



利用代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产丙酮酸

方哲, 操文军, 刘娟, 张思琪, 肖志强, 单杨*

(1. 湖南大学 生物学院隆平分院, 湖南 长沙 410082;

2. 湖南省农业科学院 农产品加工研究所/果蔬贮藏加工与质量安全湖南省重点实验室/湖南省果蔬加工与质量安全国际科技创新合作基地, 湖南 长沙 410125)

摘要: 丙酮酸是一种重要的有机酸,在生物体的能量代谢中发挥着重要作用,它可以作为前体物质,参与合成多种有机化合物。因此,选择利用代谢工程改造谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)生产丙酮酸,以提高丙酮酸产量。利用同源重组的方法,依次敲除谷氨酸棒杆菌中丙酮酸代谢支流相关的5个关键基因(编码丙酮酸酞氧化还原酶基因 *pqo*、丙酮酸羧化酶基因 *pyc*、转氨酶基因 *alaT*、缬氨酸-丙酮酸氨基转移酶基因 *avtA*、丙酮酸脱氢酶基因 *aceE*),摇瓶发酵72 h后丙酮酸的产量达到14.64 g/L。通过过表达编码转酮醇酶基因 *tkt*、转醛酶基因 *tal*、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因 *pck*,增加合成丙酮酸前体物质的供应。最终,复合培养基摇瓶发酵72 h后,发酵液中丙酮酸的产量达到15.39 g/L,与野生型菌株相比提高了28倍。研究旨在为利用微生物发酵生产丙酮酸提供一定的理论基础和参考。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 丙酮酸; 代谢工程; 同源重组; 过表达

中图分类号: TS201.3; TS255.1

文献标志码: A

丙酮酸又称2-氧代丙酸,是一种重要的有机酸,在生物体的代谢过程中发挥着重要作用;同时,它也作为一种必不可少的前体物质,参与许多有机化合物的合成^[1]。丙酮酸钙作为膳食补充剂,具有加速脂肪消耗、减轻体重等功效^[2]。目前丙酮酸已广泛应用到食品、制药、农化等行业^[3-4]。

丙酮酸的工业化生产主要是化学合成法,虽然其转化率高,但是污染重、效益低。微生物发酵法生产丙酮酸具有原料来源广泛、成本低、反应条件温和等优势,因此,已经逐渐成为研究热点。目前生产丙酮酸的宿主有大肠杆菌、毕赤酵母、解脂耶氏酵母、光滑球拟酵母、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母^[5-10]等。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种非致病的革兰氏阳性菌^[11],被FDA认证为食用、药用安全菌株^[12],可以用于色氨酸^[13]、赖氨酸^[14]、缬氨酸^[15]、谷氨酸^[16]等氨基酸的生产。谷氨酸棒杆菌作为有机酸生产菌相比其他菌株具有生产速度快,不产生内毒素,可以利用不同碳源为底物,对有毒化合物具有高耐受性等优势^[17]。并且,在谷氨酸棒杆菌中,当促使丙酮酸转化为乙酰辅酶A的基因受到抑制时,谷氨酸棒杆菌可以葡萄糖为底物大量积累丙酮酸^[18]。因此本研究选取谷氨酸棒杆菌作为底盘细胞来进行丙酮酸的生产。

目前研究者提升丙酮酸的产量主要是通过敲除

收稿日期: 2022-05-27

基金项目: 湖南省农业科技创新项目(2021CX05)。

Foundation: Agricultural Science and Technology Innovation Project of Hunan Province (2021CX05).

第一作者: 方哲,女,硕士研究生,研究方向为食品生物化学。

*通信作者: 单杨,男,研究员,博士,主要从事农产品加工及质量安全方面的研究。

编码丙酮酸脱氢酶复合体基因(*PDHc*)^[19-20]和敲除编码丙酮酸醌氧化还原酶基因*pqo*来实现^[21],对流向其他副产物代谢通路的研究相对较少。本实验以野生型谷氨酸棒杆菌为出发菌株,拟通过敲除丙酮酸降解途径关键酶基因(丙酮酸醌氧化还原酶基因*pqo*、丙酮酸羧化酶基因*pyc*、转氨酶基因*alaT*、缬氨酸-丙酮酸氨基转移酶基因*avtA*、丙酮酸脱氢酶基因*aceE*)弱化丙酮酸的降解,并通过加强表达丙酮酸生物合成途径关键酶基因(转酮醇酶基因*tkt*、转醛酶

基因*tal*、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因*pck*)增加合成丙酮酸前体物的供应,构建一株高效生产丙酮酸的菌株,以期为日后微生物发酵生产丙酮酸提供理论基础和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株、质粒信息见表1,主要引物信息见表2。

表1 菌株和质粒信息

Tab. 1 Information of strains and plasmids

菌株及质粒	描述	来源
菌株		
<i>E. coli</i> JM109	用于目的基因的克隆	实验室保藏
ATCC 13032	丙酮酸合成的出发菌株	实验室保藏
QC01		本研究构建
QC02	<i>C. glutamicum</i> $\Delta pqo \Delta pyc$	本研究构建
QC03	<i>C. glutamicum</i> $\Delta pqo \Delta pyc \Delta alaT$	本研究构建
QC04	<i>C. glutamicum</i> $\Delta pqo \Delta pyc \Delta alaT \Delta avtA$	本研究构建
QC05	<i>C. glutamicum</i> $\Delta pqo \Delta pyc \Delta alaT \Delta avtA \Delta aceE$	本研究构建
pEC01	QC05 含 pEC-XK99E- <i>tkt-tal-pck</i>	本研究构建
质粒		
pK18mobsacB	自杀质粒;卡那霉素抗性	实验室保藏
pK18mobsacB Δpqo	pK18mobsacB 携带敲除 <i>pqo</i> 基因同源臂	本研究构建
pK18mobsacB Δpyc	pK18mobsacB 携带敲除 <i>pyc</i> 基因同源臂	本研究构建
pK18mobsacB $\Delta alaT$	pK18mobsacB 携带敲除 <i>alaT</i> 基因同源臂	本研究构建
pK18mobsacB $\Delta avtA$	pK18mobsacB 携带敲除 <i>avtA</i> 基因同源臂	本研究构建
pK18mobsacB $\Delta aceE$	pK18mobsacB 携带敲除 <i>aceE</i> 基因同源臂	本研究构建
pEC-XK99E	IPTG 诱导,卡那霉素抗性	实验室保藏
pEC-XK99E- <i>tkt-tal-pck</i>	pEC-XK99E 携带 <i>tkt</i> 、 <i>tal</i> 、 <i>pck</i> 基因	本研究构建

C. glutamicum Δpqo 意为此菌株中 *pqo* 基因已被敲除。

蛋白胨、酵母粉、脑心浸出液(BHI),英国 Oxoid 公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),上海瑞永生物科技有限公司;LB 液体培养基干粉,北京索莱宝科技有限公司;丙酮酸标准品,上海源叶生物科技有限公司;ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒、基因组提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;丙酮酸检测试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

LDZM-80L 型立式高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;GY-2101 型金属浴,美国 Crystal 公司;MDF-86V408 型超低温冰箱,安徽中科都菱商用电器股份有限公司;YP10001 型电子天平,上海精密仪器仪表有限公司;ZQPZ-115 型振荡培养箱,天津莱玻特瑞仪器设备有限公司;Synergy H1 型酶标仪,美国 Bio Tek 仪器有限公司;5424R 型小型台式高速离心机,德国 Eppendorf 股份有限公司;TOne 96 型 PCR 仪,德国 Biometra 公司;JY-ECP3000 型核酸电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;Essential V4

表 2 主要引物信息

Tab. 2 Information of main primers

引物	序列
pK18-F	GGCACTGGCCGTCGTTTT
pK18-R	GTAATCATGTCATAGCTGTTTC
U- <i>pqo</i> -F	aacagctatgacatgattacTTCTACGATGTCGCCAATCCA
U- <i>pqo</i> -R	tcgtggatgctgctgcgGAACAGGTCATGGGATTACAGCA
D- <i>pqo</i> -F	GAATCCCATGACCTGTTCCGGACAGCATCCACGATC
D- <i>pqo</i> -R	gtaaaacgacggccagtgccCTGGCGATTAAAGACGTCCG
U- <i>pyc</i> -F	aacagctatgacatgattacTTTTCTGAGTCTTAGATTTTGAGAAAAC
U- <i>pyc</i> -R	gaagcagtgttgttctcACCGTTTTGAGTCTG
D- <i>pyc</i> -F	gtgcagcactcgaaccggGTAAGCAACAATCACTGCTTCTGTT
D- <i>pyc</i> -R	gtaaaacgacggccagtgccACCACCCTCCTTAGCTTTTG
U- <i>alaT</i> -F	aacagctatgacatgattacAAGGCATAGCTCTCGTGGGAC
U- <i>alaT</i> -R	gtggacaggaagttaccagGGTCTTAGAGGTTTTGCGCTTG
D- <i>alaT</i> -F	agcgcaaaaccttaagaccCTGGGTAACCTCCTGTCCACTTACA
D- <i>alaT</i> -R	ttgtaaaacgacggccagtgccTCGCGGGCCGCGGGTCAG
U- <i>antA</i> -F	aacagctatgacatgattacATCTGCAGCTGTTCAACATTTTCG
U- <i>antA</i> -R	accaggtccaccgtcgcaggGTTGATTTTGATCCTGAGGAAGGC
D- <i>antA</i> -F	tctcagatcaaaatcaacCCTGCGACGGTGGACTCG
D- <i>antA</i> -R	gtaaaacgacggccagtgccAAACCCAGGCTGTACTGGCA
U- <i>aceE</i> -F	aacagctatgacatgattacACTTTTCGAGTTTTTCAGTCTTGAT
U- <i>aceE</i> -R	gtttggatctacggaaacGGGCTTGCCACCAAGTTTTG
D- <i>aceE</i> -F	aacttgggtgcaagcccGTTTCCGTAGATCCAACGCTC
D- <i>aceE</i> -R	gtaaaacgacggccagtgccTTGAGCTGGGTCTGAAAAACA
pEC-F	GGCTGTTTTGGCCGATGAG
pEC-R	CATGGTCTGTTTCCTGTGTGA
<i>pck</i> -F	cacacaggaacagaccatGAAGGAGGACAACCATGACTACTGCG
<i>pck</i> -R	caaggtggtcaagttgtcctcctttTAAGCGTGAGCTGCTGAAAT
<i>tkl</i> -F	AAAGGAGGACAACCTTGACCACcttgacgtgtcacc
<i>tkl</i> -R	ATCAATGTGAGACATGAAACTAAATTTTCCTTAAAAGA
<i>tal</i> -F	TTTAAAGAAAATTTAGTTTCATGTCTCACATTGATGATC
<i>tal</i> -R	tccgcaaaacagccCTACTTCAGGGGAGCTTCCATG

型凝胶成像仪,英国 UVItec 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基的配置

蔗糖筛选培养基(g/L):牛脑心浸出液 37、硫酸铵 10、硫酸镁 0.5、磷酸一氢钾 0.2、磷酸二氢钠 0.3、蔗糖 100、琼脂粉 20,115 °C 高温灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 100、玉米浆 20、硫酸铵 20、磷酸二氢钾 1、乙酸钠 5、硫酸镁 0.5、一水硫酸锰 0.01、七水硫酸亚铁 0.01、维生素 B₁ 0.001、维生素 B₆ 0.006、维生素 B₃ 0.008、维生素 B₁₂ 0.2、生物素 2.5 × 10⁻⁵、碳酸钙 10。其中,玉米浆、葡萄糖分别使用 115 °C 高温灭菌 20 min,盐类及维生素过滤除菌,使用前混合。

1.3.2 质粒的构建

1) 敲除质粒的构建:质粒 pK18mobsacB 为自杀质粒,携带蔗糖致死基因 *sacB*,可通过 2 次同源重组的方法将基因敲除。以野生型谷氨酸棒杆菌基因组

为模板,分别扩增丙酮酸酞氧化还原酶基因 *pqo* 上下游同源臂片段,各约为 500 bp,采用 PCR 扩增的方式,将 pK18mobsacB 质粒线性化,然后将上下游同源臂和线性化后的 pK18mobsacB 质粒进行连接^[22],分别以 U-*pqo*-F、D-*pqo*-R 为上下游引物进行测序,测序正确即可获得敲除质粒 pK18mobsacB Δ*pqo*。其余基因敲除质粒的构建方法相同。

2) 表达质粒的构建:质粒 pEC-XK99E 为大肠-谷棒穿核质粒,携带 *trc* 强启动子,可以用来高效表达内源基因。以野生型谷氨酸棒杆菌基因组为模板,分别以 *tkl*-F、*tkl*-R 为上下游引物扩增转酮醇酶基因 *tkl*,以 *tal*-F、*tal*-R 为上下游引物扩增转醛酶基因 *tal*,以 *pck*-F、*pck*-R 为上下游引物扩增磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因 *pck*,采用 PCR 扩增的方式,将 pEC-XK99E 质粒线性化,将目的基因与线性化的 pEC-XK99E 质粒进行连接^[23],测序正确即可获得组成型表达质粒 pEC-XK99E-*tkl-tal-pck*。

1.3.3 敲除菌株的筛选

将构建好的敲除质粒 pK18mobsacB Δ pqo, 通过电转化的方法转入野生型谷氨酸棒杆菌感受态细胞中, 培养 2 h 收集细胞涂布于含卡那霉素的 LB 平板培养基上, 30 °C 培养 36 ~ 48 h, 在这个过程中发生第 1 次同源重组, 经菌落 PCR 验证, 筛选出正确的转化子接种于 LB 液体培养基中培养 12 h, 培养过程中细胞发生第 2 次同源重组, 将培养液适当稀释涂布于含有蔗糖的固体筛选培养基中, 进行第 2 轮筛选。随机挑取蔗糖平板上的转化子^[24], 分别以 U-pqo-F、D-pqo-R 为上下游引物进行 PCR 扩增, 以野生型菌株为对照, 通过凝胶电泳验证扩增产物的条带大小, 条带正确的菌株即为 QC01 菌株。其余菌株筛选方法相同。

1.3.4 生长曲线测定

将测序正确的菌株 QC01、QC02、QC03、QC04、QC05、pEC01、ATCC13032 分别划线于 BHI 平板上, 30 °C 培养 48 h, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中作为种子, 30 °C、220 r/min 过夜培养 16 h, 以等 OD 值分别转接到 LB 培养基中, 30 °C、220 r/min 摇瓶振荡培养 36 h, 每 4 h 测定 1 次 OD 值, 记录菌株生长情况^[25]。

1.3.5 发酵培养实验

取构建好的 QC01、QC02、QC03、QC04、QC05、pEC01 以及野生型菌株 ATCC13032 分别划线于 BHI 平板上, 30 °C 培养 48 ~ 72 h; 挑取菌体接种于 LB 液体培养基中作为种子液, 30 °C、220 r/min 培养 18 ~ 20 h; 按 4% 的接种量转接至含有 10 g/L 碳酸钙的 25 mL 发酵培养基中, 30 °C、220 r/min 发酵 72 h, 必要情况下添加 IPTG、卡那霉素^[26]。

1.3.6 丙酮酸含量测定

按照丙酮酸含量测定试剂盒说明书进行。

1.4 数据处理

所有实验重复测定 3 次, 采用 Excel 2010 软件进行数据处理及表格绘制。

2 结果与分析

2.1 代谢支流关键基因敲除对丙酮酸合成的影响

2.1.1 敲除菌株的鉴定

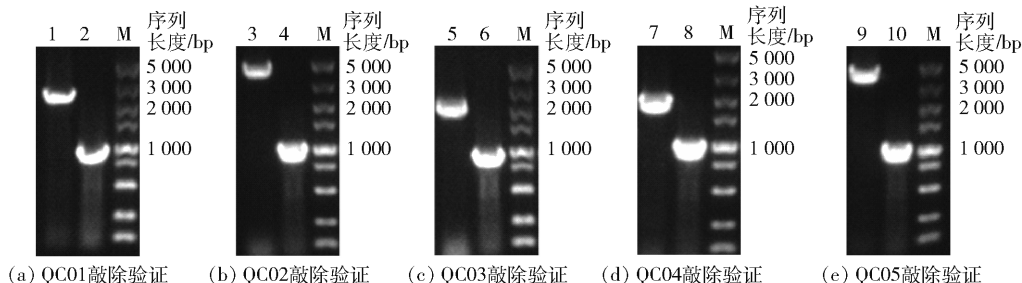
菌株 QC01、QC02、QC03、QC04、QC05 基因敲除验证结果如图 1。以 ATCC13032 为出发菌株, 导入质粒 pK18mobsacB Δ pqo, 经过 2 次同源重组后, 挑取单菌落以 U-pqo-F、D-pqo-R 为上下游引物进行菌落 PCR 验证, 验证结果如图 1(a)。已知用于敲除的上、下游同源臂各为 500 bp, 由图 1(a) 可以看出, 出发菌株条带大小约为 2 700 bp, QC01 条带大小约为 1 000 bp, 表明敲除菌株 QC01 构建成功。

在 QC01 的基础上继续导入质粒 pK18mobsacB Δ pyc, 挑取单菌落以 U-pyc-F、D-pyc-R 为上下游引物进行菌落 PCR 验证, 验证结果如图 1(b)。QC01 条带大小约为 4 200 bp, QC02 条带大小约为 1 000 bp, 表明敲除菌株 QC02 构建成功。

在 QC02 的基础上继续导入质粒 pK18mobsacB Δ alaT, 挑取单菌落以 U-alaT-F、D-alaT-R 为上下游引物进行菌落 PCR 验证, 验证结果如图 1(c)。QC02 条带大小约为 2 300 bp, QC03 条带大小约为 1 000 bp, 表明敲除菌株 QC03 构建成功。

在 QC03 的基础上继续导入质粒 pK18mobsacB Δ avtA, 挑取单菌落以 U-avtA-F、D-avtA-R 为上下游引物进行菌落 PCR 验证, 验证结果如图 1(d)。QC03 条带大小约为 2 100 bp, QC04 条带大小约为 1 000 bp, 表明敲除菌株 QC04 构建成功。

在 QC04 的基础上继续导入质粒 pK18mobsacB Δ aceE, 挑取单菌落以 U-aceE-F、D-aceE-R 为上下游



1—*C. glutamicum*; 2—QC01; 3—QC01; 4—QC02; 5—QC02; 6—QC03; 7—QC03; 8—QC04; 9—QC04; 10—QC05; M—DL 5000 DNA Marker。

图 1 野生型菌株及敲除菌株基因条带大小

Fig. 1 Gene band size of wild-type strain and knockout strains

引物进行菌落 PCR 验证, 验证结果如图 1(e)。QC04 条带大小约为 3 700 bp, QC05 条带大小约为 1 000 bp, 表明敲除菌株 QC05 构建成功。

2.1.2 敲除代谢支流菌株发酵评价

本研究通过基因敲除手段来提高丙酮酸产量, 野生型菌株及敲除菌株丙酮酸产量见图 2。丙酮酸是糖酵解途径的最终产物, 同时又连接着三羧酸循环(TCA), 因为它很容易作为底物代谢成为其他产物, 所以在细胞中难以积累, 因此提高丙酮酸产量的有效方法之一是弱化产物降解^[5]。在谷氨酸棒杆菌中, 丙酮酸酩氧化还原酶(由 *pqo* 基因编码)催化丙酮酸合成乙酸^[27-28], 为了减少丙酮酸转化为乙酸的代谢流, 拟敲除出发菌株 ATCC13032 中的 *pqo* 基因, 得到 QC01 菌株, 摇瓶发酵结果表明, 丙酮酸的产量提升了 136%, 达到 1.30 g/L。

丙酮酸羧化酶(由 *pyc* 基因编码)是谷氨酸棒杆菌回补途径的关键酶, 催化丙酮酸生成草酰乙酸, 从而进入 TCA 循环。因此, 本研究在 QC01 的基础上进一步敲除 *pyc*, 得到 QC02 菌株, 切断了丙酮酸合成草酰乙酸的途径, 在一定程度上弱化了 TCA 循环的回补途径, 从而增加丙酮酸的积累, QC02 菌株的丙酮酸产量较 QC01 提升了 15%, 达到 1.50 g/L。

在谷氨酸棒杆菌中 L-丙氨酸有 2 种合成方式, 一种是由 *alaT* 基因编码的转氨酶催化谷氨酸合成 L-丙氨酸, 另一种是由 *avtA* 基因编码的缬氨酸-丙酮酸氨基转移酶催化缬氨酸合成 L-丙氨酸。Wieschalka 等^[18]发现敲除这 2 个基因可以减少谷氨酸棒杆菌中 L-丙氨酸含量, 增加丙酮酸产量。动力学研究显示, *alaT* 编码的转氨酶是主要的 L-丙氨酸合成酶^[29], 因此, 在 QC02 菌株的基础上进一步敲除 *alaT* 基因, 获得 QC03 菌株, 但发酵后丙酮酸的产量无明显提升, 仅提升 4%, 为 1.56 g/L。罗玉常^[30]研究同样表明, 单独敲除 *alaT* 基因后, 其目标产物产量并没有上升。通过进一步在 QC03 的基础上敲除缬氨酸-丙酮酸氨基转移酶 *avtA* 基因, 发现 QC04 菌株丙酮酸产量提升了 39%, 达到了 2.17 g/L。并且同时敲除这 2 个基因, 并没有造成谷氨酸棒杆菌 L-丙氨酸的营养缺陷, 说明在谷氨酸棒杆菌中, 还有其他潜在路径可以催化合成 L-丙氨酸。

在有氧条件下, 谷氨酸棒杆菌内大部分丙酮酸被丙酮酸脱氢酶复合体(PDHc)转化为乙酰辅酶 A, 因此, 控制乙酰辅酶 A 的代谢通量对丙酮酸的积累具有重要意义^[31]。PDHc 是由 3 种不同酶组成的多

酶复合体, 包括 *aceE* 编码的丙酮酸脱氢酶(E1), *aceF* 编码的二氢硫辛酰转乙酰基酶(E2)和 *lpdA* 编码的二氢硫辛酸脱氢酶(E3), 积累丙酮酸的方法之一就是删除这 3 种 PDHc 酶组分中的任何一种^[5]。因此, 本研究又在 QC04 的基础上敲除 *aceE* 基因, 使 QC05 菌株发酵液中丙酮酸产量达到了 14.64 g/L, 与菌株 QC04 相比产量提升了 6.7 倍。

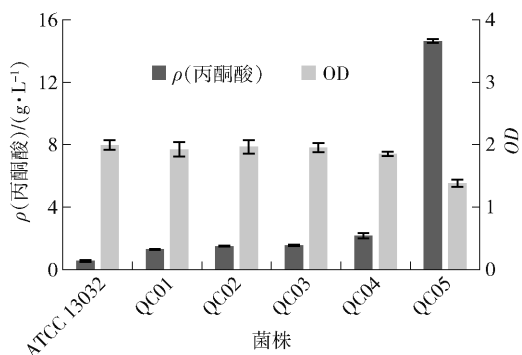


图 2 野生型菌株及敲除菌株丙酮酸产量

Fig. 2 Pyruvate production of wild-type strain and knockout strains

2.1.3 敲除代谢支流菌株生长状况分析

野生型菌株及敲除菌株生长曲线见图 3。由图 3 可以看出, 敲除 *pqo*、*pyc* 基因对谷氨酸棒杆菌的生长状态无明显影响, 单独敲除 *alaT* 基因时, 菌株的生长状态也无明显变化, 但当同时敲除 2 个转氨酶基因 *alaT* 和 *avtA* 之后, 菌株的生长明显受到影响, 因此, 下一步的工作重点可以放在不影响菌体生长的前提下, 减少副产物 L-丙氨酸的积累。在敲除 *aceE* 基因后, 菌株的生长状态发生了大幅下降, 这是因为中心代谢途径缺乏乙酰辅酶 A 而导致工作障碍, 这时需要添加外源二级碳源, 如乙酸盐等来保证菌体的正常生长^[32]。因此, 又在 QC05 菌株的种子液中添加了 5 mg/mL 的乙酸钠观察其生长曲线, 发现菌株恢复正常的生长。QC05 菌株添加乙酸钠后的丙酮酸产量见图 4, 由图 4 可以看出其丙酮酸产量, 与未添加外源碳源相比严重下降, 只有 10.12 g/L, 推测原因可能是, 谷氨酸棒杆菌具有将乙酸转化成乙酰辅酶 A 的能力, 细胞恢复生长, 代谢加快, 从而促进丙酮酸转化为乳酸等副产物^[26], 导致产量降低。

2.2 合成途径关键基因过表达对丙酮酸合成的影响

增加前体物的供应, 是提高产物产量的另一有效策略^[33], 过表达菌株丙酮酸产量见图 6。本研究

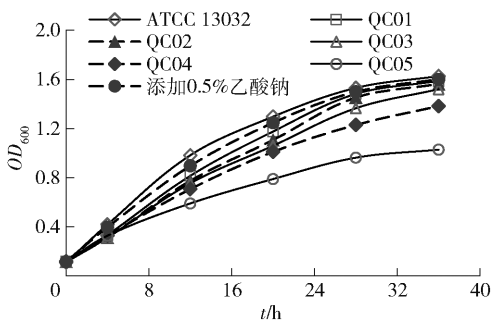


图3 野生型菌株及敲除菌株生长曲线

Fig. 3 Growth curves of wild-type strain and knockout strains

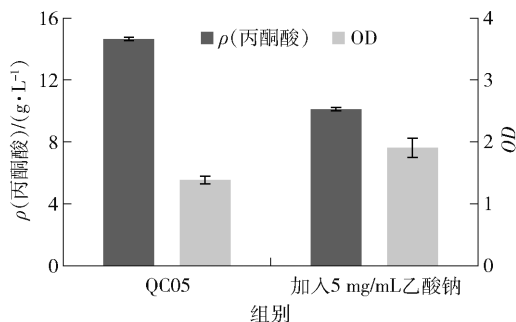


图4 添加乙酸钠后 QC05 菌株丙酮酸产量

Fig. 4 Pyruvate production of strain QC05 after adding sodium acetate

对3个谷氨酸棒杆菌内源基因进行过表达,分别是编码转酮醇酶的基因 *tkt*、编码转醛酶的基因 *tal* 和编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的基因 *pck*,以期提高参与合成丙酮酸的前体物质的含量。将质粒 pEC-XK99E-*tkt-tal-pck* 通过电转化导入构建好的菌株 QC05 中,即可得到菌株 pEC01,经 72 h 摇瓶发酵,丙酮酸产量达到了 15.39 g/L。其中,转酮醇酶 *tkt* 基因和转醛酶 *tal* 基因可以在糖酵解和磷酸戊糖途径之间建立可逆反应,这2个基因的过表达可以增加磷酸戊糖途径中3-磷酸甘油醛和6-磷酸果糖进入糖酵解途径的通量^[34-35]。磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 *pck* 基因可以催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸,其在丙酮酸激酶的催化下生成丙酮酸,并将高能磷酸根转移到 ADP 上生成 ATP^[36-37]。

3 结论

本研究以野生型谷氨酸棒杆菌为出发菌株,首先敲除编码丙酮酸酩氧化还原酶基因 *pqo*,减少丙酮酸向乙酸的代谢流,丙酮酸产量由 0.55 g/L 提升至 1.30 g/L;在此基础上又敲除编码丙酮酸羧化酶

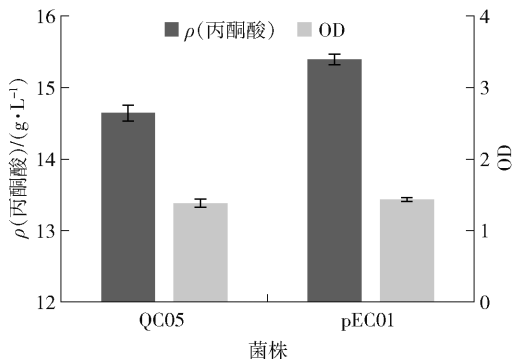


图5 过表达菌株丙酮酸产量

Fig. 5 Pyruvate production of overexpressed strain

基因 *pyc*,减少了丙酮酸向草酰乙酸的转化,产量进一步提升至 1.50 g/L;继而又敲除编码转氨酶基因 *alaT*、编码缬氨酸-丙酮酸氨基转移酶基因 *avtA*,以减少丙酮酸向 L-丙氨酸的转化,产量达到 2.17 g/L;最后敲除编码丙酮酸脱氢酶基因 *aceE*,摇瓶发酵 72 h,丙酮酸的产量达到 14.64 g/L。为了进一步增加丙酮酸通路代谢流,以质粒 pEC-XK99E 为载体,同时过表达编码转酮醇酶基因 *tkt*、转醛酶基因 *tal*、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因 *pck*,发酵液中丙酮酸的产量最终达到 15.39 g/L。

本研究使用的谷氨酸棒杆菌发酵生产丙酮酸与化学合成相比,产生的污染少,对环境更加友好,可为日后微生物发酵生产丙酮酸提供理论基础和参考。但是目前发酵培养基的成本较高,并且与大肠杆菌和解脂耶氏酵母相比,本研究丙酮酸产量还是相对较低,一是没有进行发酵罐水平的生产,二是流向丙酮酸的代谢支流没有完全敲除,且细胞代谢较慢。下一步研究可以针对以下几个方向:1)对乙酸钠、碳酸钙以及维生素等的添加量进行优化;2)敲除流向乳酸、缬氨酸、亮氨酸、苹果酸的代谢流;3)针对细胞内的辅因子进行动态调控;4)谷氨酸棒杆菌可以利用多种碳源,可以引入木糖以及阿拉伯糖代谢途径,选择利用麦秸秆水解液等廉价木质纤维素为原料进行丙酮酸生产。

参考文献:

[1] WANG S, YANG Y, YU K, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for producing pyruvate from glycerol [J]. 3 Biotech, 2022, 12(4): 98-108.
 [2] 叶虹婷,白光宇,邹丽娜,等. 丙酮酸钙对高脂饮食大鼠肥胖和高血脂症的预防作用 [J]. 预防医学论坛, 2020, 26(11): 870-872.

- YE H T, BAI G Y, ZOU L N, et al. Preventive effect of calcium pyruvate on obesity and hyperlipidemia in high fat diet rats [J]. Preventive Medicine Tribune, 2020, 26(11): 870–872.
- [3] PLOTNIKOV E, LOSENKOV I, EPIMAKHOVA E, et al. Protective effects of pyruvic acid salt against lithium toxicity and oxidative damage in human blood mononuclear cells [J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2019, 9(2): 302–306.
- [4] LUO Z S, ZENG W Z, DU G C, et al. Enhanced pyruvate production in *Candida glabrata* by engineering ATP futile cycle system [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(4): 787–795.
- [5] MOXLEY W C, EITEMAN M A. Pyruvate production by *Escherichia Coli* by use of pyruvate dehydrogenase variants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(13): e0048721.
- [6] GOUGH S, DOSTAL L, HOWE A, et al. Production of pyruvate from lactate using recombinant *Pichia pastoris* cells as catalyst [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2597–2601.
- [7] YUAN W, LIN X, ZHONG S, et al. Enhanced pyruvic acid yield in an osmotic stress-resistant mutant of *Yarrowia lipolytica* [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2020, 44: 19–24.
- [8] LUO Z S, ZENG W Z, DU G C, et al. A high-throughput screening procedure for enhancing pyruvate production in *Candida glabrata* by random mutagenesis [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017, 40(5): 693–701.
- [9] KATAOKA N, VANGNAI A S, PONGTHARANGKUL T, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a prototrophic pyruvate-producing strain; characterization of a RamA-deficient mutant and its application for metabolic engineering [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(2): 372–380.
- [10] XU G Q, HUA Q, DUAN N J, et al. Regulation of thiamine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* for improved pyruvate production [J]. Yeast, 2012, 29(6): 209–217.
- [11] GAUTTAM R, DESIDERATO C K, RADOŠ D, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of UDP-N-acetylglucosamine [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 748510.
- [12] YAO C Z, SHI F, WANG X Y. Chromosomal editing of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 to produce gamma-aminobutyric acid [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2023, 70(1): 7–21.
- [13] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, BASTOS M D L, et al. Safety and efficacy of L-tryptophan produced by fermentation with *Corynebacterium glutamicum* KCCM 80176 for all animal species [J]. EFSA Journal, 2019, 17(6): 29–57.
- [14] JIN C, BAO J. Lysine production by dry biorefining of wheat straw and cofermentation of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(6): 1900–1906.
- [15] LIU J, XU J Z, WANG B B, et al. L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* based on systematic metabolic engineering: progress and prospects [J]. Amino Acids, 2021, 53(9): 1301–1312.
- [16] LEE M J, KIM P. Recombinant protein expression system in *Corynebacterium glutamicum* and its application [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 23–25.
- [17] CHEN J Z, WANG Y, GUO X, et al. Efficient bioproduction of 5-aminolevulinic acid, a promising biostimulant and nutrient, from renewable bioresources by engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1): 16–25.
- [18] WIESCHALKA S, BLOMBACH B, EIKMANN S B J. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(2): 449–459.
- [19] BLOMBACH B, SCHREINER M E, HOLÁTKO J, et al. (L)-Valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2079–2084.
- [20] XIAO S Y, XU J L, CHEN X Y, et al. 3-Methyl-1-butanol biosynthesis in an engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Molecular Biotechnology, 2016, 58(5): 311–318.
- [21] RADOŠ D, CARVALHO A L, WIESCHALKA S, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of 2,3-butanediol [J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 171.
- [22] 王丽君, 闫思翰, 杨套伟, 等. 代谢改造重组谷氨酸棒杆菌 C4 途径高效合成 5-氨基乙酰丙酸 [J]. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4314–4328.
- WANG L J, YAN S H, YANG T W, et al. Engineering the C4 pathway of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of 5-aminolevulinic acid [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(12): 4314–4328.
- [23] 张海灵, 李颜颜, 王小元. 代谢工程改造谷氨酸棒杆

- 菌合成及分泌途径生产 L-缬氨酸 [J]. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1606 – 1619.
- ZHANG H L, LI Y Y, WANG X Y. Metabolic engineering of L-valine synthesis and secretory pathways in *Corynebacterium glutamicum* for higher production [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(10): 1606 – 1619.
- [24] 靳鑫, 王苏蒙, 祁庆生, 等. 谷氨酸棒杆菌生产异亮氨酸辅因子策略及其基因组整合研究进展 [J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 176 – 188.
- JIN X, WANG S M, QI Q S, et al. Cofactor strategy and genome integration of L-isoleucine production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Current Biotechnology, 2022, 12(2): 176 – 188.
- [25] 于莹, 许涓雪, 刘金雷, 等. 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生成丙酮酸 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 226 – 232.
- YU Y, XU M X, LIU J L, et al. Metabolic engineering for modifying *Corynebacterium glutamicum* to produce more pyruvate [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 226 – 232.
- [26] 李宁. 谷氨酸棒杆菌合成 O-乙酰-L-高丝氨酸关键代谢过程调控 [D]. 无锡: 江南大学, 2020: 24 – 25.
- LI N. Regulation of key metabolic processes to biosynthesize O-acetyl-L-homoserine in *Corynebacterium glutamicum* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020: 24 – 25.
- [27] BUCHHOLZ J, SCHWENTNER A, BRUNNENKAN B, et al. Platform engineering of *Corynebacterium glutamicum* with reduced pyruvate dehydrogenase complex activity for improved production of L-lysine, L-valine, and 2-ketoisovalerate [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(18): 5566 – 5575.
- [28] YANASE M, AIKOH T, SAWADA K, et al. Pyruvate kinase deletion as an effective phenotype to enhance lysine production in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032: redirecting the carbon flow to a precursor metabolite [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(2): 160 – 167.
- [29] MARIENHAGEN J, EGDELING L. Metabolic function of *Corynebacterium glutamicum* aminotransferases AlaT and AvtA and impact on L-valine production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(24): 7457 – 7462.
- [30] 罗玉常. 产 L-丝氨酸谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 的代谢工程 [D]. 无锡: 江南大学, 2012: 46 – 47.
- LUO Y C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 for L-serine production [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012: 46 – 47.
- [31] KRÜEGER A, WIECHERT J, GÄETGENS C, et al. Impact of CO₂/HCO₃- availability on anaerobic flux in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains [J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(20): 387 – 419.
- [32] KRAUSE F S, BLOMBACH B, EIKMANN B J. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8053 – 8061.
- [33] WANG Y Y, SHI K, CHEN P, et al. Rational modification of the carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to enhance L-leucine production [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2020, 47(6/7): 485 – 495.
- [34] MAO Y F, LI G Y, CHANG Z S, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinate from lignocellulosic hydrolysate [J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 95.
- [35] MATSUSHIKA A, GOSHIMA T, FUJII T, et al. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(1): 16 – 25.
- [36] XU J Z, WU Z H, GAO S J, et al. Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(9): 18 – 58.
- [37] LI Q, WU H, LI Z M, et al. Enhanced succinate production from glycerol by engineered *Escherichia coli* strains [J]. Bioresource Technology, 2016, 218(2): 217 – 223.

Modification of *Corynebacterium glutamicum* by Metabolic Engineering for Pyruvate Production

FANG Zhe, CAO Wenjun, LIU Juan, ZHANG Siqi, XIAO Zhiqiang, SHAN Yang*

(1. Longping Branch, College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China;

2. Institute of Agricultural Product Processing, Hunan Academy of Agricultural Sciences/Hunan Province Key Lab of Fruits & Vegetables Storage, Processing, Quality and Safety/Hunan Province International Joint Lab on Fruits & Vegetables Processing, Quality and Safety, Changsha 410125, China)

Abstract: Pyruvate is an essential organic acid which plays an important role in the energy metabolism of living organisms. As a precursor, pyruvate can be involved in the biosynthesis of many organic compounds. Therefore, metabolic engineering was used to modify *Corynebacterium glutamicum* for pyruvate production. Five key genes (pyruvate quinone oxidoreductase gene *pqo*, pyruvate carboxylase gene *pyc*, aminotransferase gene *alaT*, valine-pyruvate aminotransferase gene *avtA*, pyruvate dehydrogenase gene *aceE*), related to pyruvate metabolic tributaries in *Corynebacterium glutamicum*, were successfully knocked out by homologous recombination. The concentration of pyruvate reached 14.64 g/L after 72 h of fermentation in shaking flasks. Then, transketolase gene *tkt*, transaldolase gene *tal*, and phosphoenolpyruvate carboxylase gene *pck* were overexpressed to increase the supply of precursors for pyruvate synthesis. After 72 h of fermentation in shake flasks, pyruvate production reached 15.39 g/L, which was 28 times higher than that of the wild-type strain. This study aimed to provide theoretical basis and reference for application of pyruvic acid production by microbial fermentation.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; pyruvate; metabolic engineering; homologous recombination; overexpression

(责任编辑:张逸群)