶,有效增加了 NADPH 通道,创造了一个更加良好的辅因子平衡[17]。Ohnishi 等通过使 6–磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因(*gnd*)中 361 位碱基发生突变,从而减轻了 6–磷酸葡萄糖酸脱氢酶的变构调节,并导致通过磷酸戊糖途径的碳通量增加了 8%,此策略明显有助于增加 NADPH 的供应[18]。需要指出的是,谷氨酸棒杆菌中磷酸戊糖途径是辅因子 NADPH 主要合成途径[13,19-20]。作者通过过表达 *gnd* 基因、*zwf* 基因同时敲除 *pgi* 基因,来强化 PPP 途径、阻断糖酵解途径,以达到增加通过 PPP 途径的碳通量从而提高 NADPH 含量的目的,以此来初步解析赖氨酸合成与 NADPH 之间的关联及代谢调控机制。

本研究的目的是详细解析谷氨酸棒杆菌中赖氨酸与 NADPH 水平之间的关联及其代谢调控机制。在这项工作中,以赖氨酸高产菌 *C. glutamicum* XQ–5 作为出发菌株,通过基因工程手段分别构建出一种高 NADPH 水平菌株 *C. glutamicum* XQ–5Δ*pgi*::(*zwf*–*gnd*) 和一种低 NADPH 水平菌株 *C. glutamicum* XQ–5Δ*zwf*::*pgi*,并比较分析其与出发菌胞内微环境的差异。通过出发菌与工程菌之间的转录组数据分析,重组菌 *C. glutamicum* XQ–5Δ*pgi*::(*zwf*–*gnd*) 中编码天冬氨酸–α–脱羧酶的 *panD* 基因表达水平提高,且被证实为重组菌 *C. glutamicum* XQ–5Δ*pgi*::(*zwf*–*gnd*)赖氨酸产量反而降低的原因之一。这些数据为通过改变胞内

NADPH 水平来探究其对 L-赖氨酸合成的调节机制的可行性提供了有力依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究中使用的菌株和质粒列于表 1，使用的引物序列列于表 2。

1.2 培养基和生长条件

Luria-Bertani(LB)培养基(g/L)：蛋白胨 10，酵母提取物 5，NaCl 10；pH 7.0。LB 培养基用于培养 *E. coli* JM109 细菌，并在旋转振荡器上以 100 r/min 在 37 ℃下进行基因克隆。

LB-葡萄糖(LBG)培养基(g/L)：葡萄糖 5，蛋白胨 10，酵母提取物 5，NaCl 10；pH 7.0。在 LBG 培养

表 1 本研究中用到的菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	相关特性	来源
菌株		
E. coli BL21(DE3)	–	作者所在实验室保藏
C. glutamicum ATCC13032	野生菌	ATCC
C. glutamicum XQ-5	赖氨酸高产菌	Xu et al. (2014)
C. glutamicum XQ-5Δ*pgi*::(*zwf*-*gnd*)	*C. glutamicum* XQ-5 染色体上敲除 *pgi* 基因而过表达 *zwf* 和 *gnd* 基因	本文作者构建
C. glutamicum XQ-5Δ*zwf*::*pgi*	*C. glutamicum* XQ-5 染色体上敲除 *zwf* 基因而过表达 *pgi* 基因	本文作者构建
质粒		
pDXW-8	具有 Amp^r 和 Km^r 抗性的 *E. coli* - *C. glutamicum* 穿梭质粒	Xu et al. (2010)
pDXW-8-*pgi*	pDXW-8 携带 *pgi* 基因	本文作者构建
pDXW-8-*zwf*	pDXW-8 携带 *zwf* 基因	本文作者构建
pDXW-8-*zwf*-*gnd*	pDXW-8-*zwf* 携带 *gnd* 基因	本文作者构建
pK18mobsacB	穿梭质粒	Schäfer et al. (1994)
pK18mobsacB-Δ*pgi*	pK18mobsacB 携带 *pgi*-L 和 *pgi*-R 同源臂	本文作者构建
pK18mobsacB-Δ*pgi*::(*zwf*-*gnd*)	pK18mobsacB 携带 *pgi*-L，*pgi*-R 同源臂和 *Ptac*-*zwf*-*gnd*-*rrnBT1T2* 表达框	本文作者构建
pK18mobsacB-Δ*zwf*	pK18mobsacB 携带 *zwf*-L 和 *zwf*-R 同源臂	本文作者构建
pK18mobsacB-Δ*zwf*::*pgi*	pK18mobsacB 携带 *zwf*-L，*zwf*-R 同源臂和 *Ptac*-*pgi*-*rrnBT1T2* 表达框	本文作者构建
pK18mobsacB-Δ*panD*	pK18mobsacB 携带 *panD*-L 和 *panD*-R 同源臂	本文作者构建

表 2 本研究中用到的引物序列

Table 2 Primers used in this study

引物	引物序列(5′-3′)	酶切位点	目的
gnd-F	CGGAATTCGAAAGGAGATATACCATGCCGTCAAGTATCAAT	*Eco*R I	扩增 *gnd* 基因
gnd-R	CCGCTCGAGTTAAGCTTGAACCTCGGAGCG	*Xho* I	
zwf-F	CCGCTCGAGGAAAGGAGATATACCGTGAGCACAAACACGACCCCCTC	*Xho* I	扩增 *zwf* 基因
zwf-R	CCCAAGCTTTTATGGCCTGCGCCAGGTGTG	*Hind* III	
pgi-F	CCGCTCGAGGAAAGGAGATATACCATGGCGGACATTTCGACCACCCAG	*Xho* I	扩增 *pgi* 基因
pgi-R	CCCAAGCTTCTACCTATTTGCGCGGTACCAC	*Hind* III	
zwf-L-F	CGGGATCCTGAGGCTTTGGCTCTGCGCG	*Bam*H I	扩增 *zwf* 基因上游同源臂，*zwf*-L
zwf-L-R	GCTCTAGAGCTGTGAAGGAATCTGGTG	*Xba* I	
zwf-R-F	GCTCTAGATTGGTCGCCGTGTTACTGAG	*Xba* I	扩增 *zwf* 基因下游同源臂，*zwf*-R
zwf-R-R	CCCAAGCTTGGGTGATCCAATGAGGAGG	*Hind* III	
pgi-L-F	CGGGATCCGCCAAAGACCTCGCCAACG	*Bam*H I	扩增 *pgi* 基因上游同源臂，*pgi*-L
pgi-L-R	GCTCTAGAAAGTCACGCATGCGTC	*Xba* I	

续表 2

引物	引物序列(5′-3′)	酶切位点	目的
pgi-R-F	GCTCTAGAGCAGGATCTTCCTGCCGGTG	*Xba* I	扩增 *pgi* 基因下游同源臂，*pgi*-R
pgi-R-R	CCCAAGCTTGGCGCCGCAACAACCCTG	*Hind* III	
PtacP-F	GCTCTAGACATCATAACGGTTCTGG	*Xba* I	扩增 *Ptac-pgi-rrnBT1T2* 表达框
PtacP-R	GCTCTAGAACCATCGGCGCTACGG		
PtacZG-F	CCCAAGCTTCATCATAACGGTTCTGG	*Xba* I	扩增 *Ptac-zwf-gnd-rrnBT1T2* 表达框
PtacZG-R	GCTCTAGAACCATCGGCGCTACGG		
panD-L-F	GCTCTAGAGGATCCTTCATTCCGGTGAACAC	*Hind* III	扩增 *panD* 基因上游同源臂，*panD*-L
panD-L-R	GCTCTAGAAGACATCACCCATGAGCTACCTTCAGG	*Xba* I	
panD-R-F	GCTCTAGATAGCTCATGGGTGATGTCTACGATGGC	*Xba* I	扩增 *panD* 基因下游同源臂，*panD*-R
panD-R-R	CGGAATTCACTCTAGAAAGCATCAACATCGGC	*Eco*R I	

基中，30 ℃、100 r/min 的条件下培养谷氨酸棒杆菌。

EPO 培养基(g/L)：葡萄糖 5，蛋白胨 10，酵母提取物 5，NaCl 10，吐温-80 1；pH 7.0。在 121 ℃下湿加热灭菌 20 min，过滤除菌后，向培养基中加入 4 g 异烟肼和 30 g 甘氨酸。

LB-脑心浸液-山梨糖醇(LBHIS)培养基(g/L)：蛋白胨 5，酵母提取物 2.5，NaCl 10，脑心浸液 18.5，山梨醇 91；pH 7.0。

CGXII 培养基 (g/L)：$(NH_4)_2SO_4$ 36，尿素 5，KH_2PO_4 1，K_2HPO_4 1，$MgSO_4·7H_2O$ 0.25，3-(*N*-吗啡啉)-丙磺酸 42，$CaCl_2$ 0.010，$FeSO_4$ 0.01，$MnSO_4$ 0.01，$ZnSO_4$ 0.01，$CuSO_4$ 0.000 2，$NiCl_2$ 0.000 02，生物素 0.000 2，原儿茶酸 0.000 03；115 ℃灭菌 10 min，用于 L-赖氨酸发酵。

发酵培养基 (g/L)：葡萄糖 40，$(NH_4)_2SO_4$ 36，$MgSO_4·7H_2O$ 1.5，$FeSO_4$ 0.02，$MnSO_4$ 0.02，KH_2PO_4 1，K_2HPO_4 1，玉米浆 35，甜菜糖蜜 12，烟酰胺 0.008，甜菜碱 0.05，硫胺素 0.000 45，生物素 0.000 85，$CaCO_3$ 40；pH 7.0，115 ℃灭菌 10 min。5 mL 种子液转接到装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 的摇瓶中，30 ℃、100 r/min 发酵 40 h。

1.3 质粒和菌株构建

用限制性核酸内切酶 (Takara 公司) 和 DNA Ligase Kit Ver 2.0 (Takara 公司) 构建质粒 pK18mobsacB-*Δzwf*::*pgi* 和 pK18mobsacB-*Δpgi*::(*zwf-gnd*)，然后将质粒转化到 *C. glutamicum* XQ-5 中[21]。制备 *C. glutamicum* XQ-5 的感受态菌株，质粒 pK18mobsacB-*Δzwf*::*pgi* 和 pK18mobsacB-*Δpgi*::(*zwf-gnd*) 分别用电穿孔导入 *C. glutamicum* XQ-5 中，分别得到 *C. glutamicum* XQ-5/pK18mobsacB-*Δzwf*::*pgi* 和 *C. glutamicum* XQ-5/pK18mobsacB-*Δpgi*::(*zwf-gnd*)。重组菌株 *C. glutamicum XQ-5Δzwf*::*pgi* 和 *C. glutamicum* XQ-5*Δpgi*::(*zwf-gnd*) 通过基因组整合获得[22]。将敲除质粒 pK18mobsacB-*ΔA*::*B* 电穿孔到谷氨酸棒杆菌的感受态细胞中，并使用谷氨酸棒杆菌的双交换同源重组策略，通过两个菌株筛选重组菌株。

1.4 胞内辅酶 II NADP(H)的测定

收集 400 万~500 万细菌，加入 0.9 mL 酸性(碱性)提取液，超声破碎 1 min(200 W，超声 2 s，停 1 s)，盖紧后煮沸 5 min，冰浴中冷却后，10 000 *g*、4 ℃离心 10 min，取上清液 200 μL 至另一新的离心管中，加入等体积的碱性(酸性)提取液使之中和，10 000 *g*、4 ℃离心 10 min，取上清液。随后，以试剂盒 NADP/NADPH Quantification Colorimeteric Kit 特异性检测 $NADP^+$和 NADPH，并计算 NADPH/$NADP^+$[23]。

1.5 胞内辅酶 I NAD(H)的测定

收集 400 万~500 万细菌，加入 0.5 mL 酸性(碱性)提取液，超声破碎 1 min(200 W，超声 2 s，停 1 s)，盖紧后煮沸 5 min，冰浴中冷却后，10 000 *g*、4 ℃离心 10 min，取上清液 200 μL 至另一新的离心管中，加入等体积的碱性(酸性)提取液使之中和，10 000 *g*、4 ℃离心 10 min，取上清液。随后，以试剂盒 NAD/NADH Quantification Colorimeteric Kit 特异性检测 NAD^+和 NADH，并计算 NADH/NAD^+[23]。

1.6 胞内 ATP、ADP、AMP 的测定

利用 0.6 mol/L $HClO_4$(PCA)抽提重组菌 *C. glutamicum* XQ-5*Δpgi*::(*zwf-gnd*)，*C. glutamicum* XQ-5*Δzwf*::*pgi* 和出发菌 *C. glutamicum* XQ-5 胞内 ATP、ADP 和 AMP。随后，采用 HPLC 技术对抽提液

进行分析，测定胞内 ATP、ADP 和 AMP 的浓度。将 50 mL 细胞样品从培养物中取出，立即在液氮中冷冻 60 s，并储存在−20 ℃。通过 HPLC 检测细胞内 ATP 的浓度。为了提取 ATP，将 10 mL 的 0.6 mol/L $HClO_4$ 加入到细胞沉淀中并混合，用磁力搅拌器彻底搅拌 10 min。将混合物以 10 000 *g* 离心 10 min 以收集上清液。将另外 10 mL 的 0.6 mol/L $HClO_4$ 加入到沉淀中，充分混合 10 min，离心后收集上清液。将两部分上清液在 25 mL 容量瓶中混合，并用 0.6 mol/L $HClO_4$ 补足至 25 mL。取 10 mL 所制备的溶液，并用 0.8 mol/L KOH 将 pH 值调节至 7.0。在 4 ℃保持 30 min 后，通过过滤除去晶体 $KClO_4$（滤纸孔径=0.22 μm），然后在应用 HPLC 柱之前，用磷酸盐缓冲液（pH 7.0）稀释至 25 mL。HPLC 分析的进样量为 10 μL。使用体积分数 80% 10 mmol/L KH_2PO_4（pH 7.0）和体积分数 20%甲醇的混合物作为流动相，流速为 1.2 mL/min。紫外检测器的波长设置为 260 nm，柱温控制在 25 ℃[24]。

1.7 通过 RNA-seq 进行转录组分析

从新划线的琼脂平板上挑取单个菌落的谷氨酸棒杆菌原始菌株（*C. glutamicum* XQ-5）或重组菌株（*C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf*-*gnd*) 和 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi*），并接种到 LBG 培养基中。在 30 ℃过夜培养 12~16 h 后，分别收获细胞，洗涤并转移至标准 CGXII 基本培养基，初始 $OD_{600\ nm}$ 为 0.1。在 RNA 提取之前，将培养物在 30 ℃下再温育 12 h。将 10 mL 收集的细胞在液氮中快速冷冻，用 RNAprep 纯试剂盒（TIANGEN）处理以提取总细菌 RNA，并在干冰环境递送至 GENEWIZ 公司进行转录组测序分析（https://www.genewiz.com/）。对于注释，使用谷氨酸棒杆菌 ATCC13032（NC_003450.3）的基因组作为参考。通过使用错误发现率（FDR）≤0.05 和倍数变化 log_2Ratio 标准，测定样品 *C. glutamicum* XQ-5 与重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δpgi::(zwf-gnd) 和 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 之间的差异表达基因。

1.8 生长曲线测定

将来自新鲜划线的琼脂平板上的菌株 *C. glutamicum* XQ-5，*C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf*-*gnd*) 和 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 的单个菌落转移至液体 LBG 培养基中，并在 30 ℃下温育 16 h。在生长实验之前以 200 r/min 摇动。收获培养物，洗涤并重新悬浮在新鲜的指定培养基中至初始 $OD_{600\ nm}$ 为 0.1。然后通过在指定的时间点测量 600 nm 处的光密度来监测细胞生长，并显示为至少 3 次独立重复的平均值。

1.9 摇瓶发酵

将谷氨酸棒杆菌单菌落接种到 LBG 液体培养基中。将细菌在 30 ℃、100 r/min 的摇床中培养约 10 h。用不含碳源的 CGXII 培养基洗涤最终悬浮液 3 次。将悬浮液接种到 60 mL CGXIIG（CGXII 培养基中加入 40 g/L 葡萄糖）液体培养基中。在 500 mL 三角烧瓶中，于 30 ℃、100 r/min 的振荡器中培养 48 h。每 4 h 测量 $OD_{600\ nm}$ 和 L-赖氨酸的浓度。

1.10 统计分析

各实验至少独立进行 3 次，数据表示为平均值和标准偏差（SD）。为了比较实验组数据之间的统计差异，使用了学生 *t* 检验。

2 结 果

2.1 重组菌和出发菌胞内腺嘌呤核苷酸（ATP、ADP 和 AMP）、吡啶核苷酸（NAD^+、NADH、$NADP^+$ 和 NADPH）的变化

使用赖氨酸生产菌株 *C. glutamicum* XQ-5 作为出发菌株，利用基因敲除和替换策略，作者分别用将 *pgi* 基因敲除替换为 *Ptac-pgi-rrnBT1T2* 表达框以强化磷酸戊糖途径和将 *zwf* 基因敲除替换为 *Ptac-pgi-rrnBT1T2* 表达框以阻断磷酸戊糖途径的方式成功地构建了重组菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf*-*gnd*) 和 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi*。为了确定出发菌株 *C. glutamicum* XQ-5 经过改造后是否胞内 NADPH 水平有所改变，对出发菌株和重组菌株进行摇瓶发酵 48 h，然后对其胞内进行吡啶核苷酸含量测定，具体数据见表 3-4。

从表 3 可知，重组菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf*-*gnd*) 胞内 NADPH 水平从起始菌株的每 1 万个细胞含 3.57×10^{-8} μmol 提高到 1.80×10^{-7} μmol，胞内 NADPH/$NADP^+$ 提高了 109.9%；胞内 NADH 略低于出发菌株，这是由于糖酵解途径的阻断，碳流量经过磷酸戊糖途径，导致 NADH 的合成量减少。重组菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 胞内 NADPH 水平从起始菌株的每 1 万个细胞含 3.57×10^{-8} μmol 下降到 1.12×10^{-8} μmol，胞内 NADPH/$NADP^+$ 降低了 28.8%。谷氨酸棒杆菌胞

表 3 重组菌和出发菌胞内每 1 万个细胞的吡啶核苷酸(NAD⁺、NADH、NADP⁺和 NADPH)含量

Table 3 Contents of intracellular pyridine nucleotides(NAD⁺,NADH,NADP⁺ and NADPH) in each 10^4 cells of recombinant and original bacteria

单位:μmol

C. glutamicum	NADPH	NADP⁺	NADPH/NADP⁺	NADH	NAD⁺	NADH/NAD⁺
XQ-5 Δ*zwf*::*pgi*	1.12×10^{-8}	1.42×10^{-8}	0.79	2.62×10^{-7}	5.28×10^{-7}	0.49
XQ-5	3.57×10^{-8}	3.26×10^{-8}	1.11	1.81×10^{-7}	7.04×10^{-7}	0.26
XQ-5 Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)	1.80×10^{-7}	7.74×10^{-8}	2.33	1.41×10^{-7}	8.15×10^{-7}	0.17

内存在多种 NADPH 合成代谢途径，而其胞内的 NADPH 主要是通过 PPP 途径合成[13,19-20],阻断该途径大大降低了 NADPH 的合成量。同时胞内 NADH 略高于出发菌株,这是糖酵解途径加强的结果。与此同时，由于胞内 NADPH 水平的降低,NAD(H)/NADP(H)的氧化平衡被打破,部分 NADH 在 NAD 激酶的作用下合成 NADPH[13,25-26]。

从表 4 可知，重组菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 胞内 ATP 比出发菌株提高了 29.7%，而重组菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 胞内 ATP 含量提高了 111.2%。这是由于 NADH、NADPH 与 ATP 合成具有密不可分的联系,但 NADPH 几乎仅用于还原性生物合成，用作氢和电子的供体,而 NADH 则主要用于产生 ATP,为氧化形成 ATP 的电子传递链提供电子，从而使胞内的 ADP 和 AMP 转换成 ATP[27]。因此,NADH 和 NADPH 含量的变化直接影响 ATP 的合成,从而关系着胞内腺嘌呤核苷酸的平衡。

表 4 重组菌和出发菌胞内腺嘌呤核苷酸 (ATP、ADP 和 AMP)含量

Table 4 Contents of intracellular adenine nucleotides (ATP,ADP and AMP) in recombinant and original bacteria

单位:mmol/L

C. glutamicum	ATP	ADP	AMP
XQ-5Δ*zwf*::*pgi*	3.41	1.48	0.64
XQ-5	1.61	1.08	0.49
XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)	2.09	1.26	0.56

2.2 重组菌与出发菌的生长参数比较

尽管重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)的细胞内 NADPH 水平增加,但由于糖酵解途径的阻断，在以葡萄糖为单一碳源的 CGXIIG 发酵培养基(葡萄糖的初始质量浓度为 40 g/L)中,重组菌的生长被延缓，但最终菌体量与出发菌相似,见图 2(a),并且发酵结束的赖氨酸产量 15 g/L 低于发酵结束后出发菌株的赖氨酸产量 17 g/L,见图 4(a)。当发酵培养基富含营养(葡萄糖的初始质量浓度为 100 g/L)时,重组菌的生长与起始菌株的生长相似,见图 2 (b)，但发酵结束后重组菌株的赖氨酸产量 41 g/L 仍然低于发酵后起始菌株的赖氨酸产量 49 g/L,见图 4(b)。

重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 的细胞内是阻断了 PPP 途径，强化了糖酵解途径。其在 CGXIIG 发酵培养基中时，发酵 16 h 之前生长速率高于出发菌株,发酵 16 h 之后生长速率开始下降并低于出发菌株，最终在发酵 32 h 后进入平缓期,最终 $OD_{600\,nm}$ 为 17,远远低于出发菌株,见图 2(a)。并且其葡萄糖消耗有 10 g/L 的剩余,见图 3(a)。其发酵结束后的赖氨酸产量 3 g/L 远低于出发菌株的 17 g/L,见图 4(a)。发酵 16 h,其生长速率高于出发菌株可能是糖酵解途径的加强引起的，生长前期 NADPH 的匮乏暂时由 NADH 转化的 NADPH 弥补[13],维持细胞生长。NADPH 是细胞生长与代谢的重要辅因子之一，由于 NADPH 主要合成途径 PPP 的阻断和 NADPH 的不断消耗,发酵 16 h 以后细胞生长速率逐渐降低。这一现象进一步表明了 NADPH 影响菌体生长速率和菌体量。发酵结束后,葡萄糖的剩余和赖氨酸产量的减少说明了 NADPH 对于细胞的糖代谢和赖氨酸合成至关重要。在富含营养的发酵培养基中时，重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 与出发菌株的生长情况相似，见图 2(b),发酵结束后仍有 3 g/L 的残糖,见图 3(b),且赖氨酸产量为 28 g/L,见图 4(b)。

2.3 不同 NADPH 水平的菌株内胞内副产物合成的比较

NADPH 是代谢网络中的关键辅助因子之一,在氨基酸生产菌株的生化反应和生理功能中起重要作用。为了进一步研究胞内不同 NADPH 水平对发酵副产物(如有机酸和其他氨基酸)的影响,在发酵结束后测定发酵液中有机酸和副产物氨基酸含量。

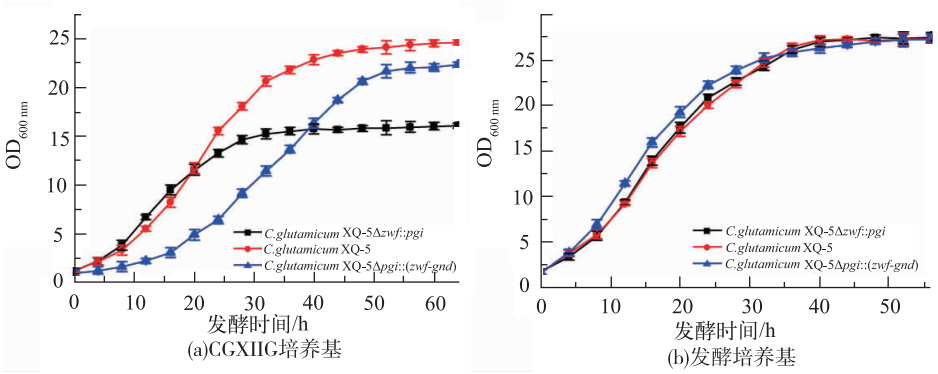


图 2　重组菌与出发菌在 CGXIIG 培养基和发酵培养基的生长情况

Fig. 2　Growth of recombinant strain and original strain in CGXIIG medium and fermentation medium

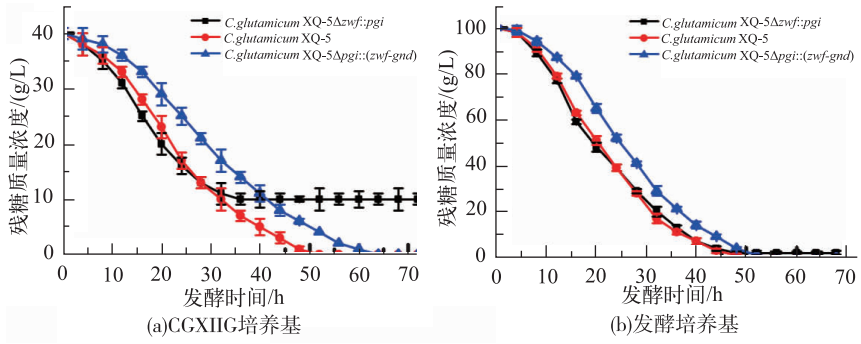


图 3　重组菌与出发菌在 CGXIIG 培养基和发酵培养基的葡萄糖消耗情况

Fig. 3　Glucose consumption of recombinant strain and original strain in CGXIIG medium and fermentation medium

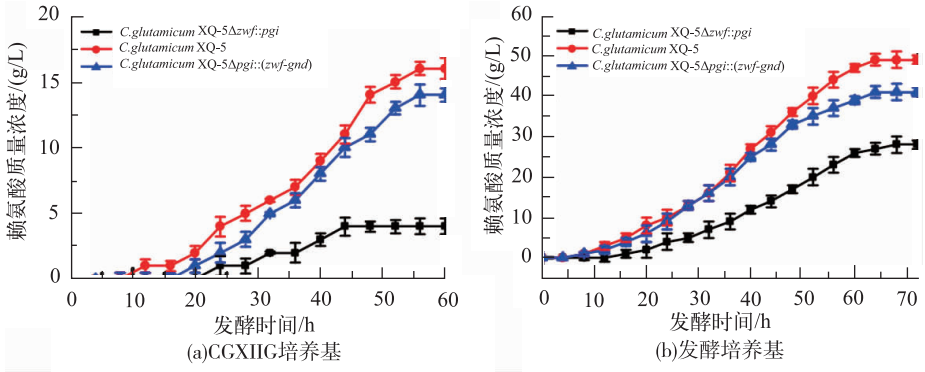


图 4　重组菌与出发菌在 CGXIIG 培养基和发酵培养基的赖氨酸合成情况

Fig. 4　Lysine synthesis of recombinant strain and original strain in CGXIIG medium and fermentation medium

由表 5 可知,阻断糖酵解途径、强化 PPP 途径后,与出发菌株 *C. glutamicum* XQ-5 相比,重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)发酵液中副产物氨基酸明显增加:缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸分别增加了 27.6%、55.3%、27.5%、19.5%、26.2%。而发酵液中的丙酮酸和乳酸含量与出发菌相比,分别减少了 24.5%和 65.7%。重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 发酵液中的副产物氨基酸含量明显降低:缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸分别降低了 37.1%、55.3%、73.5%、50.3%、52.7%。而发酵液中的丙酮酸和乳酸含量与出发菌相比,分别增加了 51.1%和 5.1%。NADPH 是多种代谢产物合成的驱动力,尤其是氨基酸。多项研究表明,提高胞内 NADPH 水平可以增强多种氨基酸的合成,如赖氨酸[7]、谷氨酸[28]、苏氨酸[28]、亮氨酸[28]、异亮氨酸[28]、缬氨酸[8]、精氨酸[10]和鸟氨酸[9]等。

表 5　重组菌和出发菌发酵液中副产物氨基酸和有机酸含量

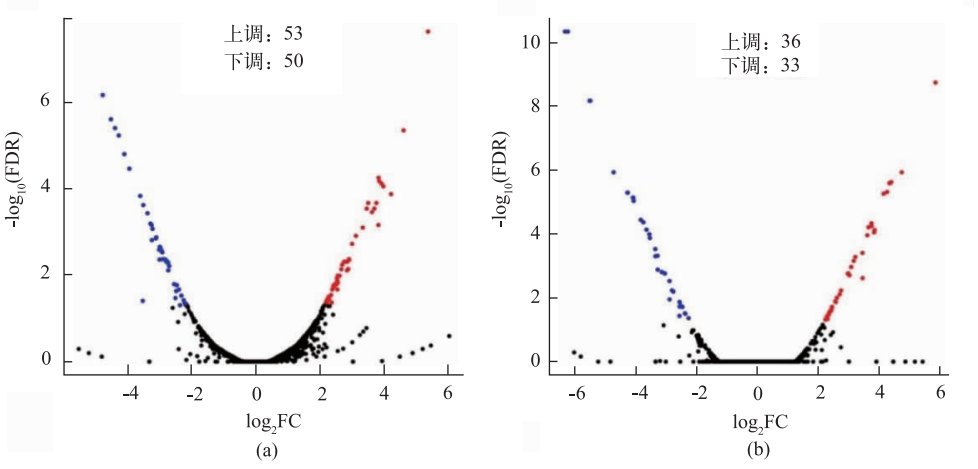
Table 5　Concentration of amino acid and organic acid in fermentation of recombinant and original bacteria

菌种	副产物产量/(g/L)						
	Pyruvate	L-lactic acid	L-proline	L-leucine	L-isoleucine	L-threonine	L-glutamate
C. glutamicum XQ-5 Δ*zwf*::*pgi*	6.06±0.16	3.71±0.09	1.98±0.07	0.51±0.04	0.26±0.09	0.97±0.03	1.12±0.02
C. glutamicum XQ-5	4.01±0.11	3.53±0.17	3.19±0.02	1.14±0.06	0.98±0.02	1.95±0.03	2.37±0.05
C. glutamicum XQ-5 Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)	3.91±0.12	1.12±0.19	4.07±0.03	1.77±0.02	1.25±0.02	2.33±0.04	2.99±0.03

所以胞内 NADPH 水平的变化也会引起胞内相应副产物氨基酸发生相应改变。同样,胞内 NADPH 的变化对胞内丙酮酸和乳酸也会产生相应影响。且由于胞内 NADPH 水平改变，胞内以 NADPH 为辅酶的氨基酸，如以丙酮酸为前体合成的丙氨酸族氨基酸,和经过丙酮酸流向三羧酸循环后以草酰乙酸为前体合成的天冬氨酸族氨基酸,其合成会发生相应变化,使得丙酮酸等代谢途径上游的中间产物得以累积或减少。

2.4　重组菌株和原始菌株的转录组分析比较

为了进一步揭示不同 NADPH 水平的出发菌 *C. glutamicum* XQ-5 和重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 以及出发菌 *C. glutamicum* XQ-5 和重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 在转录组水平上的差异,收集在摇瓶发酵了 12 小时的样品,并进行 RNA-Seq 分析以评估重组菌与原始菌株 *C. glutamicum* XQ-5 之间的基因表达差异。发现重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)中 103 个基因的表达水平与原始菌相比有明显差异,包括 53 个上调基因和 50 个下调基因,见图 5(a)。其中重组菌株构建的相关基因显示出相应的表达差异,包括基因 *zwf* ($\log_2$FC =5.386,FDR =0.000 01),*gnd* ($\log_2$FC =2.432,FDR =0.000 41) 和 *panD* ($\log_2$FC = 2.808,FDR=0.000 01)，表达水平分别上调了 41.5 倍,5.5 倍和 7.1 倍,而基因 *pgi*($\log_2$FC=-2.96,FDR = 0.002 3)表达水平下降了 87.2%。基于 KEGG 途径富集分析，这些基因被归类至 7 个主要细胞过程(见表 6),即 ATP 结合盒(ABC 家族蛋白)转运系统、磷酸戊糖途径、丙酮酸代谢、谷胱甘肽代谢、碳代谢、氨基酸代谢和 β-丙氨酸代谢。同时发现重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 中 69 个基因的表达水平与原始菌相比有明显差异，包括 36 个上调基因和 33 个下调基因,见图 5(b)。其中重组菌株构建的相关基因显示出相应的表达差异，包括基因 *pgi*($\log_2$FC=3.96,FDR =0.000 013)表达水平上调了 15.7 倍,而基因 *zwf*($\log_2$FC=-2.556,FDR=0.000 23)表达水平下调了 83.1%。基于 KEGG 途径富集分析,这些基因被归类至 6 个主要细胞过程(见表 6),



红色点(上调)和蓝色点(下调)表示差异显着的基因。X 轴表示差异表达倍数的 $\log_2$ 变换值,Y 轴表示错误发现率的 $-\log_{10}$ 变换值。

图 5　差异表达基因的火山图

Fig 5　Volcano plot of differentially expressed genes

表 6　重组菌和出发菌株之间 RNA–seq 数据的差异基因表达分析

Table 6　Differential gene expression analysis of RNA–seq data between the recombinant and original strain

基因 ID	基因名称	注解	$\log_2$FC	q 值
C. glutamicum XQ–5Δ*pgi::(zwf–gnd)* VS *C. glutamicum* XQ–5				
ABC 转运系统				
gene2552	*Cgl2575*	ABC 转运蛋白周质成分	–3.240 5	5.35×10^{-6}
gene2551	*Cgl2574*	ABC 转运蛋白通透酶	–3.106 9	1.34×10^{-5}
gene657	*Cgl0668*	ABC 转运蛋白通透酶	–3.232 6	1.51×10^{-5}
gene658	*Cgl0669*	ABC 转运蛋白周质成分	–3.002 7	2.84×10^{-5}
gene656	*Cgl0667*	ABC 转运蛋白通透酶	–2.991 5	5.67×10^{-5}
gene630	*Cgl0637*	ABC 转运蛋白周质成分	2.543 0	2.39×10^{-4}
gene2550	*Cgl2573*	ABC 转运蛋白通透酶	–2.211 1	1.38×10^{-3}
gene1442	*Cgl1461*	ABC 转运蛋白周质成分	–2.457 8	3.93×10^{-4}
磷酸戊糖途径				
gene1552	*zwf*	6–磷酸葡萄糖 1–脱氢酶	5.385 9	7.40×10^{-12}
gene1433	*gnd*	6–磷酸葡萄糖酸脱氢酶	2.432 4	4.08×10^{-4}
gene845	*pgi*	6–磷酸葡萄糖异构酶	–2.965	2.50×10^{-5}
gene1231	*Cgl1250*	6–磷酸果糖激酶	–2.727 3	8.97×10^{-5}
gene1550	*Cgl1574*	转酮酶	–2.157 2	1.54×10^{-3}
gene2452	*Cgl2485*	葡萄糖酸激酶	–4.509 0	2.39×10^{-9}
丙酮酸代谢				
gene2874	*idh*	L–乳糖脱氢酶	–3.369 0	2.51×10^{-6}
gene2345	*Cgl2380*	苹果酸脱氢酶	–2.805 7	5.91×10^{-5}
gene2830	*Cgl2860*	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶	–2.740 4	8.36×10^{-5}
gene258	*Cgl0248*	苹果酸 2–异丙酯合酶	2.570 2	2.05×10^{-4}
谷胱甘肽代谢				
gene1552	*zwf*	6–磷酸葡萄糖 1–脱氢酶	5.385 9	7.40×10^{-12}
gene1433	*gnd*	6–磷酸葡萄糖酸脱氢酶	2.432 4	4.08×10^{-4}
碳代谢				
gene1552	*zwf*	6–磷酸葡萄糖 1–脱氢酶	5.385 9	7.40×10^{-12}
gene2452	*Cgl2485*	葡萄糖酸激酶	–4.509 0	2.39×10^{-9}
gene845	*pgi*	6–磷酸葡萄糖异构酶	–2.965	2.50×10^{-5}
gene2345	*Cgl2380*	苹果酸脱氢酶	–2.805 7	5.91×10^{-5}
gene1433	*gnd*	6–磷酸葡萄糖酸脱氢酶	2.432 4	4.08×10^{-4}
gene2295	*Cgl2329*	苹果酸合酶 G	2.094 7	2.12×10^{-3}
gene1550	*Cgl1574*	转酮酶	–2.157 2	1.54×10^{-3}
氨基酸的合成代谢				
gene1558	*Cgl1582*	鸟氨酸环脱氨酶	–2.893 2	5.42×10^{-5}
gene258	*Cgl0248*	苹果酸 2–异丙酯合酶	2.570 2	2.05×10^{-4}
gene189	*gltD*	谷氨酸合酶	–2.311 5	7.74×10^{-4}
gene2990	*Cgl3029*	邻氨基苯甲酸合酶 I	2.273 2	9.02×10^{-4}
gene1122	*Cgl1139*	5–甲基四蝶酰基三谷氨酸–高半胱氨酸 *S*–甲基转移酶	2.263 2	9.39×10^{-4}
gene1251	*Cgl1271*	乙酰乳酸合酶大亚基	2.238 3	1.07×10^{-3}
gene1550	*Cgl1574*	转酮酶	–2.157 2	1.54×10^{-3}

续表 6

基因 ID	基因名称	注解	log_2FC	q 值
β-丙氨酸代谢				
gene140	*panD*	天冬氨酸-α-脱羧酶	2.808 1	7.25×10^{-5}
C. glutamicum XQ-5Δ*zwf*::*pgi* VS *C. glutamicum* XQ-5				
ABC 转运系统				
gene2551	*Cgl2574*	ABC 转运蛋白通透酶	-3.834 7	2.11×10^{-7}
gene2552	*Cgl2575*	ABC 转运蛋白周质成分	-3.552 1	8.68×10^{-7}
gene1442	*Cgl1461*	ABC 转运蛋白周质成分	-3.284 4	4.89×10^{-6}
gene630	*Cgl0637*	ABC 转运蛋白周质成分	3.094 1	1.24×10^{-5}
gene2550	*Cgl2573*	ABC 转运蛋白周质成分	-3.040 8	2.21×10^{-5}
gene1441	*Cgl1460*	ABC 转运蛋白 ATP 酶	-2.760 7	9.61×10^{-5}
gene2549	*Cgl2572*	磷酸转运蛋白 ATP 结合蛋白		
磷酸戊糖途径				
gene1554	*Cgl1578*	6-磷酸葡萄糖酸内酯酶	-4.261 7	1.98×10^{-8}
gene2452	*Cgl2485*	葡萄糖酸激酶	-3.747 5	2.67×10^{-7}
gene1433	*gnd*	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	-2.259 4	9.53×10^{-4}
gene1552	*zwf*	6-磷酸葡萄糖 1-脱氢酶	-2.555 8	2.32×10^{-4}
丙酮酸代谢				
gene2357	*Cgl2392*	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶	-4.077 2	3.88×10^{-8}
谷胱甘肽代谢				
gene1552	*zwf*	6-磷酸葡萄糖 1-脱氢酶	-2.555 8	2.32×10^{-4}
gene1433	*gnd*	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	-2.259 4	9.53×10^{-4}
碳代谢				
gene1554	*Cgl1578*	6-磷酸葡萄糖酸内酯酶	-4.261 7	1.98×10^{-8}
gene2357	*Cgl2392*	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶	-4.007 1	7.41×10^{-6}
gene2452	*Cgl2485*	葡萄糖酸激酶	-3.747 5	2.67×10^{-7}
gene1552	*zwf*	6-磷酸葡萄糖 1-脱氢酶	-2.555 8	2.32×10^{-4}
gene1433	*gnd*	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	-2.259 4	9.53×10^{-4}
磷酸肌醇代谢				
gene2957	*Cgl2996*	肌醇-1-磷酸合酶	-6.232 2	4.53×10^{-11}
gene3020	*Cgl3062*	肌醇脱氢酶	4.756 5	2.66×10^{-9}
gene165	*Cgl0161*	5-脱氧葡萄糖醛酸异构酶	4.411 3	2.35×10^{-6}
gene168	*Cgl0164*	脱氢酶	4.374 2	8.34×10^{-9}
gene166	*Cgl0162*	3D-(3,5/4)-三羟基环己烷-1,2-二酮基水解酶(脱环)	4.058 9	2.51×10^{-8}
gene167	*Cgl0163*	假设蛋白	3.759 4	3.03×10^{-7}

即 ATP 结合盒(ABC 家族蛋白)转运系统、磷酸戊糖途径、丙酮酸代谢、谷胱甘肽代谢、碳代谢和肌醇磷酸代谢。

2.5 敲除工程菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)中 *panD* 基因提高其赖氨酸产量

基于转录组数据和 KEGG 分析中差异表达的基因信息,发现由于胞内 NADPH 水平的提高,重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)中编码天冬氨酸-α-脱羧酶的 *panD* 基因的表达水平也提高了,见表 6,表明基因 *panD* 可能受到 NADPH 的调控。而 *panD* 基因表达水平的提高使更多的天冬氨酸流向合成β-丙氨酸的途径,天冬氨酸是赖氨酸合成的重要前体,*panD* 基因的表达水平提高对于目标产物赖氨酸的合成是非常不利的,这也可能是重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)中赖氨酸产量减少的潜在原因。因此,通过基因敲除策略,敲除重

组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)基因组中的 *panD* 基因以构建菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)，来实现阻断该途径的目的。以 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)和 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 基因组为模板进行 PCR 验证，结果表明 *panD* 基因已被成功敲除。与菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 相比，*panD* 几乎不在菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)中表达。在相同条件下，将两个菌株进行摇瓶发酵。菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 和菌株 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 之间的细胞生长和葡萄糖消耗几乎相同，见图 6(a)、(b)，但赖氨酸的产量从最初的 41 g/L 提高到 55 g/L，见图 6(c)，比出发菌株*C. glutamicum* XQ-5 的赖氨酸产量 48 g/L 提高了 14.3%。这些结果表明，基因 *panD* 的表达水平上调是重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)与出发菌 *C. glutamicum* XQ-5 相比赖氨酸合成减少的原因之一。

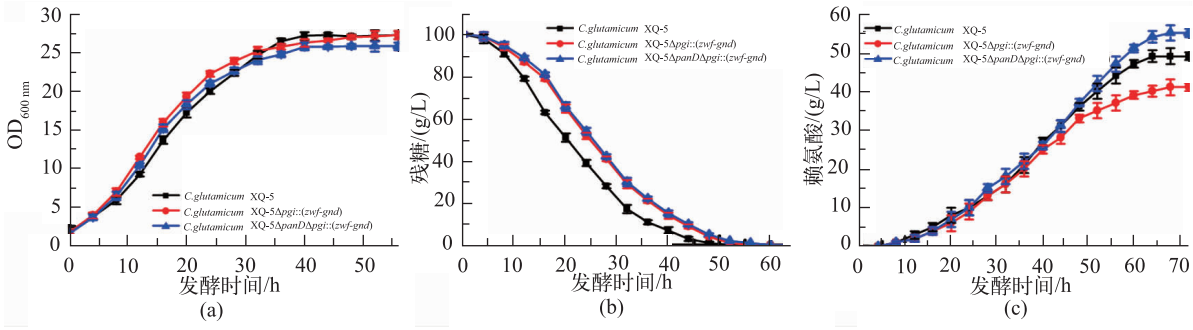


图 6　重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)的发酵参数

Fig. 6　Fermentation parameters of recombinant strain *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)

3 结　语

该研究中对一赖氨酸产生菌 *C. glutamicum* XQ-5 进行基因工程改造，构建了自杀型质粒 pK18*mobsacB*-Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 和 pK18*mobsacB*-Δ*zwf*::*pgi*。其中 pK18*mobsacB*-Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)用于将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *zwf* 和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 *gnd* 替换 6-磷酸葡萄糖异构酶编码基因 *pgi*，来过表达 PPP 途径，阻断糖酵解途径，从而构建了提高胞内 NADPH 水平的重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)。pK18*mobsacB*-Δ*zwf*::*pgi* 用于将 6-磷酸葡萄糖异构酶编码基因 *pgi* 替换葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *zwf*，来阻断PPP 途径，过表达糖酵解途径，从而构建了降低胞内 NADPH 水平的重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi*。对出发菌和重组菌进行摇瓶发酵实验，在 3 种不同的辅因子 NADPH 水平下，对胞内氧化还原辅因子（NAD^+、NADH、$NADP^+$和 NADPH）和能量辅因子（ATP、ADP 和 AMP）进行分析和比较。由于强化了糖酵解途径，重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 胞内 NADPH 水平较出发菌降低了 68.6%，NADPH/$NADP^+$降低了 28.8%，NADH 含量提高了 44.8%，NADH/NAD^+提高了 88.5%，ATP 含量提高了 111.2%。在以葡萄糖为单一碳源的 CGXIIG 培养基中，重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*zwf*::*pgi* 的葡萄糖代谢能力在对数生长前期强于出发菌株，发酵 12 h 以后生长速率下降并很快进入稳定期，最终菌体量与出发菌相比降低了 32.1%。其 L-赖氨酸产量降低了82.4%，缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸合成量也都明显降低，而在胞内积累了大量副产物，如丙酮酸、乳酸等。由于阻断了糖酵解途径，重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)胞内 NADPH 水平较出发菌提高了 404.2%，NADPH/$NADP^+$提高了 109.9%，NADH 含量降低了 22.1%，NADH/NAD^+降低了 34.6%，ATP 含量提高了 29.7%。在以葡萄糖为唯一碳源的 CGXIIG 培养基中，重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)通过 PPP 途径代谢碳源，葡萄糖代谢能力明显弱于出发菌株，菌体生长缓慢，进入稳定期的时间延长，并且最终菌体量与出发菌相比降低了 11.4%。虽然

NADPH 有所提高，但是 L-赖氨酸产量却降低了 11.8%，缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸、谷氨酸合成量也都明显降低，而在胞内积累了大量副产物，如丙酮酸、乳酸等。

通过出发菌和重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)之间的转录数据分析，经过改造的重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)基因组中天冬氨酸-α-脱羧酶基因 *panD* 表达水平比出发菌株提高了 7.1 倍。通过基因敲除技术将重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*pgi*::(*zwf-gnd*) 中的 *panD* 基因进行剔除，获得重组菌 *C. glutamicum* XQ-5Δ*panD*Δ*pgi*::(*zwf-gnd*)，通过摇瓶发酵，赖氨酸产量为 55 g/L，比出发菌 *C. glutamicum* XQ-5 提高了 14.3%。实验结果证实，单纯通过阻断糖酵解途径、过表达 PPP 途径来提高 NADPH 水平，会使重组菌赖氨酸合成途径中某些关键基因表达水平发生变化，这也是其赖氨酸产量有所下降的原因之一。并且，改变胞内 NADPH 的水平，胞内微环境，如氧化还原平衡等，会受到扰动，此时菌体生长和代谢也会受到影响，而对 L-赖氨酸产量的影响尤为明显。因此，细菌可能会将代谢产物的合成转换为电子吸收体，以避免高还原环境的有害作用。该研究为进一步解析辅因子 NADPH 调控 L-赖氨酸产生菌的胞内微环境的生理机制奠定了基础。

参考文献：

[1] HE X,CHEN K,LI Y,et al. Enhanced L-lysine production from pretreated beet molasses by engineered *Escherichia coli* in fed-batch fermentation[J]. **Bioprocess Biosystems Engineering**,2015,38:1615-1622.

[2] NAGA Y,ITO H,YASUEDA H. Amino acid production:L-lysine[M]//FLICKINGER M C. Encyclopedia of industrial biotechnology:bioprocess,bioseparation,and cell technology. Hoboken:Wiley,2010,7:1-10.

[3] YING H,HE X,LI Y,et al. Optimization of culture conditions for enhanced lysine production using engineered *Escherichia coli* [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,2014,172:3835-3843.

[4] KELLE R,HERMANN T,BATHE B. L-Lysine production [M]//EGGELING L, BOTT M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton:CRC Press,2005:465-488.

[5] EGGELING L,BOTT M. A giant market and a powerful metabolism:L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2015,99:3387-3394.

[6] DE GRAEF M R,ALEXEEVA S,SNOEP J L,et al. The steady state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Bacteriology**,1999,181(8):2351-2357.

[7] KABUS A,GEORGI T,WENDISCH V F,et al. Expression of the *Escherichia coli pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,75:47-53.

[8] BLOMBACH B,SCHREINER M E,BARTEK T,et al. *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,73:2079-2084.

[9] PARK S H,KIM H U,KIM T Y,et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production [J]. **Nature Communications**,2014,5:4618.

[10] KIM S Y,LEE J,LEE S Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine [J]. **Biotechnology Bioengineering**,2015,112:416-421.

[11] WANG Y,SAN K Y,BENNETT G N. Improvement of NADPH bioavailability in *Escherichia coli* through the use of phosphofructokinase deficient strains[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97:6883-6893.

[12] NG C Y,FARASAT I,MARANAS C D,et al. Rational design of a synthetic Entner-Doudoroff pathway for improved and controllable NADPH regeneration[J]. **Metabolic Engineering**,2015,29:86-96.

[13] XU J Z,YANG H K,ZHANG W G. NADPH metabolism:a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**,2018,38(7):1061-1076.

[14] HEUX S，CACHON R，DEQUIN S. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*：expression of a H_2O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism[J]. **Metabolic Engineering**，2006，8(4)：303-314.

[15] 秦义，董志姚，刘立明，等. 工业微生物中 NADH 的代谢调控[J]. 生物工程学报，2009，25(2)：161-169.

[16] HOU J，LAGES N F，OLDIGES M，et al. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Metabolic Engineering**，2009，11(4/5)：253-261.

[17] BERA A K，HO N W Y，KHAN A，et al. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A（LNH-ST）to improve xylose fermentation[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**，2011，38(5)：617-626.

[18] OHNISHI J，KATAHIRA R，MITSUHASHI S，et al. A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **FEMS Microbiology Letters**，2005，242：265-274.

[19] KLETZIEN R F，HARRIS P K，FOELLMI L A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase：a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones，nutrients，and oxidant stress[J]. **FASEB Journal**，1994，8：174-181.

[20] NIOLSEN J. It is all about metabolic fluxes[J]. **Journal of Bacteriology**，2003，185：7031-7035.

[21] MOLS M，VAN KRANENBURG R，VAN MELIS C C，et al. Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation[J]. **Environmental Microbiology**，2010，12(4)：873-885.

[22] WANG T，GAO F，KANG Y，et al. Mycothiol peroxidase MPx protects *Corynebacterium glutamicum* against acid stress by scavenging ROS[J]. **Biotechnology Letters**，2016，38(7)：1221-1228.

[23] FAIJES M，ASTRID E M，EDDY J S. Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*[J]. **Microbial Cell Factories**，2007，6(1)：27-34.

[24] LIU L M，LI Y，SHI Z P，et a1. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*：Increase of NAD^+ availability[J]. **Journal of Biotechnology**，2006，126(2)：173-185.

[25] LEE S H，JO S H，LEE S M，et al. Role of $NADP^+$-dependent isocitrate dehydrogenase（NADP+-ICDH）on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays[J]. **International Journal of Radiation Biology**，2004，80：635-642.

[26] MAENG O，KIM Y C，SHIN H J，et al. Cytosolic $NADP^+$-dependent isocitrate dehydrogenase protects macrophages from LPS-induced nitric oxide and reactive oxygen species[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**，2004，317：558-564.

[27] STRYER L. Biochemistry[M]. San Francisco：W. H. Freeman，1975.

[28] ZHU S，CAI D B，LIU Z W，et al. Enhancement of bacitracin production by NADPH generation via overexpressing glucose-6-phosphate dehydrogenase Zwf in *Bacillus licheniformis*[J]. **Journal of Biotechnology**，2007，132：99-109.