DOI:10.12441/spyswjs.20240315003 [文章编号] 1673-1689(2025)09-0163-10

强化表达PEPC促进谷氨酸棒状杆菌合成4-羟基异亮氨酸

胡楚涵 史 锋*

(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:【目的】实现在谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*,*C. glutamicum*)中高效合成4-羟基异亮氨酸(4-hydroxyisoleucine,4-HIL)。**【方法】**用不同强度的异亮氨酸(isoleucine,Ile)激活型启动子($P_{brnFE}N$)动态上调异亮氨酸双加氧酶(isoleucine dioxygenase,IDO)基因 *ido* 和透明颤菌血红蛋白(VHb)基因 *vgb* 的表达。在此基础上,使用不同强度的组成型启动子加强磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)基因 *ppc* 和丙酮酸羧化酶基因 *pyc* 的表达。**【结果】**在携带不同 $P_{brnFE}N$ 启动子的重组菌株中筛选得到菌株 *C. glutamicum* SN-I_7V_7(SN-I_7V_7),发酵 144 h 后,其 4-HIL 浓度达到了(109.14±1.03) mmol/L,比对照菌株 *C. glutamicum* SN02(SN02)提高了 46.69%。再利用强启动子 P_{tacM} 过表达 *ppc* 基因后,最终得到一株生产 4-HIL 的优势菌株 *C. glutamicum* RS-MP(RS-MP)。该菌株的 4-HIL 浓度达到了(145.76±6.04) mmol/L,比对照菌株 SN-I_7V_7 提高了 33.55%。**【结论】**筛选得到的 $P_{brnFE}N$ 组合和 *ppc* 过表达策略为 4-HIL 在 *C. glutamicum* 中高效合成提供了理论依据。

关键词:4-羟基异亮氨酸;谷氨酸棒状杆菌;异亮氨酸双加氧酶;磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶

Enhanced Expression of PEPC Promotes the Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine by *Corynebacterium glutamicum*

*HU Chuhan SHI Feng**

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to achieve the efficient biosynthesis of 4-hydroxyisoleucine (4-HIL) in *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*). [**Method**] The isoleucine (Ile) inducible promoters ($P_{brnFE}N$) of varying strengths were used to dynamically upregulate the expression of the isoleucine dioxygenase (IDO) gene *ido* and the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) gene *vgb*. On this basis, constitutive promoters of different strengths were employed to enhance the expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene *ppc* and the pyruvate carboxylase gene *pyc*. [**Result**] Among the recombinant strains harboring different $P_{brnFE}N$ promoters, strain *C. glutamicum* SN-I_7V_7 (SN-I_7V_7) was selected. After 144 h of fermentation with this strain, the concentration of 4-HIL reached (109.14±1.03) mmol/L, representing a 46.69% increase compared with the control strain *C. glutamicum* SN02 (SN02). Subsequently, overexpression of *ppc* with the strong promoter P_{tacM} led to the development of strain *C. glutamicum* RS-MP (RS-MP), an elite 4-HIL producer. This strain achieved a 4-HIL concentration of (145.76±6.04) mmol/L, a 33.55% improvement over the control strain SN-I_7V_7. [**Conclusion**] The screened $P_{brnFE}N$ combinations and the *ppc* overexpression strategy provide a theoretical basis for the efficient biosynthesis of 4-HIL in *C. glutamicum*.

Keywords: 4-hydroxyisoleucine; *Corynebacterium glutamicum*; isoleucine dioxygenase; phosphoenolpyruvate carboxylase

---

基金项目:食品科学与资源挖掘全国重点实验室资助项目(SKLF-ZZA-201904)。

通信作者:史锋(1970—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事微生物代谢、合成生物学研究。E-mail:shifeng@jiangnan.edu.cn

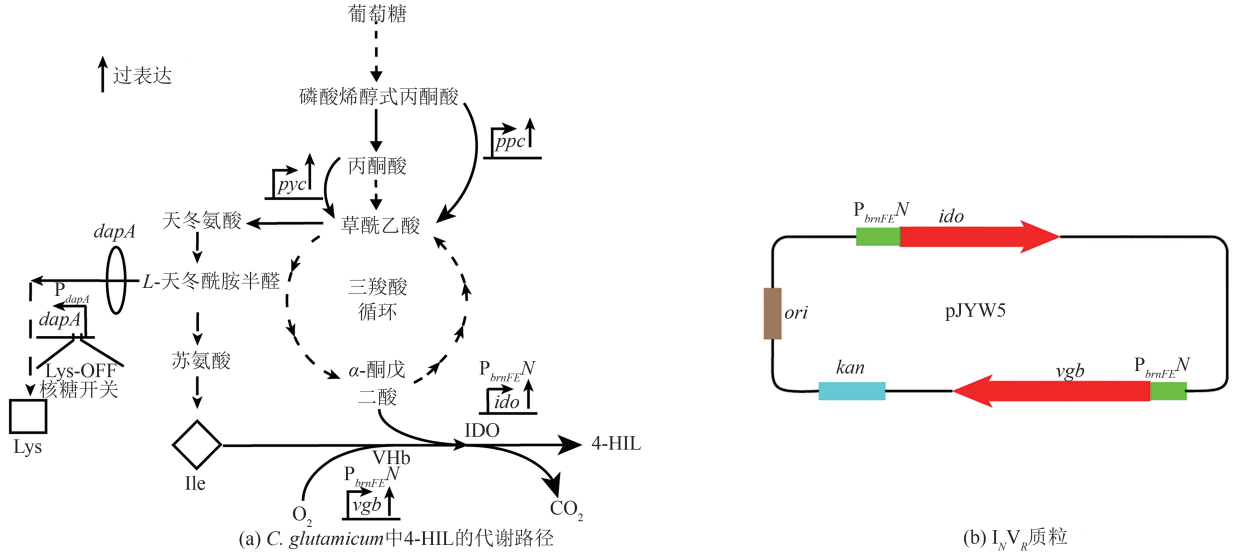
收稿日期:2024-03-15 **修回日期:**2024-04-17

糖尿病是一种慢性代谢疾病，困扰着很多患者。而胡芦巴可用于治疗糖尿病[1]，其抗病机理是通过胡芦巴种子中的4-HIL来刺激胰岛素的分泌，改善血糖浓度[2]。4-HIL可从胡芦巴种子中提取，它只有在血糖浓度高的时候才促进胰岛素分泌，具有葡萄糖浓度依赖性的降血糖功能。该机制使其能够在有效控制高血糖的同时，规避因过度降糖所导致的低血糖风险，并避免身体浮肿等症状[3-5]。

目前，4-HIL可通过酶转化法或发酵法生产。其中，利用微生物发酵是生产4-HIL相对经济的方式。2009年，Kodera等[6]在苏云金芽孢杆菌2e2 AKU 0251中发现了IDO。该酶可以催化Ile与氧气和α-酮戊二酸反应生产4-HIL[7-8]。因此，通过调节*ido*基因的表达和底物的供应可促进4-HIL的生产。

*C. glutamicum*是一种革兰氏阳性菌，广泛用于生产各种氨基酸[9-11]，其产物具有公认的安全性。*C. glutamicum* SN01（SN01）是一株工业应用的Ile高产菌株。在之前的研究中，将来自苏云金芽孢杆菌YBT 1520的*ido*基因在Ile高产菌株SN01进行表达，成功使Ile转化为4-HIL，实现了4-HIL的合成；在摇瓶发酵144 h后，SN01的4-HIL浓度达到了（65.44±2.27）mmol/L[12]。但是，后续研究发现在产物的合成过程中还伴随着20 mmol/L左右的副产物赖氨酸（lysine，Lys）的生成，因此，又在SN01的*dapA*基因前加入了一段可阻止*dapA*表达的核糖开关（Lys-OFF），将副产物Lys的浓度降至6 mmol/L左右[13]，相关代谢途径见图1（a）。

在利用*C. glutamicum*生产4-HIL的过程中，需要Ile、氧气和α-酮戊二酸作为底物，由于SN01是Ile高产菌株，首先考虑到需加强IDO的表达和氧气的供应。因此，利用4种不同强度的Ile激活型启动子$P_{brnFE}N$[14]上调*ido*和*vgb*基因[15]的表达。重组后的细胞通过产生Ile可上调这2个基因的表达，从而提高IDO的反应速率并加快氧气供应，见图1（a）。拟将4种不同强度的启动子组合应用于*ido*和*vgb*基因，共构建16种质粒I_NV_R（*N*=7、D5、0、1，*R*=7、D5、0、1），见图1（b），从中选择一个最优组合的质粒用于后续试验。其次，考虑到4-HIL合成所需的底物中Ile和α-酮戊二酸都来自三羧酸循环，拟用几种强启动子上调*ppc*和*pyc*基因的表达，以此回补草酰乙酸[16-18]，增加4-HIL合成途径中的碳通量，见图1（a）。最终，通过探究重组菌株摇瓶发酵中4-HIL浓度的变化，筛选出4-HIL浓度最高的重组菌株，为4-HIL的工业化生产提供重要依据。



(a) *C. glutamicum*中4-HIL的代谢路径　　(b) I_NV_R质粒

图1　本研究中利用*C. glutamicum*生产4-HIL涉及的基因调节位点和表达质粒

Fig. 1　Gene regulatory sites and expression plasmids involved in the production of 4-HIL by *C. glutamicum* in this study

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

大肠杆菌JM109（JM109）菌株、SN01菌株：作者所在实验室保存。使用JM109进行常规基因克隆，使用SN01进行基因表达和遗传改造。采用的*C. glutamicum*各类型培养基参照文献[11]，主要分为LBB培养基、种子培养基和发酵培养基。配制培

养基所需的蛋白胨、脑心浸液、酵母提取物：英国Oxoid公司；其余试剂：青岛海博生物技术有限公司。

质粒提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、基因组提取试剂盒、T4 DNA连接酶、无缝克隆试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；RNA提取试剂盒：美国BioFlux公司；限制性内切酶、T4多聚核苷酸激酶、溶菌酶：赛默飞世尔科技（中国）有限公司；高保真*Pfx* DNA聚合酶：江苏康为世纪生物科技股份有限公司；*Taq* DNA聚合酶：天根生物科技（北京）有限公司。

1.2　仪器与设备

葡萄糖测定仪：SBA40型，山东省科学院生物研究所；高效液相色谱（HPLC）仪：Agilent 1260型，安捷伦科技（中国）有限公司；超微量分光光度计：NanoDrop 2000型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司。

1.3　方法

1.3.1　I_NV_R表达质粒的构建

研究中使用的质粒见表1。以实验室保存的pIL-$_N$I质粒[13]为模板，利用PCR扩增出4种P_{brnFE}*N-ido*片段和4种P_{brnFE}*N*片段。以pJYW4-*imi3-vgb*质粒[20]为模板，扩增出*vgb*基因片段，利用重叠PCR将*vgb*基因片段和4种P_{brnFE}*N*连接起来得到4种P_{brnFE}*N-vgb*片段。最后，通过重叠PCR和一步克隆将4种P_{brnFE}*N-ido*片段和4种P_{brnFE}*N-vgb*片段连接到pJYW5质粒上，得到16种I_NV_R质粒。

表1　本研究中使用的质粒

Table 1　Plasmids used in this study

质粒	特征	来源
pK18*mobsacB*	卡那霉素抗性（Km^R），克隆载体	作者所在实验室
pCS	氯霉素抗性（Cm^R），携带*cpf1*和sgRNA的*sacB*基因编辑辅助质粒	文献[19]
pJYW4-*imi*3-*vgb*	Km^R，质粒pJYW4携带P_{tacM}控制的*ido*、*mqo*、*ido*3和*vgb*基因	文献[20]
pIL-$_N$I	Km^R，质粒pJYW5-Lrp-P_{brnFE}*N-ido*（*N*=0、7、D5、5、1、9、13）	文献[13]
I_NV_R	Km^R，质粒pJYW5-P_{brnFE}*N-ido*-P_{brnFE}*R-vgb*	本研究
pk18-P_{ppc}∷P_{tacM}	质粒pK18*mobsacB*插入P_{ppc}上游片段、P_{tacM}和P_{ppc}下游片段	本研究
pk18-P_{ppc}∷P_{tuf}	质粒pK18*mobsacB*插入P_{ppc}上游片段、P_{tuf}和P_{ppc}下游片段	本研究
pk18-P_{ppc}∷P_{odhI}	质粒pK18*mobsacB*插入P_{ppc}上游片段、P_{odhI}和P_{ppc}下游片段	本研究
pk18-P_{ppc}∷P_{dtsR1}	质粒pK18*mobsacB*插入P_{ppc}上游片段、P_{dtsR1}和P_{ppc}下游片段	本研究
pk18-P_{pyc}∷P_{dtsR1}	质粒pK18*mobsacB*插入P_{pyc}上游片段、P_{dtsR1}和P_{pyc}下游片段	本研究

1.3.2　替换质粒的构建

研究中使用的引物见表2。利用克隆载体pK18*mobsacB*介导的*C. glutamicum*染色体编辑方法[21]，以pJYW4-*imi*3-*vgb*质粒作为模板，用引物PPC-P_{tacM}-F和PPC-P_{tacM}-R扩增出启动子P_{tacM}片段；以*C. glutamicum* ATCC13032基因组为模板扩增出P_{dtsR1}和P_{tuf}片段；以菌株SN01基因组为模板扩增出启动子P_{odhI}片段。构建pk18-P_{ppc}∷P_{tacM}替换质粒的步骤为：利用菌株SN01基因组为模板，用引物*ppc*-U-F和*ppc*-U-R、*ppc*-D-F和*ppc*-D-R分别扩增出P_{ppc}的上游同源臂和下游同源臂，利用重叠PCR技术将P_{ppc}上游片段、启动子P_{tacM}片段和P_{ppc}下游片段进行连接，然后利用一步克隆技术将重叠片段插入pK18*mobsacB*质粒得到pk18-P_{ppc}∷P_{tacM}质粒。用与上述类似的构建方式构建质粒pk18-P_{ppc}∷P_{tuf}、pk18-P_{ppc}∷P_{odhI}、pk18-P_{ppc}∷P_{dtsR1}和pk18-P_{pyc}∷P_{dtsR1}。

1.3.3　替换菌株的构建

研究中使用的菌株见表3。为了将*ppc*基因的启动子替换为4种组成型强启动子（P_{tacM}、P_{tuf}、P_{dtsR1}、P_{odhI}），并将*pyc*基因的启动子替换为P_{dtsR1}，使用CRISPR-Cpf1辅助的SacB编辑系统[20]将上述构建的pk18-P_{ppc}∷P_{tacM}、pk18-P_{ppc}∷P_{tuf}、pk18-P_{ppc}∷P_{odhI}、pk18-P_{ppc}∷P_{dtsR1}和pk18-P_{pyc}∷P_{dtsR1}分别电转化进*C. glutamicum* D-RS（D-RS），为替换P_{ppc}或P_{pyc}启动子做准备。经过单交换、pCS质粒辅助双交换、pCS质粒的去除，得到相应替换菌株D-RS P_{tacM}-*ppc*、D-RS P_{tuf}-*ppc*、D-RS P_{odhI}-*ppc*、D-RS P_{dtsR1}-*ppc*和D-RS P_{dtsR1}-*pyc*。然后将质粒I_7V_7电转入上述替换菌株中，得到重组菌株RS-MP、RS-FP、RS-OP、RS-DP和RS-DY。此处4种启动子的表达强度为[22]：P_{tacM}

表 2 本研究中使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	5′—3′序列
P_{brnFE}-F	ACAAGGAGACCAAGTAAGGCGCTAAGCTCCGCAATA
P_{brnFE}-R	CTAATAACCCTCCTTCTCTCCAGGCTTGAATGAATC
ido-F	AGAAGGAGGGTTATTAG**ATG**TTAGACCAGCAAACC
ido-R	AGCTCGAATTCGTCGAC**TTA**TTCAACCGCTTGAGCG
PPC-P_{tacM}-F	AGAAGTGCGGTTTTGATGAGTGAGCTGTTGACAATTAATC
PPC-P_{tacM}-R	TCATCTAATAACCCTCCTTCTAATTGTTATCCGCTCACAAT
PPC-P_{tuf}-F	AGAAGTGCGGTTTTGATGAGTAAGTGGGGTAGCGGCTTGT
PPC-P_{tuf}-R	TCATCTAATAACCCTCCTTCTAATTGGTTTTGCTTTCACTG
PPC-P_{dtsR1}-F	AGAAGTGCGGTTTTGATGAGCACGCCCAAAAAGTTTTACC
PPC-P_{dtsR1}-R	TCATCTAATAACCCTCCTTCTTGTTTTGAAATCGTAGCGGT
PPC-P_{odhI}-F	AGAAGTGCGGTTTTGATGAGCGATCACGAGGGGGCACATT
PPC-P_{odhI}-R	TCATCTAATAACCCTCCTTCTTTAAACTTCCTCCGTGTCGA
PYC-P_{dtsR1}-F	AGTCGTGCAGGTCAGGGGACACGCCCAAAAAGTTTTACC
PYC-P_{dtsR1}-R	ACACCTAATAACCCTCCTTCTTGTTTTGAAATCGTAGCGGT
ppc-U-F	GTACCCGGGGATCCTCTAGACTCCCACATCTCCACCGG
ppc-U-R	CTCATCAAAACCGCACTTCT
ppc-D-F	AGAAGGAGGGTTATTAG**ATG**ACTGATTTTTTACGCGATGAC
ppc-D-R	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGGAGATGCGTATGGAGTAAAG
pyc-U-F	GTACCCGGGGATCCTCTAGATGAACTCGGCGTCAAAGTC
pyc-U-R	TCCCCTGACCTGCACGACT
pyc-D-F	AGAAGGAGGGTTATTAG**GTG**TCGACTCACACATCTTC
pyc-D-R	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGGGGCGGAAGCCGTTGTTTG

注：粗体表示起始密码子和终止密码子；单下划线为酶切位点；双下划线为核糖体结合位点。

表 3 本研究中使用的菌株

Table 3 Strains used in this study

菌株	描述	来源
JM109	大肠杆菌，用于基因克隆	作者所在实验室
SN01	异亮氨酸高产菌株 *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*	作者所在实验室
SN02	SN01 携带 pJYW4-*ido*	文献[12]
SN-I_NV_R	SN01 携带 I_NV_R 质粒（N=7、D5、0、1，R=7、D5、0、1）	本研究
D-RS	SN01 染色体上 *dapA* 基因前整合 Lys-OFF 核糖开关	文献[13]
D-RS P_{tacM}-*ppc*	D-RS P_{ppc}::P_{tacM}	本研究
D-RS P_{tuf}-*ppc*	D-RS P_{ppc}::P_{tuf}	本研究
D-RS P_{odhI}-*ppc*	D-RS P_{ppc}::P_{odhI}	本研究
D-RS P_{dtsR1}-*ppc*	D-RS P_{ppc}::P_{dtsR1}	本研究
D-RS P_{dtsR1}-*pyc*	D-RS P_{pyc}::P_{dtsR1}	本研究
RS-MP	D-RS P_{ppc}::P_{tacM} 携带 I_7V_7	本研究
RS-FP	D-RS P_{ppc}::P_{tuf} 携带 I_7V_7	本研究
RS-OP	D-RS P_{ppc}::P_{odhI} 携带 I_7V_7	本研究
RS-DP	D-RS P_{ppc}::P_{dtsR1} 携带 I_7V_7	本研究
RS-DY	D-RS P_{pyc}::P_{dtsR1} 携带 I_7V_7	本研究

最强，约是P_{tuf}的5倍，而P_{tuf}、P_{dtsR1}、P_{odhI}这3种启动子强度接近。

1.3.4　摇瓶发酵

挑取甘油管保存菌株涂布在含有30 μg/mL卡那霉素的LBB平板上，30 ℃恒温培养箱活化36 h。将活化的菌苔全部接种到含有30 μg/mL卡那霉素的种子培养基中培养，30 ℃、200 r/min培养18 h。当菌液的初始OD_{562}值为1.8时，将种子培养基中的菌液接种到发酵培养基中，30 ℃、200 r/min培养，每隔24 h取样，共培养144 h。测定发酵过程中氨基酸浓度、OD_{562}值、葡萄糖质量浓度的变化[19]。

1.3.5　发酵参数的测定

耗糖的测定：利用葡萄糖测定仪测定剩余葡萄糖的质量浓度。OD_{562}值的测定：用超微量分光光度计测定在562 nm下，发酵液稀释100倍后的OD_{562}值。氨基酸浓度的测定：首先用体积分数5%的三氯乙酸将发酵液中的蛋白质进行沉淀，然后在12 000 r/min下离心30 min，取上清液，用HPLC仪测定氨基酸浓度[14]。

2　结果与讨论

2.1　用Ile激活型启动子动态上调*ido*和*vgb*基因的表达

IDO是催化Ile合成4-HIL的关键酶。*ido*基因的表达强度对于*C. glutamicum*中4-HIL的生产至关重要。作者所在课题组之前的工作中，通过静态代谢策略不断地提高IDO的表达水平和活性，但是*ido*基因的组成型表达会给细胞带来较大的代谢负担，胞内资源会被持续利用去合成IDO。作者所在课题组前期采用了几种不同强度的Ile激活型传感器Lrp-$P_{brnFE}N$（N=0、1、D5、5、7、9、13）来上调*ido*基因的表达，最终得到了一株能提高4-HIL浓度的菌株*C. glutamicum* D-$_1$I；在发酵144 h后，其4-HIL浓度达到了111.08 mmol/L[13]。*vgb*编码的VHb可以增加细胞对氧气的摄取，给4-HIL的生产提供底物氧气。作者在之前的基础上，用4种不同强度的$P_{brnFE}N$（N=0、1、D5、7）分别上调*ido*基因和*vgb*基因的表达，旨在探究用$P_{brnFE}N$上调2个基因表达后是否能进一步提高4-HIL浓度。

2.1.1　动态上调*ido*和*vgb*基因的表达对菌株生长和耗糖的影响

使用的Ile激活型启动子包括天然启动子P_{brnFE}0、强启动子P_{brnFE}7以及中等强度的启动子P_{brnFE}D5和P_{brnFE}1。用这4种启动子构建了16种质粒，分别调节*ido*和*vgb*基因的表达，并将上述质粒电转入SN01得到16株菌株SN-I_NV_R。将这些菌株进行摇瓶发酵，以SN02作为对照，结果见图2。可看出在整个发酵过程中，有几株菌株的生长优于SN02，例如，在发酵144 h后，SN-I_7V_7和SN-I_1V_7的OD_{562}值达到了90~100，比对照菌株高30%左右。P_{brnFE}7属于强启动子，因此说明增加菌体对氧气的摄入更有利于菌体的生长。另外，$P_{brnFE}N$调控的双基因过表达菌株在耗糖方面与对照菌株相比无明显差异，基本都在0~72 h时迅速耗糖，在96 h时葡萄糖消耗殆尽。综上，在*ido*、*vgb*双基因调控下，菌株的生长会受到不同程度的影响。

2.1.2　动态上调*ido*和*vgb*基因的表达对氨基酸生产的影响

由于4-HIL生产阶段在菌体生长稳定期的后期，故测定了发酵144 h后，发酵液中4-HIL、Ile和Lys的浓度。结果如表4所示，试验菌株SN-I_0V_R不仅会产生4-HIL，还会剩余一些Ile，而其他菌株Ile的剩余量很少。另外，生产的4-HIL浓度最高的2株菌株是SN-I_7V_7和SN-I_7V_{D5}，浓度分别达到（109.14±1.03）mmol/L和（108.53±10.97）mmol/L，相比于对照菌株SN02，浓度分别提高了46.69%和45.87%。P_{brnFE}7是4种Ile激活型启动子中最强的启动子。这表明通过使用Ile激活型强启动子加强*ido*和*vgb*基因的表达，可以增强4-HIL的生产能力，并且不会给菌体生长带来负担，还可提高菌体密度。根据上述研究结果，选择效果最好的菌株中所携带的质粒I_7V_7进行后续试验。

2.2　用不同强度启动子上调*ppc*基因的表达

上述表达质粒的构建和筛选是在前人基础上进行的，之前作者所在课题组已进行过*ido*和*odhI*等基因的共表达，上述研究主要考察了*ido*和*vgb*基因共表达对4-HIL浓度的影响并筛选出优良质粒。下一步主要研究内容为将*C. glutamicum*基因组上的*ppc*基因过表达。*ppc*基因编码PEPC，该酶催化磷酸烯醇式丙酮酸发生羧化反应得到草酰乙酸，该路径可以将多余的二氧化碳中的碳源重新补充到代谢途径中，减少碳源损失[23]。这条代谢途径可以为4-HIL的生产增加底物供应，并且减

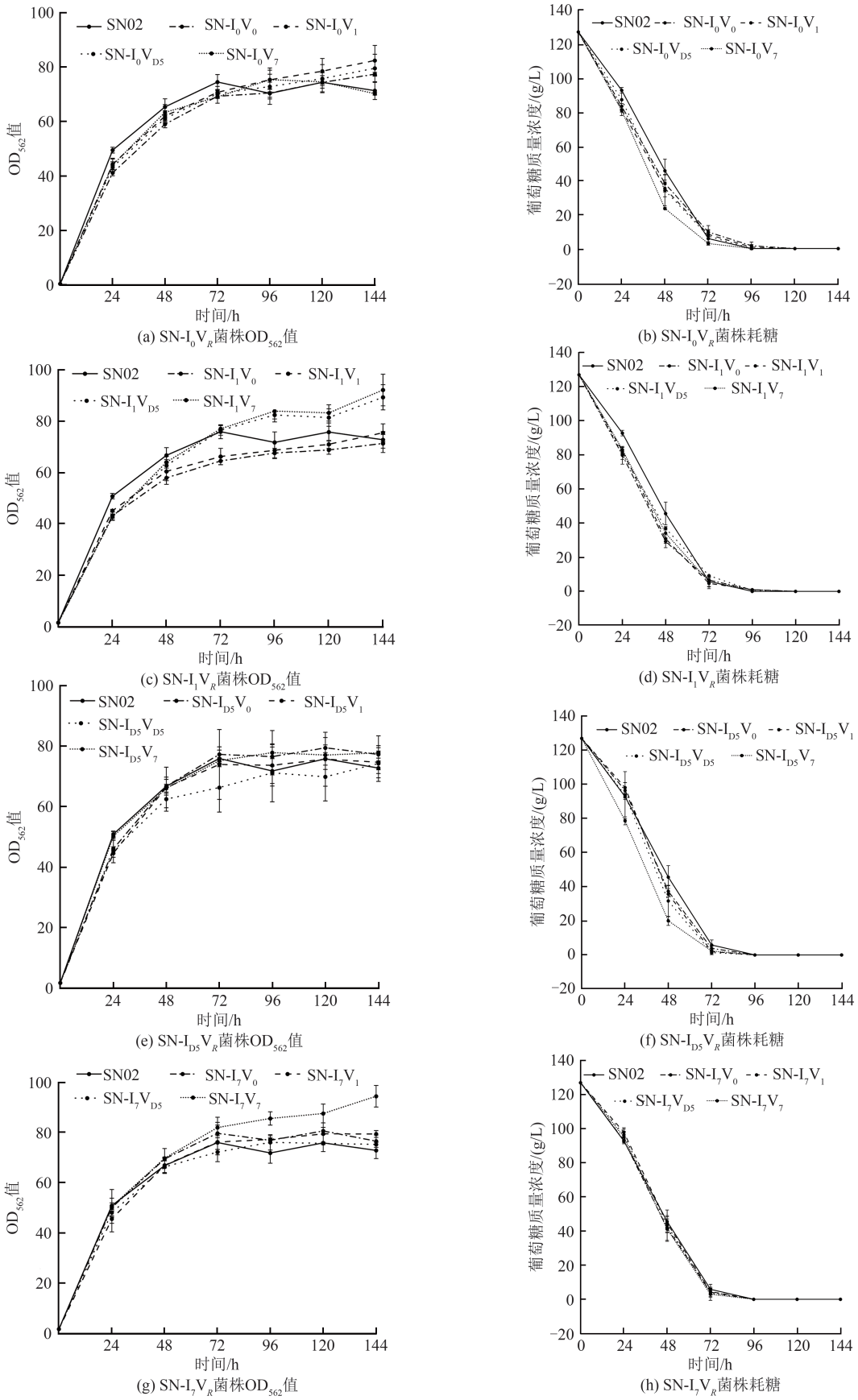


图 2　菌株 SN-$I_N V_R$ 发酵 144 h 的生长和耗糖情况

Fig. 2　Growth and sugar consumption of strains SN-$I_N V_R$ after 144 h of fermentation

表4　发酵144 h后菌株SN-I_NV_R的4-HIL、Ile和Lys浓度

Table 4　Concentrations of 4-HIL, Ile, and Lys of strains SN-I_NV_R after 144 h of fermentation　　单位：mmol/L

菌株	4-HIL浓度	Ile浓度	Lys浓度
SN02	74.40±4.16	1.43±0.15	19.22±1.22
SN-I_0V_0	16.92±0.56	61.06±6.28	22.83±1.11
SN-I_0V_1	39.47±3.82	59.92±3.17	16.53±0.64
SN-I_0V_{D5}	15.59±2.61	56.83±11.30	25.66±1.38
SN-I_0V_7	35.50±1.53	58.53±4.10	16.79±0.52
SN-I_1V_0	99.35±3.14	0.63±0.06	23.80±0.58
SN-I_1V_1	85.56±4.07	0.53±0.11	20.04±0.63
SN-I_1V_{D5}	73.25±1.91	0.74±0.02	26.96±1.02
SN-I_1V_7	90.02±8.77	0.57±0.10	22.00±1.59
SN-I_7V_0	106.49±3.67	12.85±1.35	11.28±0.58
SN-I_7V_1	64.24±5.51	3.08±0.18	23.05±1.73
SN-I_7V_{D5}	108.53±10.97	0.74±0.11	28.23±1.81
SN-I_7V_7	109.14±1.03	1.61±0.09	17.57±2.20
SN-$I_{D5}V_0$	61.70±1.11	2.90±0.22	18.41±0.71
SN-$I_{D5}V_1$	95.64±1.16	0.75±0.13	12.65±1.71
SN-$I_{D5}V_{D5}$	78.75±15.80	38.73±1.77	16.84±0.64
SN-$I_{D5}V_7$	55.18±6.59	59.62±10.76	13.74±8.58

少发酵过程中产生大量气泡这一不利因素，因为气泡可能是由产生的二氧化碳所致。因此，试验采用了4种强启动子来上调*ppc*基因的表达，分别为P_{tacM}、P_{tuf}、P_{odhI}、P_{dtsR1}。P_{tacM}来自*C. glutamicum*的表达质粒，P_{tuf}、P_{odhI}、P_{dtsR1}[22]来自*C. glutamicum*菌株的染色体。探究不同启动子上调*ppc*基因表达对菌体生长和4-HIL浓度的影响，筛选出上调*ppc*基因最适合的启动子。此外，上一节中为便于研究，选用了原始菌株进行质粒的筛选试验，主要目的是筛选出最优质粒，但该原始菌株会伴随少量的Lys副产物产生，因此后续研究需要舍弃。后续采用D-RS菌株作为染色体基因整合的出发菌株，D-RS菌株是在SN01菌株的*dapA*前加入了一段Lys-OFF核糖开关片段，与SN01在同等情况下的4-HIL浓度接近，但Lys浓度从30.6 mmol/L降低到16.3 mmol/L[13]。

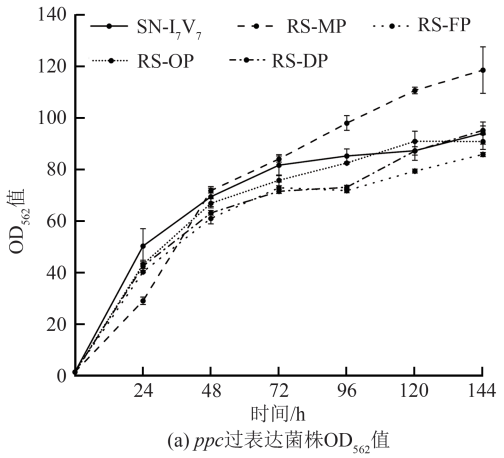
2.2.1　上调*ppc*基因的表达对菌株生长和耗糖的影响

*ppc*过表达菌株发酵144 h的生长和耗糖情况见图3（a）~（b）。可以看出使用强启动子过表达*ppc*基因后，有几株改造菌株的生长情况优于对照菌株SN-I_7V_7，例如，在发酵144 h后，RS-MP的OD_{562}值达到了118.8，相比对照菌株提高了25%。其余改造菌株的最终OD_{562}值也都与对照菌株接近，在90左右。这说明上调*ppc*基因表达有助于菌体的正常生长。在耗糖方面，所有菌株的耗糖趋势基本一致：在0~72 h时迅速耗糖，在96 h时耗光培养基中的葡萄糖。因此，上调*ppc*的表达会促进菌体生长，并且RS-MP的生长情况最好。

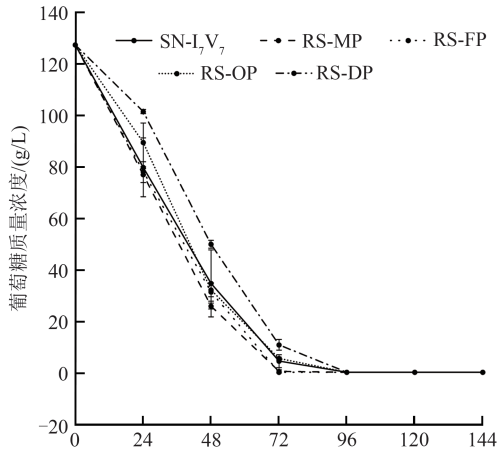
2.2.2　上调*ppc*基因的表达对4-HIL浓度的影响

测定发酵液中4-HIL、Ile、Lys的浓度。如图3（c）所示，4-HIL浓度最高的菌株为RS-MP，达到了（145.76±6.04）mmol/L；其次是RS-OP，4-HIL浓度达到了（113.70±8.68）mmol/L；这2株菌株的4-HIL浓度比对照菌株分别提高了33.55%和4.17%；其余菌株的4-HIL浓度与对照菌株相差较小，都在100 mmol/L左右。在Ile产生方面，所有改造菌株的Ile浓度都可以忽略不计，说明Ile传感器达到了预期的效果。另外，由于使用了D-RS作为出发菌株，改造菌株的Lys浓度都很低，也可以忽略不计。综上所述，通过P_{tacM}过表达*ppc*基因的改造菌株能增加4-HIL的浓度，并且使副产物Lys浓度降低，因此具有生产4-HIL的潜力。

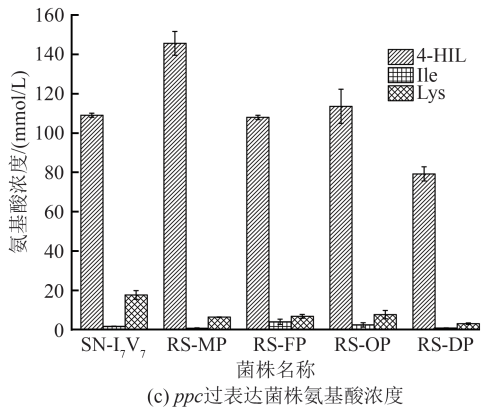
作者所得菌株RS-MP摇瓶发酵的4-HIL浓度比Shi等[24]在2016年报道的基于质粒的*ppc*过表达菌株的4-HIL浓度提高了（50.04±4.52）mmol/L，



(a) *ppc*过表达菌株OD_{562}值



(b) *ppc*过表达菌株耗糖



(c) *ppc*过表达菌株氨基酸浓度

图 3 *ppc*过表达菌株发酵 144 h 的生长、耗糖情况和氨基酸浓度

Fig. 3 Growth, sugar consumption, and amino acid concentrations of *ppc*-overexpressing strains after 144 h of fermentation

比 Tan 等[14]在 2020 年利用动态工程改造的菌株的 4-HIL 浓度提高了（10.46±6.04）mmol/L。但作者仅探究了菌株在摇瓶上的 4-HIL 浓度变化（课题组小试），由于摇瓶本身是固定体系，且存在空间上的局限性，因此限制了菌株的生长状态和菌株活性，致使 4-HIL 浓度偏低：RS-MP 在摇瓶中的 4-HIL 浓度低于孟静等[25]的研究中菌株 HIL18 在发酵罐条件下的 4-HIL 浓度（294.56 mmol/L）。而在大型生物反应器中，可以采用 pH 更可控的发酵，并能通过改变转速、通气量来调节溶氧量，还可以通过补料来延长菌体的生长周期[26]，因此在生物反应器放大培养菌株 RS-MP 条件下，4-HIL 浓度可能会进一步提高。虽然作者没有用中试或大规模发酵罐考察菌体 RS-MP 对于 4-HIL 浓度的影响情况，研究中的 4-HIL 浓度也不是目前报道的最高浓度，但该研究结果给 4-HIL 的生物发酵生产提供了研究思路，试验中得到的 RS-MP 对后续 4-HIL 的研究也会有一定促进作用。

2.3 用 P_{dtsR1} 启动子上调 *pyc* 基因的表达

经过上述对 *ppc* 基因的研究发现，加强回补途径可以增加 4-HIL 浓度。因此，又考虑到另一条类似的回补途径：从丙酮酸到草酰乙酸的回补途径。该途径由丙酮酸羧化酶催化，丙酮酸羧化酶由 *pyc* 基因编码。该途径的加强也是为了增加 4-HIL 生产的底物供应，并减少碳源的损失。但在实际试验过程中，只成功构建了一株改造菌株 D-RS P_{dtsR1}-*pyc*，采用其他类型的强启动子无法进行染色体整合。这可能是因为其他类型的启动子不适合用来过表达 *pyc* 基因，整合后会引起菌体负担，致使菌体死亡。

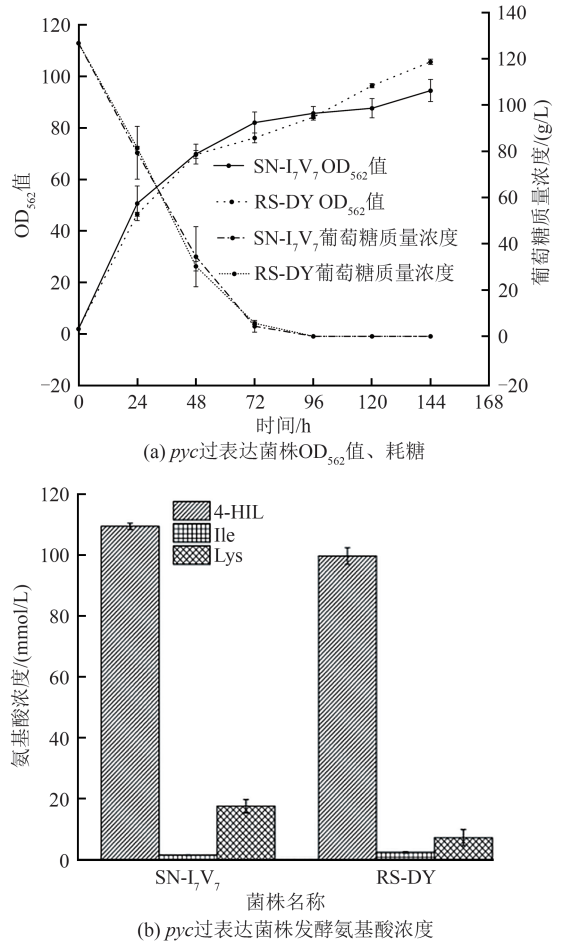
2.3.1 上调 *pyc* 基因的表达对菌株生长的影响

pyc 过表达菌株发酵 144 h 的生长和耗糖情况见图 4（a）。在 0~72 h 菌体生长阶段，RS-DY 的 OD_{562} 值达到了 70 以上，表示其生长状态正常。在发酵 144 h 时，RS-DY 的最终 OD_{562} 值为 105.5，比对照菌株提高了 11%。这说明利用强启动子 P_{dtsR1} 上调 *pyc* 基因的表达不会对菌株生长产生负面影响，甚至还能促进其生长。在耗糖方面，RS-DY 与对照菌株类似，都在 0～72 h 时迅速耗糖，在 96 h 时耗光培养基中的葡萄糖。

2.3.2 上调 *pyc* 基因的表达对 4-HIL 浓度的影响

pyc 过表达菌株发酵 144 h 的相关氨基酸浓度见图 4（b）。RS-DY 在发酵 144 h 后的 4-HIL 浓度只有（99.44±2.74）mmol/L，相比于对照菌株并没有提升。在 Ile 和副产物 Lys 浓度方面，RS-DY 与 *ppc* 启动子调控菌株一致，由于都采用了相同的出

发菌株D-RS和携带相同Ile激活型启动子的*ido*、*vgb*表达质粒，因此RS-DY菌株剩余的Ile较少，且副产物Lys的浓度也低于10 mmol/L。综上所述，采用P_{dtsR1}启动子上调*pyc*基因的表达并未得到理想结果。



(a) *pyc*过表达菌株OD_{562}值、耗糖

(b) *pyc*过表达菌株发酵氨基酸浓度

图4　*pyc*过表达菌株发酵144 h的生长、耗糖情况和氨基酸浓度

Fig. 4　Growth, sugar consumption, and amino acid concentrations of *pyc*-overexpressing strains after 144 h of fermentation

3　结论

4-HIL作为一种具有独特生物活性的非蛋白质氨基酸，能够促进胰岛素分泌、改善胰岛素敏感性。*C. glutamicum*作为一种合成氨基酸的优势菌株，具备可高密度培养、菌种安全的特点，是生产4-HIL的优良宿主。作者在Ile高产菌株SN01中引入了*ido*和*vgb*基因，并用Ile激活型启动子$P_{brnFE}N$调节这2个基因的表达，通过调控Ile浓度动态加强了IDO酶促反应速率和氧气供应。然后利用P_{tacM}启动子过表达了菌株自身的*ppc*基因，加强了草酰乙酸回补途径，将多余的二氧化碳中的碳源重新补充到代谢途径中，减少了碳源损失，进一步增加了4-HIL浓度。最终的优势菌株RS-MP，在发酵144 h后的4-HIL浓度达到了（145.76±6.04）mmol/L，且基本无副产物的生成。该研究为实现4-HIL的生物绿色高效合成提供了科学依据。

参考文献

[1] AL-HABORI M, RAMAN A. Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek[J]. Phytotherapy Research, 1998, 12(4): 233-242.

[2] NEELAKANTAN N, NARAYANAN M, DE SOUZA R J, et al. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) intake on glycemia: a meta-analysis of clinical trials[J]. Nutrition Journal, 2014, 13: 7.

[3] FOWDEN L, PRATT H M, SMITH A. 4-Hydroxyisoleucine from seed of *Trigonella foenum-graecum*[J]. Phytochemistry, 1973, 12(7): 1707-1711.

[4] GADDAM A, GALLA C, THUMMISETTI S, et al. Role of fenugreek in the prevention of type 2 diabetes mellitus in prediabetes [J]. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 2015, 14: 74.

[5] JETTÉ L, HARVEY L, EUGENIK, et al. 4-Hydroxyisoleucine: a plant-derived treatment for metabolic syndrome [J]. Current Opinion in Investigational Drugs, 2009, 10(4): 353-358.

[6] KODERA T, SMIRNOV S V, SAMSONOVA N N, et al. A novel *L*-isoleucine hydroxylating enzyme, *L*-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxyisoleucine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 390(3): 506-510.

[7] HIBI M, KAWASHIMA T, KODERA T, et al. Characterization of *Bacillus thuringiensis L*-isoleucine dioxygenase for production of useful amino acids [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(19): 6926-6930.

[8] OGAWA J, KODERA T, SMIRNOV S V, et al. A novel *L*-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89: 1929-1938.

[9] 张星元，李秀敏，杨毅，等. 谷氨酸棒杆菌的氨基酸输送系统的存在、功能及其在氨基酸生产上的重要性[J]. 无锡轻工大学学报，2004，23(3)：105-110.
ZHANG X Y, LI X M, YANG Y, et al. The occurrence and functions of amino acid transport proteins in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Wuxi University

of Light Industry，2004，23(3)：105-110.(in Chinese)

[10] 王路平，徐建中，张伟国. 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[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(4)：44-57.
WANG L P，XU J Z，ZHANG W G. Different NADPH levels affected growth and metabolites accumulation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(4)：44-57.(in Chinese)

[11] 张媛媛，刘建忠，江文明. 定向诱变谷氨酸棒杆菌13032产*L*-鸟氨酸的研究[J]. 现代食品科技，2010，26(12)：1330-1333，1344.
ZHANG Y Y，LIU J Z，JIANG W M. Directed screening of *L*-orthnithine-producing mutant from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032[J]. Modern Food Science and Technology，2010，26(12)：1330-1333，1344.(in Chinese)

[12] SHI F，NIU T F，FANG H M. 4-Hydroxyisoleucine production of recombinant *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* under optimal corn steep liquor limitation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2015，99：3851-3863.

[13] LAI W M，SHI F，TAN S Y，et al. Dynamic control of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis by multi-biosensor in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2022，106(13)：5105-5121.

[14] TAN S Y，SHI F，LIU H Y，et al. Dynamic control of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis by modified *L*-isoleucine biosensor in recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology，2020，9(9)：2378-2389.

[15] HORNG Y T，CHANG K C，CHIEN C C，et al. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production *via* the coexpressed *phaCAB* and *vgb* genes controlled by arabinose P_{BAD} promoter in *Escherichia coli*[J]. Letters in Applied Microbiology，2010，50(2)：158-167.

[16] LIU W，ZHANG R B，WEI M M，et al. Increasing the pyruvate pool by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase or triosephosphate isomerase enhances phloroglucinol production in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters，2020，42(4)：633-640.

[17] WALKER R P，CHEN Z H，FAMIANI F. Gluconeogenesis in plants：a key interface between organic acid/amino acid/lipid and sugar metabolism[J]. Molecules，2021，26(17)：5129.

[18] GERSTMEIR R，WENDISCH V F，SCHNICKE S，et al. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology，2003，104(1)：99-122.

[19] CHEN R，SHI F，XIANG Y H，et al. Establishment of CRISPR-Cpf1-assisted gene editing tool and engineering of 4-hydroxyisoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology，2023，39：266.

[20] SHI F，ZHANG S P，LI Y F，et al. Enhancement of substrate supply and *ido* expression to improve 4-hydroxyisoleucine production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2019，103：4113-4124.

[21] SCHÄFER A，TAUCH A，JÄGER W，et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19：selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Gene，1994，145(1)：69-73.

[22] SHI F，LUAN M Y，LI Y F. Ribosomal binding site sequences and promoters for expressing glutamate decarboxylase and producing γ-aminobutyrate in *Corynebacterium glutamicum*[J]. AMB Express，2018，8(1)：61.

[23] PETERS-WENDISCH P G，KREUTZER C，KALINOWSKI J，et al. Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*：characterization，expression and inactivation of the *pyc* gene[J]. Microbiology，1998，144(4)：915-927.

[24] SHI F，FANG H M，NIU T F，et al. Overexpression of *ppc* and *lysC* to improve the production of 4-hydroxyisoleucine and its precursor *L*-isoleucine in recombinant *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum*[J]. Enzyme and Microbial Technology，2016，87/88：79-85.

[25] 孟静，芦楠，朱福周，等. 两阶段溶氧控制及$FeSO_4$添加对谷氨酸棒杆菌合成4-羟基异亮氨酸的影响[J]. 食品与发酵工业，2019，45(12)：1-6.
MENG J，LU N，ZHU F Z，et al. Effects of two-stage DO control and $FeSO_4$ addition on 4-hydroxyisoleucine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Food and Fermentation Industries，2019，45(12)：1-6.(in Chinese)

[26] 邓毛程，吴亚丽，梁世中，等. 高生物素谷氨酸发酵中溶氧水平与生物素用量的研究[J]. 食品与机械，2008，24(3)：10-13，69.
DENG M C，WU Y L，LIANG S Z，et al. Study on dissolved oxygen levels and biotin amount in glutamic acid fermentation with high concentration biotin[J]. Food & Machinery，2008，24(3)：10-13，69.(in Chinese)

（责任编辑：周玥）