DOI:10.12441/spyswjs.20230328002 [文章编号] 1673-1689(2024)08-0031-10

缺失分枝菌酸层提高谷氨酸棒状杆菌 *L*-谷氨酸产量的研究

李贺丹[1,2] 张德志[1,2] 赵桂红[1,2] 李姿含[1,2] 胡晓清[1,2] 王小元[1,2*]

(1. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*,*C. glutamicum*)的分枝菌酸层对维持细胞的通透性有重要作用,但是其合成需要消耗大量的底物和能源。作者通过敲除谷氨酸棒状杆菌 ATCC13869 中聚酮合酶编码基因 *pks13*,构建了突变菌株 Δ*pks13*。与野生型相比,突变菌 Δ*pks13* 细胞体积变大、形状变圆且细胞壁结合松散容易脱落,但 *L*-谷氨酸产量提高了 8 倍。薄层层析和液相色谱-质谱联用分析发现,Δ*pks13* 菌株细胞壁中的脂质主要为磷脂。实时荧光定量 PCR 分析发现,与野生型相比,Δ*pks13* 谷氨酸外排相关基因 *mscCG* 的转录水平上调,而 α-酮戊二酸脱氢酶编码基因 *odhA* 和下游产物精氨酸合成相关基因(*argB*、*argC*、*argD*、*argF*、*argG*、*argH*、*argJ*)转录水平下调。这些基因转录水平的改变解释了 Δ*pks13* *L*-谷氨酸产量提高的机制。

关键词:谷氨酸棒状杆菌;分枝菌酸;*L*-谷氨酸

Deletion of Mycolic Acid Layer Increased *L*-glutamate Production in *Corynebacterium glutamicum*

LI Hedan[1,2] *ZHANG Dezhi*[1,2] *ZHAO Guihong*[1,2] *LI Zihan*[1,2]
HU Xiaoqing[1,2] *WANG Xiaoyuan*[1,2*]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The mycolic acid layer in *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) plays important role in maintain cell permeability, however, its synthesis consumes substantial energy and substrate in the synthesis process. A mutant strain, Δ*pks13*, was constructed by deleting the polyketide synthase gene *pks13* in *C. glutamicum* ATCC13869. Compared to the wild type, the mutant strain Δ*pks13* cells were larger, more rounded, and with a loosely bound cell wall that tended to detach easily,while the *L*-glutamate yield increased 8-fold. Thin layer chromatography and liquid chromatography mass spectrometry analysis revealed that phospholipids were the primary cell wall lipids in Δ*pks13*. Quantitative real-time PCR analysis revealed that, compared with wild-type strain,the transcript level of the glutamate efflux-related gene *mscCG* was upregulated, while the transcription levels of the α-ketoglutarate dehydrogenase-encoding gene *odhA* and the downstream arginine synthesis-related gene (*argB*, *argC*, *argD*, *argF*, *argG*, *argH and argJ*) were downregulated in Δ*pks13* cells. These changes in genes transcription levels explain the mechanism underlying the enhanced *L*-glutamate production in Δ*pks13*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; mycolic acids; *L*-glutamate

---

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFC2100900)。

通信作者:王小元(1965—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事改造优化膜壁结构、提升工业微生物发酵水平的研究。E-mail:xwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-03-28 **修回日期:**2023-07-25

在谷氨酸棒状杆菌中，*L*-谷氨酸的产生可以由几种特定的处理诱导，比如生物素限制、添加*β*-内酰胺类抗生素、添加脂肪酸表面活性剂或作用于分枝菌酸的乙胺丁醇等[1-5]。分枝菌酸的含量在这几种处理下均有所下降[6]，说明分枝菌酸层的变化与*L*-谷氨酸的过量生产密切相关。*L*-谷氨酸广泛应用于食品行业，也是合成*γ*-氨基丁酸和*L*-谷氨酰胺的重要底物[7-8]。

谷氨酸棒状杆菌的分枝菌酸层位于细胞壁的最外层，主要由分枝菌酸（mycolic acid，MA）、海藻糖单分枝菌酸和海藻糖双分枝菌酸组成[9]。研究发现，野生菌株在含有高浓度葡萄糖的培养基中会合成葡萄糖分枝菌酸，而且该组分的比例在整个结构中占有绝对优势[10]。整个分枝菌酸层的结构物质都需要以分枝菌酸为底物合成，阻断分枝菌酸合成后该结构也会缺失。在*C. glutamicum*中，聚酮合酶Pks13催化分枝菌酸的*α*链和*β*链缩合生成酮基-分枝菌酸[11-13]。分枝菌酸与海藻糖结合，形成酮基-海藻糖单分枝菌酸，随后酮基-海藻糖单分枝菌酸的酮基被分枝菌酸还原酶cmrA还原形成成熟的海藻糖单分枝菌酸[14]。海藻糖单分枝菌酸作为分枝菌酸的供体，在分枝菌酸转移酶的作用下，将分枝菌酸从海藻糖单分枝菌酸转移到阿拉伯糖层的受体形成共价连接的分枝菌酸，或转移到其他海藻糖单分枝菌酸分子形成海藻糖双分枝菌酸，或转移到特定的孔蛋白形成O-酰化修饰[15-19]。

为考察分枝菌酸缺失后对细胞壁结构和*L*-谷氨酸产量的影响，作者以*C. glutamicum* ATCC13869为出发菌株，敲除*pks13*基因构建了突变体Δ*pks13*。通过电镜观察Δ*pks13*的细胞形态和细胞壁结构的变化、LC-MS分析Δ*pks13*中的主要脂质种类、发酵试验观察Δ*pks13*的*L*-谷氨酸生产情况并使用实时荧光定量PCR初步分析Δ*pks13*中与*L*-谷氨酸合成相关的基因的转录水平，为提高*L*-谷氨酸产量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

葡萄糖、牛肉浸膏、尿素、乙酸钠、氯化钠、磷酸二氢钾、硫酸铵、硫酸镁、硫胺素•盐酸盐、琼脂糖、琼脂粉、氢氧化钾、甘油、吐温-80、甲醇、乙醇、乙酸、三乙胺、四氢呋喃、二甲基亚砜、三氯甲烷和乙腈等：中国医药集团有限公司；轻质碳酸钙：上海麦克林生化科技股份有限公司；蛋白胨和酵母提取物：英国OXOID公司；以上生化试剂均为分析纯。细菌基因组DNA提取试剂盒：天津兰瑞生物技术有限公司；卡那霉素、氯霉素、氨苄西林：德国默克公司；验证酶T3 Super PCR Mix：南京擎科生物科技有限公司；限制性内切酶*Bam*H Ⅰ和*Eco*R Ⅰ、T4连接酶：美国赛默飞世尔科技公司；Simply P总RNA提取试剂盒：北京博迈斯生物技术有限公司；质粒提取试剂盒、高保真酶2×Pfx Master Mix、HiScrip II First Strand cDNA试剂盒和2×SYBR green PCR Master Mix：南京诺唯赞生物技术股份有限公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱质谱联用仪（liquid chromatography mass spectrometry，LC-MS）：Waters ACQUITY UPLC和Waters MALDI Synapt Q-TOF质谱检测器，美国沃特斯公司；冷场发射扫描电子显微镜：SU8220型，日本日立公司；电转仪：411BR6629型，上海伯乐有限公司；超薄切片透射电子显微镜：JEOL JEM 2100型，日本电子株式会社；冷场发射扫描电子显微镜：SU8220型，日本日立公司；高效液相色谱：Agilent 1200型，安捷伦公司；紫外分光光度计：UV-1800型，上海元析仪器有限公司；实时荧光定量PCR（real-time quantitative polymerase chain reaction，RT-PCR）仪：StepOne™ Real-Time PCR System型，美国应用生物公司。

1.3 菌株、质粒与引物

使用菌株和质粒见表1，使用的引物见表2。

1.4 培养基和培养条件

1.4.1 培养基

LB培养基、LBHI培养基、LBHIS培养基、感受态EPO培养基：参照文献[10，20]。活化培养基：胰蛋白胨10 g、牛肉浸膏15 g、酵母提取物5 g、氯化钠5 g、葡萄糖5 g、超纯水1 L。种子培养基：葡萄糖25 g、玉米浆30 g、尿素1.25 g、硫酸铵0.5 g、磷酸二氢钾1 g、硫酸镁0.5 、超纯水1 L，pH 7.2。发酵培养基：硫酸铵40 g/L、玉米浆15 g/L、磷酸二氢钾1 g、七水硫酸亚铁10 mg、硫酸镁500 mg、一水硫酸锰10 mg、酵母提取物1 g、硫胺素•盐酸盐1 mg、轻质碳酸钙20 g、超纯水1 L，pH 7.2。种子培养基和

发酵培养基在115 ℃条件下高压灭菌15 min，其他培养基在121 ℃条件下高压灭菌20 min。800 g/L的葡萄糖溶液在115 ℃条件下高压灭菌15 min，使用前加到培养基中，工作质量浓度为90 g/L。

表1　质粒、菌株及其特征

Table 1　Plasmids and strains and their characteristics

	菌株和质粒	遗传特性	来源
菌株	DH5α	*supE44*、Δ*lacU169*、φ80 *lacZ*ΔM15、*hsdR17*、*recA1*、*endA1*、*gyrA96*、*thi-1*、*relA*	Novagen
	ATCC13869	野生型谷氨酸棒状杆菌	ATCC
	Δ*pks13*	ATCC13869敲除*pks13*基因	本研究
质粒	pBlueScript II SK(+)	克隆载体、ColE1、lacZ、Amp^r	Stratagene
	pDTW202	loxL-kan-loxR的提供质粒、Amp^r、Km^r	[18]
	pDTW109	*Cre*基因的表达质粒、Cm^r	[18]
	pHDW-*pks13*	*pks13*敲除质粒	本研究

1.4.2　培养条件

大肠杆菌在LB培养基中以37 ℃，220 r/min的条件培养。谷氨酸棒状杆菌在LBHI培养基中以30 ℃、220 r/min的条件培养。大肠杆菌使用的抗生素质量浓度为卡那霉素30 mg/L、氯霉素30 mg/L和氨苄青霉素50 mg/L。谷氨酸棒状杆菌使用的抗生素质量浓度为卡那霉素30 mg/L、氯霉素10 mg/L。

摇瓶发酵培养时，先将甘油管保存的菌株使用活化培养基进行平板活化，平板在30 ℃培养箱中培养约36 h。将活性平板上的菌落接种到50 mL的种子培养基中，在30 ℃、200 r/min的摇床中培养约16 h制备种子液。按初始的OD_{562}为1.0，将种子液接种到50 mL发酵培养基中。使用250 mL带挡板的摇瓶，装液体积为50 mL，发酵条件为30 ℃、200 r/min。每隔12 h收集1 mL样品用于测定细胞的生长、葡萄糖消耗和氨基酸质量浓度。

1.5　质粒和突变株的构建

1.5.1　质粒的构建

为了构建敲除质粒pHDW-*pks13*。使用ATCC13869的基因组DNA为模板，以*pks13*-U-F和*pks13*-U-R为引物，PCR扩增*pks13*的上游同源臂片段。以*pks13*-D-F和*pks13*-D-R为引物，PCR扩增*pks13*的下游同源臂片段。使用pDTW202为模板，以*pks13*-Kan-F和*pks13*-Kan-R为引物，PCR扩增loxL-Kan-loxR片段。然后，使用*pks13*的上下游同源臂和loxL-Kan-loxR片段为模板，*pks13*-U-F和*pks13*-D-R为引物进行重叠PCR反应。重叠PCR的产物和pBluescrip II SK(+)使用*Bam*H I和*Eco*R I双酶切，酶切产物使用T4连接酶连接后转化大肠杆菌，使用卡那抗性的LB平板进行筛选。以*pks13*-U-F和*pks13*-D-R为引物进行菌落PCR验证，将正确的转化子摇菌提取质粒，并测序。

1.5.2　突变株的构建

使用Cre-loxP基因编辑技术敲除*pks13*[20]。首先，将敲除质粒pHDW-*pks13*电转化入ATCC13869感受态细胞，使用卡那抗性的LBHI平板进行筛选。长出的单菌落使用验证引物*pks13*-YF和*pks13*-YR进行菌落PCR验证，筛选出loxL-Kan-loxR正确插入的转化子。将测序结果正确的Δ*pks13*::kan菌株制备电转感受态细胞，电转化pTDW109质粒并在25 ℃条件下培养。pTDW109质粒携带*cre*基因，能有效诱导2个loxP位点相互识别，从而去掉卡那霉素抗性。以*pks13*-YF和*pks13*-YR为验证引物，菌落PCR筛选去掉卡那霉素抗性的转化子。然后，将正确的菌落接种到LBHIS液体培养基中，37 ℃高温培养诱导丢失温敏质粒pDTW109。培养混浊后，将菌液在LBHIS平板上划线，在30 ℃下培养至有单菌落。挑选单个菌落，在三个不同的LBHIS平板上(不含抗生素、含卡那霉素和含氯霉素)分别划线。对卡那霉素和氯霉素均敏感的菌落命名为Δ*pks13*。最后，对突变菌株Δ*pks13*进行了测序确保基因敲除正确。

1.6　显微镜观察

1.6.1　超薄切片透射电子显微镜

细胞在发酵培养基中培养至对数生长期中期，4 000 r/min离心10 min，收集菌体。收集的菌

表 2 引物

Table 2 Primers

引物名称	序列（5′—3′）	酶切位点
Pks13-U-F	TATAGAATTCGAGCAAATCCTTGACCATATTC	*Eco*R I
Pks13-U-R	CGCCCTATAGTGAGTCGTATTCGGAGCTCATTTGAGTCGC	
Pks13-kan-F	GCGACTCAAATGAGCTCCGAATACGACTCACTATAGGGCG	
Pks13-kan-R	GCTTATGAGTACCCAACGATCCGCGCAATTAACCCTCACTAAAG	
Pks13-D-F	CTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGGATCGTTGGGTACTCATAAGC	
Pks13-D-R	TATAGGGCCCAACCACTACCCACAGGACATC	*Apa*I
Pks13-YF	AGCCCTGGTTAGTGTCGTC	
Pks13-YR	GCCTTCCCGCTGGATTAAG	
odhA-RT-F	CACGGATTGGAACTTGGTGACC	
odhA-RT-R	TCCGACCTGAAGCGTCCACT	
argC-RT-F	CGTGTAGCAGTGCCAGGATG	
argC-RT-R	GGAGGTGTTGTACGCCTTGAG	
argJ-RT-F	CGTGTTCCTGCTGGCATCTG	
argJ-RT-R	ATCGCCTGCTCGTTGTTG	
argB-RT-F	GGTGCTCTTTGGTCAGGTCG	
argB-RT-R	AACCAATATCAGTGGGTACGCC	
argD-RT-F	CGGTGTGGAGTTCTACCCTTAC	
argD-RT-R	CCCGTTTCACCCTGGATTG	
argF-RT-F	CACAGATGGGTAAGGGCGAG	
argF-RT-R	ATCGGACAAGGAGTTCACCAGT	
argG-RT-F	CTCGTGACTTCGCATGGACC	
argG-RT-R	TCCTCGGTGTATGCGTAGATG	
argH-RT-F	TGGACAAGCGTCTTGCGGT	
argH-RT-R	ACGAAGGCGGTTTCAGATGC	
glnA-RT-F	GAACCGTGGCAAGGAAACC	
glnA-RT-R	CGGTTTGGTCGTATGGTGCT	
mscCG-RT-F	AGTTCCTTCTCTGGATTGCCTG	
mscCG-RT-R	AGCCAAAGACCTCGCTTATCG	
mscCG2-RT-F	TGTCGGTGACGGCATTATCG	
mscCG2-RT-R	GGAGAAGTTACCCACACGCAG	
mscL-RT-F	GCTGCGATGATGAGGAAGTTG	
mscL-RT-R	CATCGGCAGCACAGAGGTTG	
16S-RT-F	ACCTGGAGAAGAAGCACCG	
16S-RT-R	TCAAGTTATGCCCGTATCG	

注：下划线表示限制性内切酶的酶切位点。

体用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次，然后用体积分数 2.5% 的戊二醛固定至少 3 h，最后使用超薄切片透射电子显微镜对谷氨酸棒状杆菌的细胞壁进行分析。

1.6.2 冷场发射扫描电子显微镜

细胞在发酵培养基中培养至对数生长期中期，4 000 r/min 离心 10 min，收集菌体。使用体积分数 5% 的戊二醛固定，并用磷酸盐缓冲液洗涤多次。随后使用不同梯度的乙醇溶液（体积分数 30%、50%、70%）在 4 ℃下脱水，最后在室温下使用乙醇溶液（体积分数 90%、100%）脱水。样品干燥后，使用冷场发射扫描电子显微镜对谷氨酸棒状杆菌的细胞形态进行分析。

1.7 发酵过程参数测定

使用分光光度计在 562 nm 波长处监测细胞的生长状态。样品于 12 000 r/min 离心 15 min，取

上清液用于葡萄糖质量浓度和氨基酸质量浓度的测定。

采用生物分析仪测定葡萄糖质量浓度。首先用25 μL标准品定标，将样品稀释100倍，取25 μL注入反应池。样品中的葡萄糖与固定化酶层反应生成过氧化氢。用铂-银电极可以检测到过氧化氢，并产生电流信号。该电流信号与葡萄糖质量浓度呈线性关系，可直接显示出葡萄糖的质量浓度。

将上清液稀释合适倍数以测定氨基酸质量浓度。使用进样程序将1 μL的样品与5 μL的0.4 mol/L硼酸盐缓冲液、1 μL的邻苯二甲醛和33 μL的水混合，进样到高效液相色谱仪中。样品使用Thermo Fisher Science C18分析柱，在紫外波长338 nm处检测，流量设定为0.8 mL/min。流动相为A溶剂（质量浓度3.01 g/L乙酸钠，体积分数0.5%四氢呋喃，体积分数0.02%三乙胺，pH 7.2）和B溶剂（质量浓度3.01 g/L乙酸钠，体积分数40%甲醇，体积分数40%乙腈，pH 7.2）。梯度洗脱条件为：V_A∶V_B=92∶8；0~7 min，B的线性梯度为8%~24%；7~17.9 min，B的线性梯度为24%~42%；17.9~24 min，B的线性梯度为42%~52%；24~29 min，V_A∶V_B=48∶52；30 min，B的线性梯度为52%~8%，并在V_A∶V_B=92∶8保持2 min。

1.8 脂类的提取与分析

根据已发表的方法从*C. glutamicum*细胞中分离脂类[21]。将*C. glutamicum*培养至OD_{562}约为60，4 000 r/min离心10 min收集约40 mL的菌体。将菌体悬浮在10 mL的三氯甲烷-甲醇溶液（$V_{三氯甲烷}$∶$V_{甲醇}$=1∶2）中，室温混匀16 h，4 000 r/min离心30 min收集上清液。将菌体重新悬浮在10 mL的三氯甲烷-甲醇溶液（$V_{三氯甲烷}$∶$V_{甲醇}$=1∶1）中，室温混匀16 h，4 000 r/min离心30 min收集上清液。将菌体重新悬浮在10 mL的三氯甲烷-甲醇溶液（$V_{三氯甲烷}$∶$V_{甲醇}$=2∶1）中，室温混匀16 h，4 000 r/min离心30 min收集上清液。将3次收集的上清液合并，使用旋蒸仪干燥，得到粗脂质提取物。将该提取物重悬在10 mL的三氯甲烷-水（$V_{三氯甲烷}$∶$V_{水}$=1∶1）混合液中去除水溶性的杂质，收集下层有机相，使用旋蒸仪干燥，得到脂质提取物。将脂类提取物溶解于三氯甲烷-甲醇（$V_{三氯甲烷}$∶$V_{甲醇}$=2∶1）中备用。

提取的脂质进行薄层层析分析（thin layer chromatography，TLC）和LC-MS分析。将样品点涂于硅胶层析平板上，以三氯甲烷-甲醇-水-氨（$V_{三氯甲烷}$∶$V_{甲醇}$∶$V_{水}$∶$V_{氨}$=65∶25∶1∶3）为展层剂展开，展层结束后风干硅胶层析平板，均匀喷洒体积分数10%的硫酸乙醇喷雾，平板在160 ℃下反应5~10 min进行显色。LC-MS在Waters ACQUITY UPLC和Waters MALDI Synapt Q-TOF质谱检测器以负离子模式进行液质联用分析。采用MASS LYNX V4.1软件采集和分析所有数据。

1.9 实时荧光定量PCR

使用RT-PCR对不同菌株的基因转录水平进行定量。对数生长期的菌株中总RNA的提取采用Simply P总RNA提取试剂盒，具体步骤如下：取适量菌液，5 000 r/min离心2 min，弃上清液后加入100 μL溶菌酶溶液（100 mg/mL），在室温下静置10 min，加入600 μL裂解液R2，混匀后室温静置5 min。将上清液转移到纯化柱中，12 000 r/min离心30 s，弃去收集管中的液体。向纯化柱中加入600 μL洗涤液，12 000 r/min离心30 s，弃去收集管中的液体。重复该步骤一次，空柱在12 000 r/min离心1 min，将纯化柱转移到无菌离心管中。在纯化柱中加入30 μL洗脱液，室温静置1 min，12 000 r/min离心30 s，离心管收集提取的RNA。将提取的RNA置于-80 ℃备用。

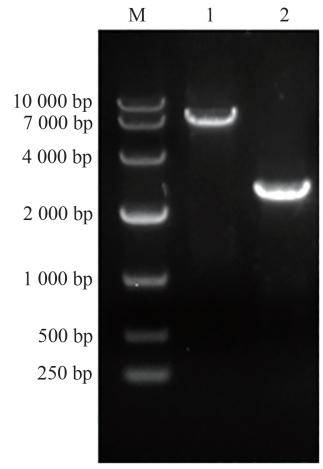
将提取的RNA使用HiScrip II First Strand cDNA试剂盒反转录成cDNA。首先去除基因组DNA，配制的体系体积为16 μL：4× gDNA wiper Mix 4 μL、模板RNA 1 000 ng，用不含RNA酶的水将体积补足到16 μL后混匀，该体系在42 ℃条件下反应2 min。配制逆转录体系20 μL：16 μL上一步反应体系、5× HiScriptIII qRT SuperMix 4 μL。该体系在50 ℃反应15 min，85 ℃反应5 s。测定cDNA质量浓度并置于-80 ℃备用。

使用2× SYBR green PCR Master Mix进行荧光定量PCR，在避光条件下配制20 μL反应体系：正向引物（10 μmol/L）0.4 μL、反向引物（10 μmol/L）0.4 μL、模板cDNA 200 ng、2× SYBR green PCR Master Mix 10 μL，用不含RNA酶的水将体积补足到20 μL后混匀。运行程序如下：95 ℃反应3 min、95 ℃反应10 s、56 ℃反应30 s、72 ℃反应30 s。所有基因以16S rRNA为内参。

2 结果与讨论

2.1 Δ*pks13*菌株的构建

将聚酮合酶基因*pks13*的敲除质粒pHDW-*pks13*电转化至*C. glutamicum* ATCC13869中，构建Δ*pks13*。利用验证引物*pks13*-YF和*pks13*-YR分别对ATCC13869和Δ*pks13*进行PCR鉴定。DNA凝胶电泳的结果见图1，ATCC13869经PCR扩增后得到DNA片段的大小为7 050 bp，Δ*pks13*经PCR扩增后获得的DNA片段大小为2 619 bp。经测序证明*pks13*基因敲除正确，获得突变菌Δ*pks13*。



M—DL 10 000 marker；1—ATCC13869；2—Δ*pks13*。

图1 Δ*pks13*菌株的PCR鉴定

Fig. 1 PCR identification of the Δ*pks13* strain

2.2 ATCC13869和Δ*pks13*细胞的电镜观察

为了探索聚酮合酶基因*pks13*缺失后，*C. glutamicum*的细胞壁结构和形态是否发生改变，使用超薄切片透射电子显微镜和冷场发射扫描电子显微镜观察ATCC13869和Δ*pks13*的细胞壁结构和整体的细胞形态。

与ATCC13869细胞相比，Δ*pks13*细胞表面未观察到蓬松物质，推测这些缺失的物质可能是分枝菌酸，见图2。Δ*pks13*的细胞体积变大，形状变圆，见图3。这些结果表明，缺失*pks13*基因改变了谷氨酸杆菌的细胞形态以及细胞壁的结构。此外，通过冷场发射扫描电子显微镜还观察到Δ*pks13*的细胞壁有脱落现象。Δ*pks13*离心后的菌体形成了两层，而ATCC13869并未分层，见图4(a)。

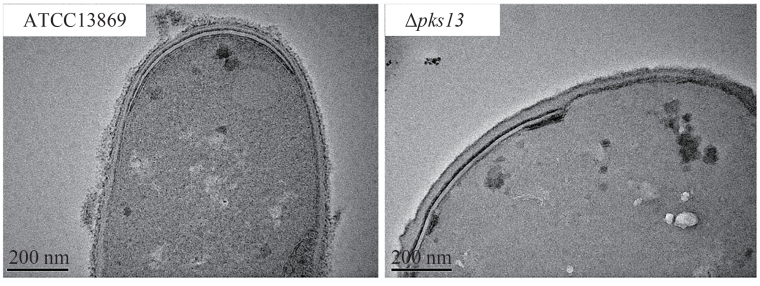


图2 超薄切片透射电子显微镜观察ATCC13869和Δ*pks13*细胞的形态

Fig. 2 Ultrathin section transmission electron microscopy of ATCC13869 and Δ*pks13* cells

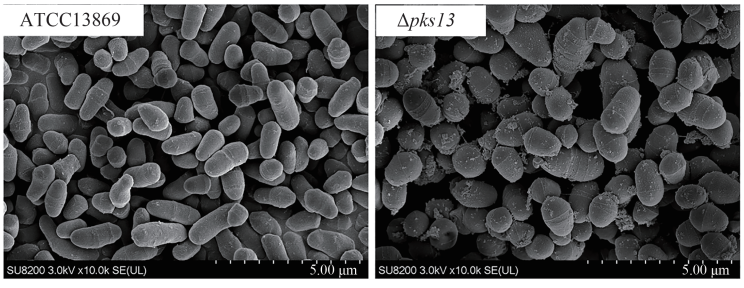


图3 冷场发射扫描电子显微镜观察ATCC13869和Δ*pks13*细胞的形态

Fig. 3 Morphology of ATCC13869 and Δ*pks13* cells observed by cold field-emission scanning electron microscopy

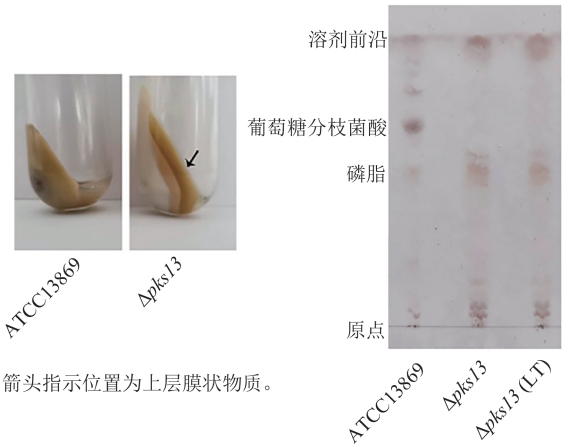
2.3 TLC分析ATCC13869和Δ*pks13*的脂质

为了进一步鉴定脱落的物质，发酵培养72 h后离心收集Δ*pks13*细胞。从ATCC13869、Δ*pks13*细胞和Δ*pks13*上层膜状物质中分别提取脂质物质，使用TLC进行分析。由图4(b)可看出，ATCC13869和Δ*pks13*呈现不同的脂带类型。与

ATCC13869相比，Δ*pks13*的主要脂带发生了改变。Δ*pks13*细胞上层膜状物质提取的脂质与整个Δ*pks13*细胞中提取的主要脂带的位置完全一致，说明上层物质是脱落的细胞壁的组分。这些结果说明，Δ*pks13*细胞壁的主要脂质类型发生了改变，且Δ*pks13*的细胞壁结合较为松散，因而容易脱落。

2.4　Δ*pks13*的细胞壁成分

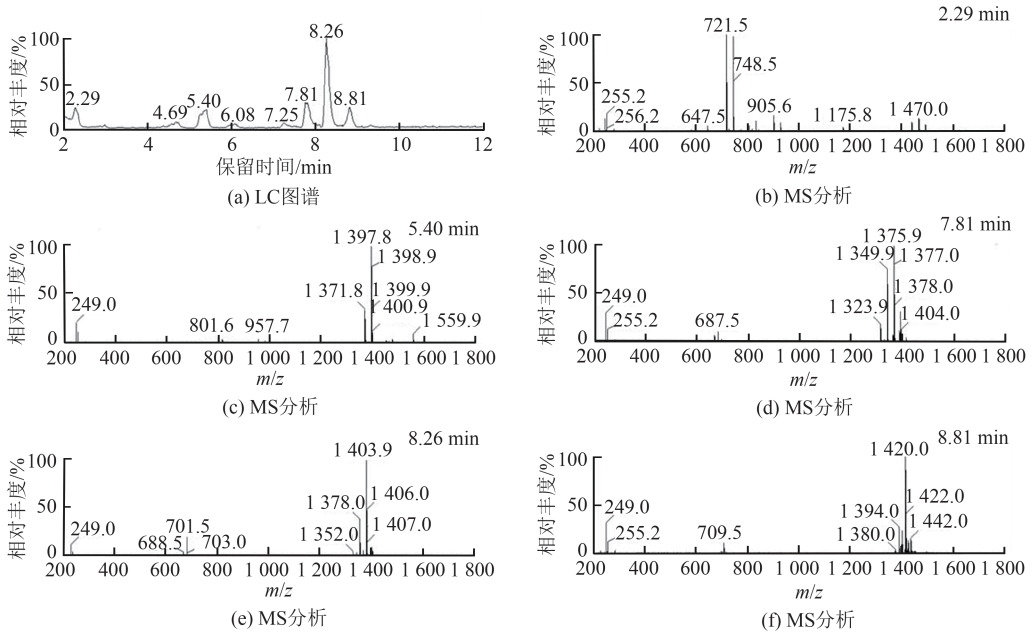
为了确定Δ*pks13*在发酵培养基中合成的主要脂质类型，使用LC-MS在负离子模式下分析提取的脂质。如图5(a)所示，在Δ*pks13*全细胞脂质的LC图谱中，观察到3组信号峰，保留时间分别为2.00~2.50、4.50~6.50、7.00~9.00 min。为了鉴定每个组分的物质，分析了这些峰相对应的MS图谱，见图5(b)~(f)。保留时间为2.29 min的MS图谱中的信号峰位于*m/z* 721.5和747.5，与磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol，PG)的相对分子质量相符[22]。保留时间为5.40 min的MS图谱中的信号峰位于*m/z* 1 397.8，与酰基磷脂酰肌醇二甘露糖苷(acylphosphatidylinositol dimannoside，AcPIM2)的相对分子质量相符[22]。LC图谱中保留时间为7.81、8.26、8.81 min的MS图谱中的信号峰位于*m/z* 1 375.9、1 403.9、1 420，与心磷脂(cardiolipin，CL)的相对分子质量相符[22]。这些结果说明Δ*pks13*细胞壁的脂类主要是磷脂。



(a) 菌体的离心收集　　(b) 上层膜物质脂质TLC分析

图4　菌体的离心收集与上层膜物质脂质的TLC分析

Fig. 4　Centrifugal collection of bacterial cell and TLC analysis of lipids from the top layer membrane material



(a) LC图谱　(b) MS分析　(c) MS分析　(d) MS分析　(e) MS分析　(f) MS分析

图5　Δ*pks13*细胞提取的脂质的LC-MS分析

Fig. 5　LC-MS analysis of lipids extracted from Δ*pks13* cells

为了确定Δ*pks13*离心后上层膜状物质的主要成分，使用LC-MS在负离子模式下分析提取的脂质。如图6(a)所示，在Δ*pks13*的上层膜状物质的LC图谱中，同样观察到3组信号峰，保留时间分别为2.00~3.00、5.00~6.50、8.00~9.50 min。为了鉴定每个组分的物质，分析了这些峰相对应的MS图谱，见图6(b)~(f)。保留时间为2.62 min的MS图谱中的信号峰位于*m/z* 747.5，与PG的相对分子质

量相符。保留时间为5.82 min的MS图谱中的信号峰位于*m/z* 1 397.9，与AcPIM2的相对分子质量相符。保留时间为8.27、8.77、9.34 min的MS图谱中的信号峰位于*m/z* 1 376、1 404、1 420，与CL的相对分子质量相符，这再次证明Δ*pks13*上层膜物质为脱落的细胞壁结构。

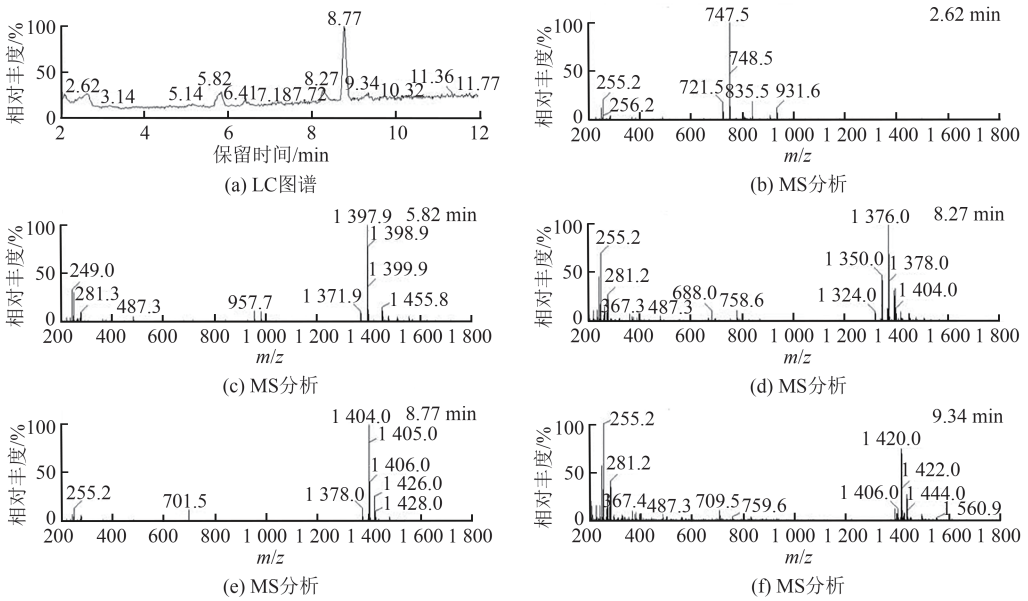


图6 Δ*pks13*上层膜物质提取的脂质的LC-MS分析

Fig. 6 LC-MS analysis of lipids extracted from the top layer of Δ*pks13* cell

2.5 Δ*pks13*的*L*-谷氨酸积累

在摇瓶中培养ATCC13869和Δ*pks13*细胞，测定不同时间的细胞生长、葡萄糖消耗和氨基酸产量（见图7）。在对数期，Δ*pks13*的生长速率慢于ATCC13869，与细胞的生长速率相对应，Δ*pks13*的葡萄糖消耗速率也慢于ATCC13869。当ATCC13869进入平稳期，Δ*pks13*的OD值还在缓慢提高，最后在72 h达到与ATCC13869相似的OD值。培养72 h后，ATCC13869细胞消耗了84 g/L的葡萄糖，产生0.82 g/L的*L*-谷氨酸和2.84 g/L的*L*-丙氨酸。培养72 h后，Δ*pks13*细胞消耗了90 g/L的葡萄糖，产生7.39 g/L的*L*-谷氨酸和4.52 g/L的*L*-丙氨酸。与ATCC13869相比，Δ*pks13*的*L*-谷氨酸产量提高8倍，*L*-丙氨酸产量提高0.59倍。这些结果表明，完全缺失分枝菌酸层后有助于*L*-谷氨酸产量的提高。

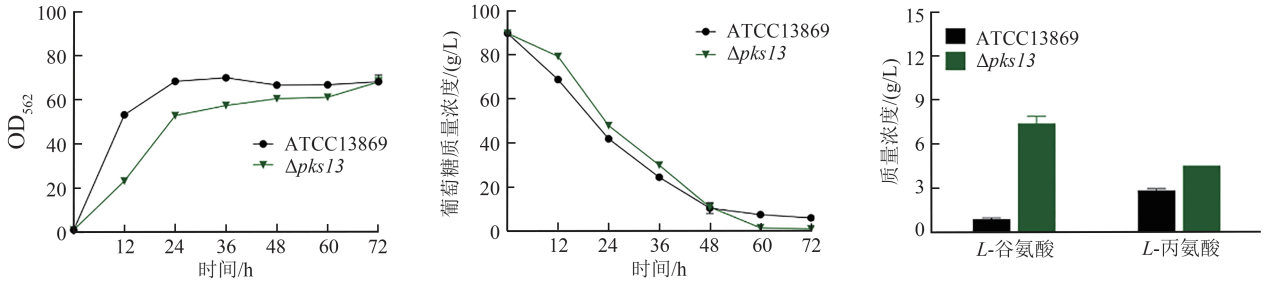


图7 对比ATCC13869和Δ*pks*的生长、葡萄糖消耗、*L*-谷氨酸和*L*-丙氨酸的质量浓度

Fig. 7 Comparison of ATCC13869 and Δ*pks13* in growth, glucose consumption and mass concentration of *L*-glutamate and *L*-alanine

2.6 Δ*pks13*的RT-PCR分析

为了研究Δ*pks13*菌株自发分泌*L*-谷氨酸的机制，用RT-PCR分析了Δ*pks13*突变株与*L*-谷氨酸合成相关的基因（见图8）。通过RT-PCR分析发现，与ATCC13869相比，Δ*pks13*中精氨酸合成基因*argC*、*argJ*、*argB*、*argF*、*argG*、*argH*和氨酸酰胺

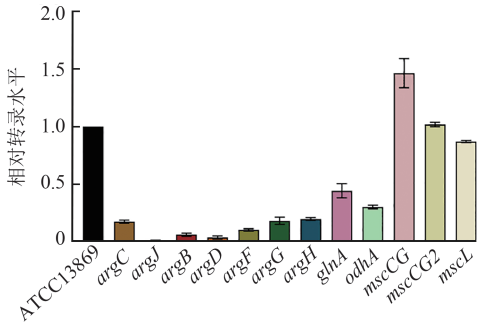


图8 RT-PCR分析Δ*pks13*的基因

Fig. 8 RT-PCR analysis of Δ*pks13* genes

合成基因*glnA*相对转录水平下调。*L*-精氨酸和谷氨酰胺是*L*-谷氨酸的直接下游底物，与*L*-谷氨酸合成竞争底物的*α*-酮戊二酸脱氢酶合成基因*odhA*相对转录水平下调，而参与*L*-谷氨酸外排的*mscCG*基因的相对转录水平上调。

因此，推断在Δ*pks13*细胞中，*L*-谷氨酸过量产生的机制如下：敲除*pks13*导致突变株失去分枝菌酸合成能力，细胞壁发生了明显改变，整个分枝菌酸层缺失。分枝菌酸层的缺失导致了细胞形态变大变圆，进而导致细胞张力的改变，激活了主要的*L*-谷氨酸输出机制通道蛋白MscCG，通道蛋白的激活促进了*L*-谷氨酸的合成。

3 结论

聚酮合酶参与分枝菌酸两条链的缩合反应，因此缺失该基因后菌株无法合成分枝菌酸。通过在ATCC13869中缺失聚酮合酶基因*pks13*发现突变菌株的细胞形态和细胞壁结构发生改变。与ATCC13869相比，Δ*pks13*的细胞变大变圆，细胞壁外层结合的物质完全缺失，且Δ*pks13*细胞离心后上层有膜物质出现。通过LC-MS分析Δ*pks13*的全细胞脂质，发现其细胞壁脂质主要为磷脂，上层膜物质为脱落的细胞壁结构。通过发酵试验对比ATCC13869和Δ*pks13*的氨基酸积累情况，发现Δ*pks13*能自发分泌*L*-谷氨酸。ATCC13869的*L*-谷氨酸产量为0.82 g/L，而Δ*pks13*细胞的*L*-谷氨酸产量高达7.39 g/L，产量提高8倍。这些结果表明完全缺失分枝菌酸层能促使野生菌株自发分泌*L*-谷氨酸。通过qPCR分析了与产生*L*-谷氨酸相关的基因，发现Δ*pks13*菌株发酵过程中，消耗*L*-谷氨酸的下游产物（精氨酸和谷氨酰胺）的编码基因相对转录水平下调，*L*-谷氨酸合成途径相关基因*odhA*的相对转录水平下调，而*L*-谷氨酸的外排相关基因*mscCG*的相对转录水平上调。这些变化对合成*L*-谷氨酸有促进作用。研究证明了聚酮合酶基因*pks13*缺失后会导致野生菌株*C. glutamicum* ATCC13869自发分泌谷氨酸，这为提高谷氨酸生产菌的谷氨酸产量提供了新思路。

参考文献

[1] RADMACHER E, STANSEN K C, BESRA G S, et al. Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits *L*-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 2005, 151(5): 1359-1368.

[2] DUPERRAY F, JEZEQUEL D, GHAZI A, et al. Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1992, 1103(2): 250-258.

[3] CHEN M L, CHEN X L, WAN F, et al. Effect of tween 40 and DtsR1 on *L*-arginine overproduction in *Corynebacterium crenatum*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 119.

[4] KIM J, HIRASAWA T, SATO Y, et al. Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 81(6): 1097-1106.

[5] 李新，彭金生. 对谷氨酸发酵中使用吐温-60用量的探讨[J]. 发酵科技通讯，1993，22(3)：38-39.
LI X, PENG J S. Discussion on the dosage of Tween-60 in glutamate fermentation [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 1993, 22(3): 38-39. (in Chinese)

[6] HIRASAWA T, WACHI M. Glutamate fermentation-2: mechanism of *L*-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 2017, 159: 57-72.

[7] 乔郅钠，吕青兰，李翔飞，等. 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[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(8)：65-74
QIAO Z N, LYU Q L, LI X F, et al. Efficient synthesis of *L*-glutamine by *Corynebacterium glutamicum* promoted *via* rational metabolic engineering [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 65-74. (in Chinese)

[8] 王楠楠，倪亚兰，史锋. 敲除*pknG*提高谷氨酸棒杆菌*L*-谷氨酸和GABA产量[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(2)：187-193.
WANG N N, NI Y L, SHI F. Deletion of *pknG* improves

the production of *L*-glutamate and GABA in recombinant *Corynbacterium glutamicum*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2017,36(2):187-193.(in Chinese)

[9] LANÉELLE M A, TROPIS M, DAFFÉ M. Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013,97(23):9923-9930.

[10] LI H D, XU D Q, TAN X, et al. The role of trehalose biosynthesis on mycolate composition and *L*-glutamate production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microbiological Research,2023,267:127260.

[11] GAO Y F, HU X Q, WANG J L, et al. Impact of mycolic acid deficiency on cells of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2018,65(3):435-445.

[12] PORTEVIN D, SOUSA-D'AURIA C, HOUSSIN C, et al. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(1): 314-319.

[13] 高云飞. 分枝菌酸缺失对谷氨酸棒杆菌 ATCC13869 的影响研究[D]. 无锡:江南大学,2018.

[14] LEA-SMITH D J, PYKE J S, TULL D, et al. The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007,282(15):11000-11008.

[15] HUC E, SOUSA-D'AURIA C, LA SIERRA-GALLAY I L, et al. Identification of a mycoloyl transferase selectively involved in O-acylation of polypeptides in *Corynebacteriales*[J]. Journal of Bacteriology,2013,195 (18):4121-4128.

[16] HUC E, MENICHE X, BENZ R, et al. O-mycoloylated proteins from *Corynebacterium*: an unprecedented post-translational modification in bacteria[J]. The Journal of Biological Chemistry,2010,285(29):21908-21912.

[17] DAUTIN N, SOUSA-D'AURIA C, CONSTANTINESCO-BECKER F, et al. Mycoloyltransferases: a large and major family of enzymes shaping the cell envelope of *Corynebacteriales*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,2017,1861(1):3581-3592.

[18] SOUSA-D' AURIA C, KACEM R, PUECH V, et al. New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycoloyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*[J]. FEMS Microbiology Letters,2003,224(1):35-44.

[19] BRAND S, NIEHAUS K, PÜHLER A, et al. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope [J]. Archives of Microbiology,2003,180(1):33-44.

[20] HU J Y, TAN Y Z, LI Y Y, et al. Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Plasmid, 2013, 70 (3):303-313.

[21] GEBHARDT H, MENICHE X, TROPIS M, et al. The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterineae* [J]. Microbiology,2007,153(5):1424-1434.

[22] KLATT S, BRAMMANANTH R, O'CALLAGHAN S, et al. Identification of novel lipid modifications and intermembrane dynamics in *Corynebacterium glutamicum* using high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Lipid Research,2018,59(7):1190-1204.

(责任编辑:闫林红)