

谷氨酸棒状杆菌合成L-高丝氨酸的代谢改造与发酵条件探究

郭秋爽，包倩倩，许银彪，蔡帅，孙杨，李华，刘宇鹏

Metabolic Transformation and Fermentation Condition of L-homoserine Synthesis by *Corynebacterium glutamicum*

GUO Qiushuang, BAO Qianqian, XU Yinpiao, CAI Shuai, SUN Yang, LI Hua, and LIU Yupeng

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030161>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

谷氨酸棒状杆菌高效发酵谷氨酸的关键分子机理研究进展

Research Progress on Key Molecular Mechanism of High Yield Glutamic Acid Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*
食品工业科技. 2019, 40(5): 311-315,321 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.053>

短梗霉筛选鉴定及溶氧对其发酵影响

Screening and identification of *Aureodacidium* spp. and the effect of dissolved oxygen on fermentation
食品工业科技. 2018, 39(6): 102-107,113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.06.019>

溶氧对耶氏解脂酵母油脂积累和柠檬酸分泌的影响

Influence of dissolved oxygen on accumulation of lipid and secretion of citric acid by *Yarrowia lipolytica* fermentation
食品工业科技. 2018, 39(6): 121-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.06.022>

丝氨酸吸收系统多基因敲除对大肠杆菌产L-丝氨酸的影响

Effect of multi-gene knockout of L-serine uptake system on L-serine production in *Escherichia coli*
食品工业科技. 2017(16): 106-111 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.021>

L-谷氨酸对樱桃番茄果实病程相关蛋白的影响

Effect of L-glutamate on Pathogenesis-related Proteins in Cherry Tomato Fruit
食品工业科技. 2020, 41(14): 254-259 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.041>

色氨酸转运系统改造对大肠杆菌产L-色氨酸的影响

Effect of engineering of L-tryptophan transport system on L-tryptophan production in *Escherichia coli*
食品工业科技. 2017(15): 157-163 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.15.030>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

郭秋爽, 包倩倩, 许银彪, 等. 谷氨酸棒状杆菌合成 L-高丝氨酸的代谢改造与发酵条件探究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 133–140. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030161

GUO Qiushuang, BAO Qianqian, XU Yinbiao, et al. Metabolic Transformation and Fermentation Condition of L-homoserine Synthesis by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(3): 133–140. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030161

· 生物工程 ·

谷氨酸棒状杆菌合成 L-高丝氨酸的代谢改造 与发酵条件探究

郭秋爽^{1,2}, 包倩倩^{1,2}, 许银彪^{1,2}, 蔡帅^{1,2}, 孙杨^{1,2}, 李华^{1,2,*}, 刘宇鹏^{1,2,*}

(1.河南大学生命科学学院微生物工程研究所, 河南开封 475004;
2.河南省应用微生物工程研究中心, 河南开封 475004)

摘要: 目的: 本研究以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 为底盘细胞, 构建 1 株 L-高丝氨酸合成菌株并分析溶氧环境对其产物合成的影响。方法: 首先通过外源添加 0~40 g/L 的 L-高丝氨酸分析谷氨酸棒状杆菌的产物耐受性; 随后, 通过基因 *thrB* 敲除阻断 L-高丝氨酸的降解途径, 获得谷氨酸棒状杆菌重组菌 H1; 在此基础上利用挡板摇瓶进行细胞培养以增强发酵过程中氧气供给能力。结果: 与大肠杆菌相比, 谷氨酸棒状杆菌对 L-高丝氨酸具有更强耐受性。研究中通过敲除基因 *thrB* 构建了 L-苏氨酸缺陷型谷氨酸棒状杆菌重组菌 H1, 发现基础培养基中加入 0.5 g/L 的 L-苏氨酸后, 该重组菌生长恢复正常水平。挡板摇瓶条件下重组菌 H1 的 L-高丝氨酸产量增加至 836.7 mg/L, 较普通摇瓶产量 44.6 mg/L 提高了 17.76 倍。结论: 通过阻断 L-苏氨酸的合成, 成功构建 L-高丝氨酸合成菌株谷氨酸棒状杆菌 H1, 并且发现利用挡板摇瓶增强发酵过程中供氧能力是促进谷氨酸棒状杆菌高效合成 L-高丝氨酸的有效手段, 为后续提高 L-高丝氨酸发酵产量提供了参考。

关键词: L-高丝氨酸, 谷氨酸棒状杆菌重组菌, 强耐受性, 溶氧

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)03-0133-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030161

本文网刊:



Metabolic Transformation and Fermentation Condition of L-homoserine Synthesis by *Corynebacterium glutamicum*

GUO Qiushuang^{1,2}, BAO Qianqian^{1,2}, XU Yinbiao^{1,2}, CAI Shuai^{1,2}, SUN Yang^{1,2}, LI Hua^{1,2,*}, LIU Yupeng^{1,2,*}

(1. Institute of Microbial Engineering, College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Henan Applied Microbial Engineering Research Center, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Objective: In this study, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 was used as the chassis cell for synthesizing L-homoserine and analyzing the effect of dissolved oxygen on product synthesis. Methods: First, the product tolerance of *C. glutamicum* was analyzed by exogenously adding 0~40 g/L L-homoserine. Second, the degradation pathway of L-homoserine was blocked by gene *thrB* knockout, namely *C. glutamicum* recombinant strain H1. On this basis, the shake flask with baffles was used for cell culture to enhance oxygen supply capacity in the fermentation process. Results: Compared with *Escherichia coli*, *C. glutamicum* had a stronger tolerance to L-homoserine. In the study, *C. glutamicum* recombinant strain H1 was constructed by deleting the gene *thrB*. It was found that the growth of recombinant strain H1 returned to normal after adding 0.5 g/L L-threonine in the basal medium. The L-homoserine production of recombinant strain H1 increased to 836.7 mg/L using shake flask with baffles, which was 17.76 times higher than that using ordinary shake flask, which was 44.6 mg/L. Conclusion: *C. glutamicum* recombinant strain H1 was successfully constructed for

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (202300410055); 河南省重点研发与推广专项 (No.192102110179)。

作者简介: 郭秋爽 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 代谢工程改造, E-mail: 1528693877@qq.com。

* 通信作者: 李华 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 工业微生物理性设计育种和发酵工程研究, E-mail: 10140152@vip.henu.edu.cn。

刘宇鹏 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程和生物催化研究, E-mail: liuyupenglw@126.com。

producing L-homoserine via blocking the synthesis of L-threonine. It was found that the using of shake flask with baffles to enhance the oxygen supply capacity during fermentation was an effective means to promote the production of L-homoserine by *C. glutamicum*. This study provides a reference for improving L-homoserine production subsequently.

Key words: L-homoserine; *Corynebacterium glutamicum* recombinant strain; strong tolerance; dissolved oxygen

L-高丝氨酸又称 2-氨基-4 羟基丁酸, 属于天冬氨酸家族, L-高丝氨酸虽然不是合成蛋白质的氨基酸, 但却具有丰富的生物活性, L-高丝氨酸是合成 L-苏氨酸、L-蛋氨酸、L-异亮氨酸的前体, 同时 L-高丝氨酸在医药、农业、食品、化工等领域都具有十分重要的应用价值^[1-3]。目前国内外 L-高丝氨酸的生产方法主要是化学法和微生物发酵法。化学法过程复杂繁琐, 原料用量大, 生产成本高, 合成效率低。与之相比, 微生物发酵法具有生产成本低, 反应条件温和, 对环境友好等优势, 是未来 L-高丝氨酸工业化生产的发展趋势, 具有较大的研究价值^[4-6]。研究报道, 菌株自身不能积累 L-高丝氨酸, 合成的 L-高丝氨酸主要被分解为苏氨酸, 阻断苏氨酸合成途径是代谢改造以 L-高丝氨酸或其下游的蛋氨酸等为目的产物的基本策略之一^[7]。

目前, 微生物发酵生产 L-高丝氨酸的研究方向主要集中在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。由于遗传背景清晰, *E. coli* 相关的 L-高丝氨酸合成研究较为详细。Li 等^[8] 和 Liu 等^[9] 报道通过代谢工程改造 *E. coli*, 构建了 L-高丝氨酸高产菌 HM5, 发酵 45 h 合成 39.9 和 37.6 g/L 的 L-高丝氨酸。为解决发酵过程中添加 L-苏氨酸等物质导致成本提高的问题, 张宇等^[10] 以 *E. coli* 为底盘细胞, 构建 1 株非营养缺陷型 L-高丝氨酸高产菌株, 发酵 48 h 合成 52.1 g/L 的 L-高丝氨酸, 为目前报道的最高产量。

作为食品发酵的优势菌株, *C. glutamicum* 可以利用相对廉价的底物合成多种高价值化合物^[11], 已成功实现 L-赖氨酸、L-谷氨酸、L-苏氨酸等的高效生产^[12-13]。Plachý 等^[14] 和 Li 等^[15] 构建了 L-苏氨酸营养缺陷型 *C. glutamicum*, 阻断 L-高丝氨酸竞争及降解途径, L-高丝氨酸的摇瓶产量达到 8.8 g/L, 表明其为底盘细胞高效生产 L-高丝氨酸也具有很大潜力和提升空间。刘剑^[16] 分析了溶氧影响 *C. glutamicum* 生长、谷氨酸合成能力的机制, 发现氧限制条件下乳酸以及副产物氨基酸丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸的代谢流通量增加, 谷氨酸合成量降低。与此同时, 溶氧量是氨基酸发酵过程中一个十分重要的参数, 可直接影响菌体生长和产物积累^[17-18]。目前为止, 发酵过程中氧气供给能力对 *C. glutamicum* 合成 L-高丝氨酸的影响尚未有报道。

本研究针对上述问题, 以 *C. glutamicum* ATCC 13032 为底盘细胞构建 L-苏氨酸缺陷型的 L-高丝氨酸合成工程菌, 进一步探讨了溶氧环境对 *C. glutamicum* 积累 L-高丝氨酸的影响。首先分析 *C. glutamicum* 对 L-高丝氨酸的耐受性; 然后通过敲除 L-高丝

氨酸激酶编码基因 *thrB* 阻断 L-高丝氨酸分解途径, 实现 L-高丝氨酸积累; 在此基础上分析溶氧环境对 L-高丝氨酸合成的影响, 进一步提升其产量。该研究为进一步实现 *C. glutamicum* 高效合成 L-高丝氨酸提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究中使用的菌株和质粒见表 1。其中 *E. coli* DH5α 用于质粒构建, *C. glutamicum* ATCC 13032 作为出发菌株用于构建 L-高丝氨酸生产菌株。*C. glutamicum* 基因组编辑系统所用质粒 pK18mobsacB。

表 1 实验菌株与质粒
Table 1 Experimental strains and plasmids

菌株/质粒	特征	来源
<i>E. coli</i> DH5α	用于质粒的扩增与保存	本实验室保存
<i>E. coli</i> W3110	用于 L-高丝氨酸生长抑制测定	本实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	野生型, 生物素缺陷型	本实验室保存
<i>C. glutamicum</i> H1	13032 衍生菌, Δ thrB	本研究
pK18mobsacB	自杀质粒, Km ^r	本实验室保存
pK18-thrB	包含 thrB 同源臂的 pK18mobsacB	本研究

L-高丝氨酸标品(纯度 99%) 上海麦克林生化科技有限公司; 限制性内切酶、质粒提取试剂盒、产物回收试剂盒、基因组提取试剂盒及分子实验相关试剂 上海生工生物有限公司; 2×TaqDNA 聚合酶、2×pfuDNA 聚合酶 杭州宝赛生物公司; 其他试剂均为市售分析纯。

SW-CJ-2FD 超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; Scout SE 电子天平 奥豪斯仪器(常州)有限公司; FE28 pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; UPT-I-20 L 超纯水系统 成都优越科技有限公司; TOMYSX-700 立式压力蒸汽灭菌器 日本 Tomy 公司; ZQZY-88CV 全温度振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司; 5454R 高速离心机 艾本德国际贸易有限公司; Eppendorf Eporator 电转化仪 艾本德国际贸易有限公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; SensoQuest Labcycler 系列 PCR 仪 德国圣欧公司; C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 美国赛默飞公司; Waters HPLC-1525 液相色谱仪 沃特世科技(上海)有限公司; AR8210 笔式溶氧仪 希玛仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制及菌株的培养条件 LB 培养基

(*E. coli* 培养基): 蛋白胨 10 g/L; 酵母粉 5 g/L; 氯化钠 10 g/L, 固体培养基添加 20 g/L 的琼脂粉, 121 °C 高温灭菌 15 min。

LBB 培养基(*C. glutamicum* 培养基): 脑心浸出液 10 g/L; 蛋白胨 10 g/L; 酵母粉 5 g/L; 氯化钠 10 g/L, 固体培养基添加 20 g/L 的琼脂粉, 115 °C 高温灭菌 20 min。

C. glutamicum 蔗糖致死培养基: 在 LBB 培养基中添加 100 g/L 的蔗糖。用于 *C. glutamicum* 基因编辑的反向筛选, 115 °C 高温灭菌 20 min。

LBHIS 培养基(用于 *C. glutamicum* 电转恢复培养基): 脑心浸出液 10 g/L; 蛋白胨 10 g/L; 酵母粉 5 g/L; 氯化钠 10 g/L; 山梨醇 91 g/L, 115 °C 高温灭菌 20 min。

种子培养基: 葡萄糖 25 g/L; 尿素 1.25 g/L; 玉米浆 20 g/L; 磷酸二氢钾 1 g/L; 硫酸镁 0.5 g/L, 使用氨水调节 pH 至 7.0, 115 °C 高温灭菌 20 min。

发酵培养基 I: 葡萄糖 50 g/L; 玉米浆 30 g/L; 硫酸铵 15 g/L; 七水硫酸镁 0.87 g/L; 甜菜碱 1.2 g/L; 85% 磷酸 0.01 g/L; 氯化钾 0.53 g/L; 维生素 B₁ 1 mg/L; 七水硫酸亚铁 0.12 g/L; 一水硫酸锰 0.12 g/L; 右旋泛素钙 6.3 mg/L; 烟酰胺 42 mg/L; 维生素 B₁₆ 3 mg/L; 生物素 0.88 mg/L; 硫酸锌 0.6 mg/L; 硫酸铜 0.6 mg/L, 调节 pH 至 7.0, 115 °C 高温灭菌 20 min。

发酵培养基 II: 葡萄糖 50 g/L; 玉米浆 20 g/L; 硫酸铵 20 g/L; 磷酸二氢钾 1 g/L; 七水硫酸镁 0.5 g/L; 一水硫酸锰 0.01 g/L; 七水硫酸亚铁 0.01 g/L; 维生素 B₁ 1 mg/L; 维生素 B₆ 6 mg/L; 生物素 0.025 mg/L; 维生素 B₁₂ 0.2 g/L, 使用氨水调节 pH 至 7.0, 115 °C 高温灭菌 20 min。

CGX II 基础培养基(L-高丝氨酸、生长谱测定培养基): 葡萄糖 10 g/L; 尿素 5 g/L; 硫酸铵 20 g/L; 磷酸二氢钾 1 g/L; 磷酸氢二钾 1 g/L; 氯化钙 13.25 mg/L; 七水硫酸镁 4 g/L; 一水硫酸锰 10 mg/L; 七水硫酸亚铁 10 mg/L; 氯化镍 0.02 mg/L; 硫酸铜 0.313 mg/L; 硫酸锌 1 mg/L; 原儿茶酸 30 mg/L; 维生素 B₁ 1 mg/L; 维生素 B₆ 6 mg/L; 生物素 0.025 mg/L; 维生素 B₁₂ 0.2 g/L, 调节 pH 至 7.0, 115 °C 高温灭菌 20 min。

E. coli 的培养条件: 37 °C、200 r/min, 抗生素浓度: 卡那霉素 50 μg/mL。*C. glutamicum* 的培养条件为: 30 °C、200 r/min, 所需抗生素时抗生素浓度: 卡那霉素 25 μg/mL。

1.2.2 不同宿主菌对 L-高丝氨酸的耐受性分析 在 CGX II 基础培养基中添加 0~40 g/L L-高丝氨酸, 培养 *E. coli* W3110 与 *C. glutamicum* ATCC 13032, 根据菌株生长情况, 在适当时间间隔取样, 测量菌株的生物量。

1.2.3 基因 *thrB* 的敲除

1.2.3.1 感受态细胞的制备、转化以及阳性转化子验证 CaCl_2 介导 *E. coli* DH5α 感受态细胞的制备与

转化^[19], 0.1 mol/L 的 CaCl_2 溶液处理菌体制备感受态细胞, 通过热激转化法进行质粒的转化。*C. glutamicum* ATCC 133032 的感受态制备与电击转化的方法参考先前文献报道^[20], 通过 10% 的甘油溶液多次处理细胞, 制备电转化的感受态细胞, 1.8 kV、5 ms 电击感受态细胞进行质粒转化。将阳性转化子进行菌落 PCR 验证。PCR 扩增体系: 2×pfu/taqDNA 聚合酶 25 μL、上下游引物各 2 μL、DNA 模板约 200 ng, 利用双蒸水补充至 50 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 10 s, 合适退火温度下退火 15 s, 72 °C 延伸适当时间(1 min 延伸约 1000 bp), 30 个循环; 72 °C 再延伸 10 min; 4 °C 保存。

1.2.3.2 基因 *thrB* 敲除载体的构建 使用软件 SnapGene 1.1.3 设计实验引物, 引物由上海生工科技有限公司合成(表 2)。

表 2 实验引物

Table 2 Primers for the experiments

引物名称	引物序列
<i>thrB-L-F-BamH I</i>	CATGGATCCCCGACTCTATTACCTGTGT
<i>thrB-L-R</i>	CTTGTGGCGTCAGTAAATTAGTCCTTCGAGGCG
<i>thrB-R-F</i>	TTTACTGACGCCAACAGGAAGGCCCTTC
<i>thrB-R-R-Hind III</i>	CCCAAGCTCTCCAACACCGCGTCCCCGACAAC
<i>thrB-YZ-F</i>	GCTATTCTGCTCGCGTGCA
<i>thrB-YZ-R</i>	GATTCGAAGGGGCCCTCCTGTTG

将 *C. glutamicum* ATCC 133032 接种于 50 mL 的 LBB 液体培养基中 30 °C、200 r/min, 培养 24 h; 使用基因组提取试剂盒提取 *C. glutamicum* ATCC 133032 的基因组; 以 *C. glutamicum* ATCC 133032 的基因组为模板, 使用 2×pfuDNA 聚合酶, 通过引物 *thrB-L-F-BamH I*/*thrB-L-R*、*thrB-R-F*/*thrB-R-R-Hind III* 扩增 *thrB* 的上下游同源臂; 纯化 *thrB* 的上下游同源臂片段, 使用 2×pfuDNA 聚合酶, 通过引物 *thrB-L-F-BamH I*/*thrB-R-R-Hind III* 进行重叠 PCR 得到重叠片段; 将重叠片段和敲除载体 pK18mobsacB 使用限制性内切酶 *BamH I*、*Hind III* 进行酶切; 将酶切纯化后的同源臂与载体使用 *T₄* DNA 连接酶过夜连接, 将连接产物通过热激转化转入 *E. coli* DH5α 感受态细胞; 使用 2×taqDNA 聚合酶, 通过 *thrB-L-F-BamH I*/*thrB-R-R-Hind III* 进行菌落 PCR 验证; 能扩增出同源臂片段的菌株接种于 50 mL 的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min、培养 12 h, 提取质粒, 进行酶切验证, 验证正确的即为目的基因敲除载体 pK18-*thrB*。

1.2.3.3 基因 *thrB* 敲除过程 菌株基因组的编辑采用 pK18mobsacB 无痕编辑系统^[21]。将敲除载体经电击转化转入 *C. glutamicum* 感受态细胞, 涂布于含有 50 mg/L 的卡那霉素的 LBB 固体培养基, 30 °C 恒温培养 36 h; 将平板上长出的单菌落接种于含有 50 mg/L 的卡那霉素的 LBB 液体培养基中, 培养 24 h,

按照试剂盒的提取步骤提取菌株基因组,以基因组为模板扩增片段 *thrB-L-F-BamH I*,成功扩增出前同源臂的菌落即为单交换菌株;将单交换菌株接种于无抗 LBB 液体培养基,30 ℃、200 r/min、培养 24 h 后将菌液稀释(10⁻³、10⁻⁴)涂布于含有 100 g/L 蔗糖的 LBB 固体培养基,30 ℃ 培养大约 48 h;挑取在平板上生长的单菌落,使用 *thrB-YZ-F/thrB-YZ-R* 进行菌落 PCR 验证,验证结果正确的菌株即为双交换菌株。按照试剂盒的提取步骤提取双交换菌株基因组,以基因组为模板使用引物 *thrB-YZ-F/thrB-YZ-R* 进行 PCR 验证并委托上海生工科技有限公司测序。

1.2.4 基因 *thrB* 敲除对 *C. glutamicum* ATCC 13032 生长的影响 将 *C. glutamicum* ATCC 13032 与 *C. glutamicum* H1 在无抗的 LBB 固体培养基上划线,置于 30 ℃ 培养 48 h;从平板上提取单菌落,接种于 50 mL 的 LBB 液体培养基中 30 ℃、200 r/min、培养 12 h;将 *C. glutamicum* ATCC 13032 与 *C. glutamicum* H1 的菌液按照 0.1% 的接种量接种于 CGX II 基础培养基中,另外再将 *C. glutamicum* H1 的菌液按照 0.1% 的接种量接种于添加 0.5 g/L 的苏氨酸的 CGX II 基础培养基中,30 ℃、200 r/min 培养,测量菌株的生物量(OD₆₀₀)。

1.2.5 基因 *thrB* 敲除对 L-高丝氨酸合成的影响 将 *C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* H1 在无抗的 LBB 平板上划线,置于 30 ℃ 培养箱培养 48 h;从平板上提取单菌落,接种于 50 mL 的种子培养基中 30 ℃、200 r/min、培养 24 h;将菌液按照 1% 的接种量分别接种于发酵培养基 I 与发酵培养基 II 中,30 ℃、200 r/min、发酵 72 h,测定生物量 OD₆₀₀ 以及胞内和胞外 L-高丝氨酸含量。

1.2.6 不同摇瓶方式对细胞生长以及 L-高丝氨酸合成的影响 将重组菌 *C. glutamicum* H1 在无抗的 LBB 平板上划线,置于 30 ℃ 培养箱培养 48 h;从平板挑取单菌落,接种于 50 mL 的 LBB 培养基中 30 ℃、200 r/min、培养 24 h;将菌液按照 1% 的接种量分别接种于普通摇瓶(规格 250 mL,装液量 50 mL)和挡板摇瓶(规格 500 mL,3×挡板 3 cm,装液量 100 mL),测定发酵液中葡萄糖、溶氧量、生物量 OD₆₀₀ 以及 L-高丝氨酸产量。

1.3 指标测定

1.3.1 葡萄糖检测 葡萄糖检测条件:葡萄糖采用 DNS 法测定^[22],配置 DNS 溶液,用葡萄糖标品配制标准液并绘制标准曲线,将测定值带入标准曲线公式($y=1.316x-0.23$, y : OD₅₄₀, x : 葡萄糖浓度 g/L),计算葡萄糖含量。

1.3.2 生物量检测 生物量 OD₆₀₀ 检测条件:分光光度计法测定 600 nm 下稀释后样品的吸光值(确保读数范围 0.3~0.8),将该吸光值乘以稀释倍数作为单位时间的菌体量。

溶氧量检测条件:每隔 2 h 分别取 3 瓶挡板摇瓶和普通摇瓶的发酵液,使用笔式溶氧仪测定其溶氧量。

1.3.3 产物检测 产物检测条件:胞内 L-高丝氨酸检测过程中利用缓冲液(Tris 20 mmol/L; NaCl 500 mmol/L; 10% 甘油; pH5.53)将菌体清洗 3 次并重悬,使用细胞破碎仪将细胞破碎,获得破碎液。将发酵液 12000 r/min 高速离心 10 min,收集上清液。采用 OPA 柱前在线衍生高效液相色谱法^[7] 定性定量分析破碎液与上清液中的 L-高丝氨酸。用 L-高丝氨酸标品配制标准液并绘制标准曲线。色谱条件:色谱柱为 Thermo C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测器为紫外检测器,检测波长 338 nm,柱温箱温度 50 ℃,流动相为流动相 A 与流动相 B 梯度洗脱,进样量 2 μL。发酵液高速离心 10 min 后取上清液与 0.4 mol/L 的三氯乙酸等体积稀释,4 ℃ 静置 4 h 以上,4 ℃ 下高速离心 10 min 后取上清液,稀释适当倍数,使用 0.22 μm 膜过滤处理。

流动相 A 液:5 g 醋酸钠溶于 1 L 双蒸水中,冰醋酸调 pH 至 7.2,加入 5 mL 四氢呋喃,200 μL 三乙胺。B 液:5 g 醋酸钠溶于 200 mL 双蒸水中,冰醋酸调 pH 至 7.2,与 400 mL 甲醇、400 mL 乙腈混合。流动相经 0.22 μm 有机滤膜过滤后超声脱气 10 min。

衍生化体系:硼酸缓冲液 0.6 mL、OPA 溶液 0.12 mL、处理好的发酵液 0.12 mL、双蒸水 2.76 mL。

梯度洗脱程序见表 3。

表 3 L-高丝氨酸梯度洗脱程序
Table 3 Gradient elution procedure of L-homoserine

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)	流速(mL/min)
0	90.0	10.0	1.00
5.00	90.0	10.0	1.00
11.00	33.0	67.0	1.00
14.50	0.0	100.0	1.20
15.00	0.0	100.0	1.20
17.00	90.0	10.0	1.00
25.00	90.0	10.0	1.00

1.4 数据处理

本次实验中每组实验数据均由 3 次重复实验得到,实验获得的数据用平均值±标准差(SD)表示。采用 Origin 2019 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 不同宿主菌对 L-高丝氨酸的耐受性分析

据文献报道,高浓度 L-高丝氨酸对多种微生物具有毒害作用并抑制细胞的生长,包括 *Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans* 和 *Escherichia coli*^[8,23~24]。在 *E. coli* 培养过程中添加 3 g/L 的 L-高丝氨酸,细胞生长延迟期超过 20 h,细胞生物量 OD₆₀₀ 下降 50%(图 1A)。与此同时,本实验验证了不同 L-高丝氨酸浓度对 *C. glutamicum* 生长的影响。不添加 L-高丝氨酸时, *C. glutamicum* ATCC13032 在 10 h 时

进入对数生长期; 添加 3~40 g/L 的 L-高丝氨酸时, 细胞生长在对数期受到抑制, 但培养结束时细胞生物量 OD₆₀₀ 并无明显差异(图 1B)。由于 L-高丝氨酸在 *C. glutamicum* 培养过程中不会完全消耗, 菌株中某些基因, 例如参与 L-高丝氨酸胞外转运的 *BrnF*/*BrnE*, 被 L-高丝氨酸激活, 从而增强菌株在 L-高丝氨酸中的耐受性, 或者该菌株中存在完整的 L-高丝氨酸应激机制^[10]。以上结果表明, *C. glutamicum* 具有更强的 L-高丝氨酸耐受性, 能够在高浓度 L-高丝氨酸环境下生长, 更有利于 L-高丝氨酸的代谢合成。

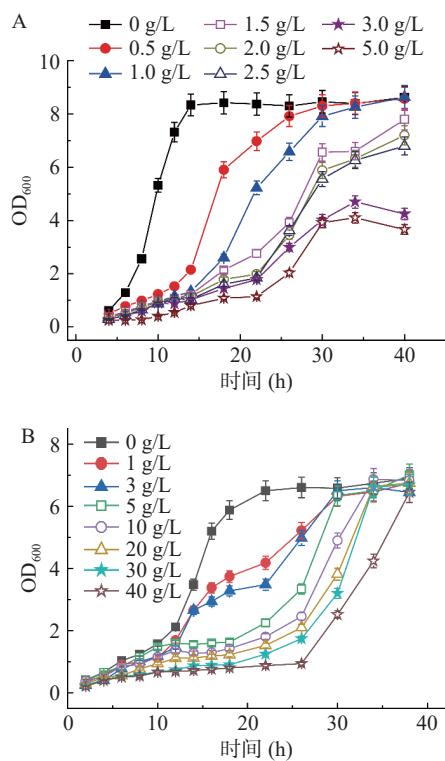


图 1 不同宿主菌对 L-高丝氨酸的耐受性分析

Fig.1 Tolerance analysis of different host bacteria to L-homoserine

注: A: 大肠杆菌; B: 谷氨酸棒状杆菌。

2.2 基因 *thrB* 敲除的验证及其对 *C. glutamicum* ATCC 13032 生长的影响

根据文献报道的 *C. glutamicum* 基因敲除方法, 本研究以 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组为模板, 通过引物 *thrB-L-F-BamH I*/*thrB-L-R*, *thrB-R-F*/*thrB-R-R-Hind III* 扩增 500 bp 的 L 与 R 同源臂, 并将两同源臂连接至敲除载体 pK18mobsacB, 构建了敲除质粒 pK18-thrB, 构建过程如图 2A 所示。对敲除质粒进行单酶切和双酶切验证, 双酶切后目的条带为基因上下游同源臂, 条带大小 1000 bp, 表明基因 *thrB* 敲除质粒构建成功(图 2B)。随后, 将该质粒电转入 *C. glutamicum* 进行基因 *thrB* 敲除。通过引物 *thrB-YZ-F*/*thrB-YZ-R* 进行 PCR 验证, 发现目标片段长度由原始菌的 1478 bp 减小为敲除菌的 548 bp, 表明 L-高丝氨酸激酶编码基因 *thrB* 已经成功敲除, 获得重组菌 *C. glutamicum* H1(图 2C)。

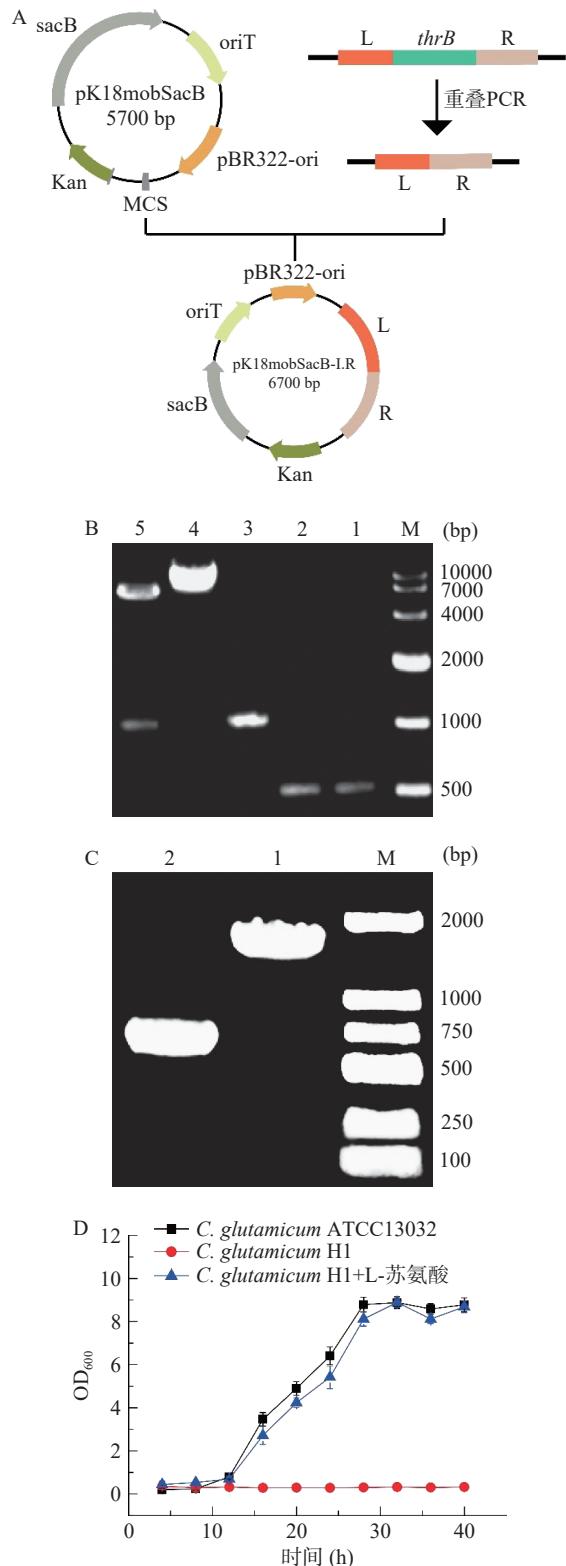


图 2 基因 *thrB* 敲除及其对 *C. glutamicum* ATCC 13032 生长的影响

Fig.2 The deletion of gene *thrB* and its effect on the growth of *C. glutamicum* ATCC 13032

注: A: 基因 *thrB* 敲除质粒构建流程图; B: 基因 *thrB* 敲除质粒琼脂糖凝胶电泳图, M: marker; 1: 上游同源臂(L); 2: 下游同源臂(D); 3: L-D 重叠 PCR 产物; 4: 敲除质粒单酶切验证; 5: 敲除质粒双酶切验证; C: 基因 *thrB* 敲除 PCR 验证, M: marker; 1: 野生菌 *C. glutamicum* ATCC 13032; 2: 基因 *thrB* 敲除菌 *C. glutamicum* H1; D: 基因 *thrB* 敲除对 *C. glutamicum* ATCC 13032 生长的影响。

对基因 *thrB* 敲除前后的菌株生长谱进行分析。为降低 LBB 培养基对生长谱鉴定的影响, 接种量由百分之一减少至千分之一, 导致 30 h 前菌株生长缓慢。由于基因 *thrB* 的敲除阻断了 L-苏氨酸合成途径, 重组菌 *C. glutamicum* H1 不能合成苏氨酸; 而 L-苏氨酸为菌体生长的必需氨基酸, 因此该重组菌在基础培养基上无法正常生长。在基础培养基中加入 0.5 g/L 的 L-苏氨酸后, 重组菌 *C. glutamicum* H1 生长恢复正常水平(图 2D)。

2.3 L-高丝氨酸激酶编码基因 *thrB* 敲除对 L-高丝氨酸合成的影响

研究报道, 苏氨酸是 L-高丝氨酸的主要分解途径, 阻断苏氨酸合成途径是代谢改造以 L-高丝氨酸或其下游的蛋氨酸等为目的产物的基本策略之一^[24]。本研究中考察了 L-苏氨酸代谢途径基因 *thrB* 敲除对 *C. glutamicum* 生长和 L-高丝氨酸合成的影响。首先, 本研究通过高效液相色谱法分析了不同培养基下 L-高丝氨酸的合成情况, 结果表明重组菌 *C. glutamicum* H1 利用培养基 II 发酵 72 h 合成 L-高丝氨酸产量高于培养基 I (表 4)。随后, 对 *C. glutamicum* ATCC 13032 与重组菌 *C. glutamicum* H1 发酵过程进行分析, 如图 3 所示。重组菌 *C. glutamicum* H1 可以成功实现积累 L-高丝氨酸, 而原始菌发酵液中未检测到目标产物, 证实了 *C. glutamicum* 中基因 *thrB* 的敲除对 L-高丝氨酸积累具有促进作用(图 3A)。由于发酵培养基 II 中存在苏氨酸, 基因 *thrB* 的敲除对菌体生长未产生明显影响, 重组菌 *C. glutamicum* H1 的 L-高丝氨酸产量为 44.6 mg/L(图 3B)。为进一步提升重组菌 *C. glutamicum* H1 的 L-高丝氨酸合成能力, 本实验考察了发酵环境对其产物合成的影响。

表 4 不同培养基下 L-高丝氨酸的产量(mg/L)

Table 4 The production of L-homoserine in different media (mg/L)

培养基	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	<i>C. glutamicum</i> H1
发酵培养基 I	0	22.4±0.35
发酵培养基 II	0	44.6±0.72

2.4 不同摇瓶方式对 L-高丝氨酸合成的影响

细胞溶氧环境对 *C. glutamicum* 发酵过程中碳代谢以及菌体生长具有十分重要的影响, 例如低溶氧条件导致杂酸代谢流增加, 菌体浓度仅为高溶氧条件下的 44.7%^[25-27]。文献报道, 挡板摇瓶溶氧系数可达 1.20~1.80 L/h, 比普通摇瓶提高 2 倍^[28]。本研究利用不同种类摇瓶实现两种溶氧方式并分析其对菌体生长以及 L-高丝氨酸合成的影响。由于改善细胞溶氧环境可以增强 TCA 循环代谢流^[29], 挡板摇瓶的菌体浓度是普通摇瓶的 2.51 倍(图 4)。挡板摇瓶条件下发酵 72 h 后, *C. glutamicum* H1 的胞内和胞外 L-高丝氨酸产量分别是普通摇瓶的 2.62 和 18.76 倍, 达到 1.78 mg/g-DCW 和 836.7 mg/L(表 5), 主要原

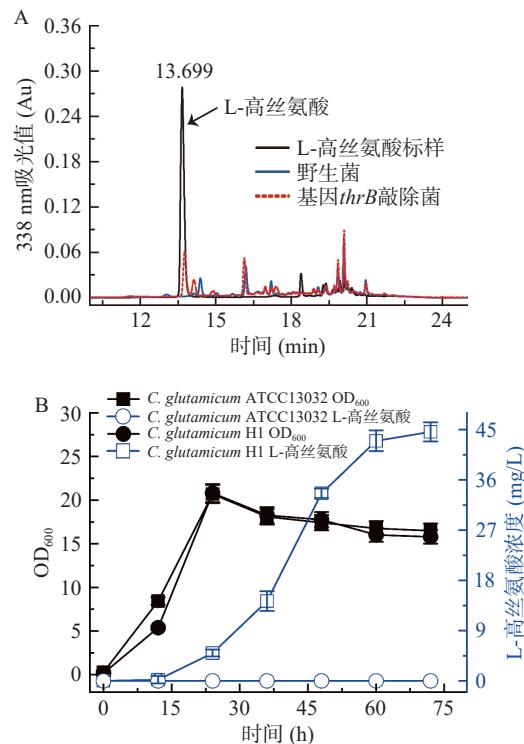


图 3 L-高丝氨酸激酶编码基因 *thrB* 敲除对 L-高丝氨酸合成的影响

Fig.3 The effect of gene *thrB* deletion on the synthesis of L-homoserine

注: A: 野生菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 与基因 *thrB* 敲除菌 *C. glutamicum* H1 72 h 发酵液高效液相色谱分析; B: 野生菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 与基因 *thrB* 敲除菌 *C. glutamicum* H1 的细胞生长以及 L-高丝氨酸产量分析。

因存在于 NADPH 再生能力得到增强, 为 L-高丝氨酸合成提供了更多辅因子^[30]。在后续菌株改造过程中, 将尝试将血红蛋白(VHb)编码基因 *vgb* 插入 *C. glutamicum* 基因组, 提升细胞摄氧能力, 进而增强其 L-高丝氨酸合成能力^[31]。由于基因 *thrB* 与天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶双功能酶编码基因 *thrA* 的表达具有正相关的关系^[32], 后期研究中也将在重组菌 *C. glutamicum* H1 中过表达基因 *thrA* 以提升 L-高丝氨酸的合成。

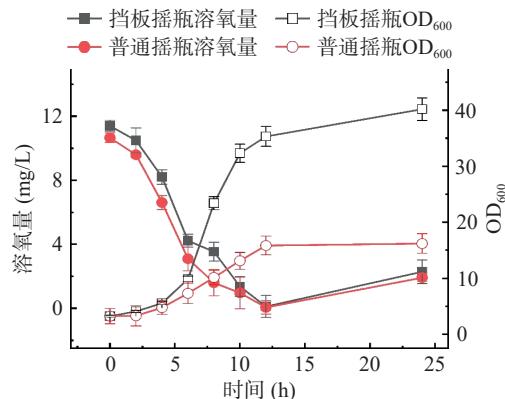


图 4 不同培养环境下菌株的生长情况及溶氧变化

Fig.4 Growth and dissolved oxygen of strains in different culture environments

表 5 不同摇瓶方式对 L-高丝氨酸合成的影响

Table 5 The effect of different shaking flasks on the synthesis of L-homoserine

摇瓶种类	菌株	胞外L-高丝氨酸(mg/L)	胞内L-高丝氨酸(mg/g-DCW)	OD ₆₀₀	残糖(g/L)
普通摇瓶	<i>C. glutamicum</i> H1	44.6±0.72	0.68±0.015	16.03±0.52	16.61±0.63
挡板摇瓶	<i>C. glutamicum</i> H1	836.7±20.54	1.78±0.143	40.2±2.12	4.24±0.25

3 结论

对 *C. glutamicum* 及 *E. coli* 进行 L-高丝氨酸耐受性实验, 发现 *C. glutamicum* 对 L-高丝氨酸的耐受能力具有优势, 能够在高浓度 L-高丝氨酸环境下生长, 更易实现高密度发酵生产 L-高丝氨酸。通过敲除 *thrB* 基因阻断了重组 *C. glutamicum* 的 L-高丝氨酸向 L-苏氨酸转化途径, 成功构建了菌株 *C. glutamicum* H1 实现 L-高丝氨酸的积累。通过挡板摇瓶发酵, *C. glutamicum* H1 的 L-高丝氨酸产量由 44.6 mg/L 提高到 836.7 mg/L, 产量提升了 17.76 倍, 证实利用挡板摇瓶增强发酵过程中供氧能力是促进谷氨酸棒状杆菌高效合成 L-高丝氨酸的有效手段。在 *C. glutamicum* 发酵过程中, 可以通过改变溶氧环境提高其 L-高丝氨酸的合成能力, 为其高密度发酵产 L-高丝氨酸奠定基础。

参考文献

- [1] HUANG J F, LIU Z Q, JIN L Q, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 843–851.
- [2] AREZKI N R, WILLIAMS A C, COBB J A, et al. Design, synthesis and characterization of linear unnatural amino acids for skin moisturization[J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 2017, 39(1): 72–82.
- [3] MIN L A, JI A, JG B, et al. Increasing L-homoserine production in *Escherichia coli* by engineering the central metabolic pathways[J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, s314–315: 1–7.
- [4] 曾凡亮, 王宇, 杜升华, 等. 高丝氨酸的合成研究[J]. *精细化工中间体*, 2016, 46(2): 17–18, 21. [ZENG F L, WANG Y, DU S H, et al. Synthesis of homoserine[J]. *Fine Chemical Intermediates*, 2016, 46(2): 17–18, 21.]
- [5] ARMSTRONG M D. The preparation of D- and L-homoserine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1948, 70(5): 1756–1759.
- [6] 张博, 姚臻豪, 柳志强, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-高丝氨酸[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1287–1297. [ZHANG B, YAO Z H, LIU Z Q, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-homoserine production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(4): 1287–1297.]
- [7] 李华. 系统代谢工程改造大肠杆菌生产 L-蛋氨酸[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [LI H. Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-methionine production[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [8] LI H, WANG B, ZHU L, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(1): 1975–1988.
- [9] LIU P, ZHANG B, YAO Z H, et al. Multiplex design of metabolic network for production of L-homoserine in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(20): e01477.
- [10] 张宇, 夏利, 林蓓蓓, 等. 高效合成 L-高丝氨酸大肠杆菌基因工程菌株的构建[J]. *食品科学*, 2022, 43(6): 81–88. [ZHANG Y, XIA L, LIN P P, et al. Construction of *Escherichia coli* chassis for efficient production of L-homoserine[J]. *Food Science*, 2022, 43(6): 81–88.]
- [11] 李宁. 谷氨酸棒状杆菌合成 O-乙酰-L-高丝氨酸关键代谢过程调控[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [LIN N. Regulation of key metabolic processes to biosynthesize O-acetyl-L-homoserine in *Corynebacterium glutamicum*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]
- [12] DELE-OSIBANJO T, LI Q, ZHANG X, et al. Growth-coupled evolution of phosphoketolase to improve L-glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(20): 8413–8425.
- [13] VASSILEV I, GIEELMANN G, SCHWECHHEIMER S K, et al. Anodic electro-fermentation: Anaerobic production of L-lysine by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(6): 1499–1508.
- [14] PLACHY J, ULBERT S, PELECHOVA J, et al. Fermentation production of L-homoserine by *Corynebacterium* sp. and its possible use in the preparation of threonine and lysine[J]. *Folia Microbiologica*, 1985, 30(6): 485–492.
- [15] LI N, XU S, DU G, et al. Efficient production of L-homoserine in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 by redistribution of metabolic flux[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 161: 107665.
- [16] 刘剑. 溶氧影响谷氨酸发酵代谢的机制及代谢通量分析[D]. 上海: 华东理工大学, 2012. [LIU J. Metabolic mechanism of glutamic acid biosynthesis under different dissolved oxygen concentrations and its metabolic flux analysis[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012.]
- [17] ZIMMERMANN H F, ANDERLEI T, JOCHEN B, et al. Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1157–1160.
- [18] 张夙夙. 溶氧对氨基酸发酵的影响及其控制[J]. *安徽农学通报*, 2014, 20(12): 25–30. [ZHANG S S. Influence and control of dissolved oxygen on amino acid fermentation[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2014, 20(12): 25–30.]
- [19] 李刚, 程度, 李宝健, 等. 利用高效 CaCl₂ 转化法实现质粒的共转化[J]. *生物技术*, 2003, 13(6): 31–33. [LI G, CHENG D, LI B J, et al. Co-transformation of plasmids by efficient CaCl₂ transformation method[J]. *Biotechnology*, 2003, 13(6): 31–33.]
- [20] 孙杨. 谷氨酸棒状杆菌表达系统能量利用相关基因的挖掘和应用[D]. 无锡: 江南大学, 2018. [SUN Y. Mining and application of energy-related genes in *Corynebacterium glutamicum* expression system[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]

- tion of energy utilizing related genes in favour of heterologous expression system of *Corynebacterium glutamicum*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]
- [21] 谭延振. 谷氨酸棒状杆菌基因敲除系统的构建[D]. 无锡: 江南大学, 2012. [TAN Y Z. Construction of gene deletion system in *Corynebacterium glutamicum*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.]
- [22] 朱凯杰, 陆国权, 张迟. 响应面优化 DNS 测定还原糖方法[J]. 中国粮油学报, 2019(6): 2–113. [ZHU K J, LU G Q, ZHANG C. Optimization of the determination method of reducing sugar using response surface analysis[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019(6): 2–113.]
- [23] KINGSBURY J M, MCCUSKER J H. Homoserine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* homoserine kinase (thr1) mutants[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(5): 717–728.
- [24] KARKHANIS V A, MASCARENHAS A P, MARTINIS S A. Amino acid toxicities of *Escherichia coli* that are prevented by leucyl-tRNA synthetase amino acid editing[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8765–8768.
- [25] 李昶志, 潘忠成, 翁婧, 等. 微生物发酵中溶氧浓度的控制研究[J]. 绿色科技, 2019(6): 2. [LI X Z, PAN Z C, WENG J, et al. Study on the control of dissolved oxygen concentration in microbial fermentation[J]. *Journal of Green Science and Technol*, 2019(6): 2.]
- [26] 王震. 谷氨酸棒状杆菌发酵生产 L-精氨酸的溶氧条件优化[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(7): 120–123. [WANG Z. Optimization of dissolved oxygen conditions for *Corynebacterium glutamicum* producing L-arginine[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(7): 120–123.]
- [27] 杨艳坤, 王芬, 孙杨, 等. 不同溶氧对谷氨酸棒状杆菌代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2540–2549. [YANG Y K, WANG F, SUN Y, et al. Effect of different dissolved oxygen concentrations on metabolism in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2540–2549.]
- [28] 郝健, 王昌禄, 顾晓波, 等. 挡板三角瓶在好气微生物培养中的应用[J]. 无锡轻工大学学报, 1999(5): 177–179. [HAO J, WANG C L, GU X B, et al. Application of triangular flask in aerobic microorganism culture[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 1999(5): 177–179.]
- [29] YAMAMOTO S, SAKAI M, INUI M, et al. Diversity of metabolic shift in response to oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum* and its close relatives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(3): 1051–1061.
- [30] TANG R, WENG C, PENG X, et al. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* H16 for improved chemoautotrophic growth and PHB production under oxygen-limiting conditions[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 61: 11–23.
- [31] XU Y, LI Y, WU Z, et al. Combining precursor-directed engineering with modular designing: An effective strategy for de novo biosynthesis of l-DOPA in *Bacillus licheniformis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11: 700–712.
- [32] OKOROKOV A L, BUKANOV N O, BESKROVNAIA O I, et al. Development of the vector-host system in *Corynebacterium*. Cloning and expression of homoserine dehydrogenase and homoserine kinase genes in *Corynebacterium* cells[J]. *Genetika*, 1990, 26(4): 648–656.