

敲除 *aceA* 和 *gogat* 及过表达 *gltA* 对谷氨酸棒状杆菌 GKGD 合成 α -酮戊二酸的影响

薛宁¹, 李智祥¹, 战俊杰¹, 赵磊¹, 梁云龙¹, 冯甲¹,
刘涛¹, 徐庆阳^{1,2,3}, 张成林^{1,2,3}, 陈宁^{1,2,3*}

1(天津科技大学 生物工程学院, 天津, 300457) 2(代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津, 300457)

3(天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室, 天津, 300457)

摘要 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)在生命活动中具有重要的作用,被广泛应用于食品、医药等领域。以 α -KG 生产菌谷氨酸棒状杆菌 GKGD 为出发菌株,敲除其异柠檬酸裂解酶编码基因 *aceA* 以增加异柠檬酸供应,获得 GKGD-1,摇瓶发酵条件下其 α -KG 产量和转化率分别提高 14.72% 和 9.76%;敲除谷氨酸合酶编码基因 *gogat* 以降低 *L*-谷氨酸生成量,获得 GKGD-2,其 α -KG 产量和转化率分别提高 7.39% 和 5.43%, *L*-谷氨酸生成量降低 52.87%;过表达柠檬酸合酶编码基因 *gltA* 以进一步增加前体物供应,获得 GKGD-3,其 α -KG 产量提高 35.9%;于 7.5 L 发酵罐经 30 h 发酵, GKGD-3 α -KG 产量达 49.5 g/L,较出发菌株提高 36.4%, *L*-谷氨酸生成量降低 50%。敲除 *aceA* 和 *gogat* 并过表达 *gltA* 可显著提高 α -KG 产量并降低 *L*-谷氨酸生成量。

关键词: α -酮戊二酸; *L*-谷氨酸; 谷氨酸合酶; 异柠檬酸裂解酶; 柠檬酸合酶

α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)是 TCA 循环中的重要中间产物,参与氨基酸、维生素、有机酸及能量代谢^[1-2],被广泛应用于化工、食品、医药、日化等领域^[3-6]。目前主要采用化学法生产 α -KG,但因收率低、氧化物污染等问题制约了其在医药和食品等领域的应用^[7]。发酵法生产 α -KG 因具有成本低、收率高、副产物少等优点而被认为具有很大的工业化生产的潜力。

发酵法生产 α -酮戊二酸最早始于 LOCKWOOD 和 STODOLA 对利用荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)生物合成 α -酮戊二酸的研究^[7-9]。自 20 世纪 70 年代,人们陆续发现耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)等酵母菌亦能过量合成 α -酮戊二酸^[10-15]。然而利用酵母合成 α -KG 周期较长(大于 120 h)^[10-15]。谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)具有过量合成 *L*-谷氨酸的能力,而 *L*-谷氨酸主

要来源于 α -KG 的氨基化,因此被认为是具有 α -KG 生产潜力的微生物^[16-17]。在前期研究中,我们以 *L*-谷氨酸生产菌 *C. glutamicum* GDK-9 为出发菌株经代谢工程改造获得的 *C. glutamicum* GKGD α -KG 产量达到 45.6 g/L^[18]。

如图 1 所示,在谷氨酸棒状杆菌中,葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸并被催化生成草酰乙酸和乙酰-CoA,二者经柠檬酸合酶催化生成柠檬酸,后者经催化生成异柠檬酸,进而经异柠檬酸脱氢酶催化合成 α -KG^[19]。同时,异柠檬酸可经异柠檬酸裂解酶催化

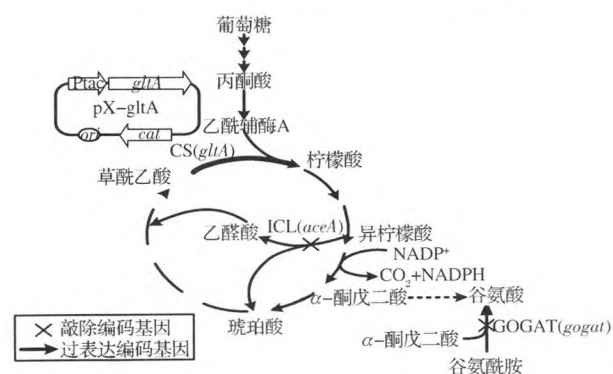


图 1 谷氨酸棒状杆菌 α -KG 合成途径及本研究改造策略
Fig.1 α -KG synthesis pathway in *C. glutamicum* and strategy for strain genetic modification in this study

第一作者: 博士研究生(陈宁教授为通讯作者, E-mail: ningch@tust.edu.cn)。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31300069); 天津科技大学青年教师创新基金(2016LG07); 天津市科技支撑计划重点项目(12ZCZDSY01900); 天津市科委科技特派员项目(15JCTPJC62800); 天津市大学生创新创业训练计划项目(201710057039、201510057063)

收稿日期: 2017-03-30, 改回日期: 2017-04-20

生成乙醛酸和琥珀酸。 α -KG 主要存在 3 条代谢途径:(1) 经 α -酮戊二酸脱氢酶氧化为琥珀酸;(2) 经谷氨酸脱氢酶氨基化为 *L*-谷氨酸;(3) 经谷氨酸合酶催化生成 *L*-谷氨酸。在 GKGD 中,途径(1)被弱化,途径(2)被阻断^[18-19]。因此,本研究以 GKGD 为出发菌株拟采用阻断乙醛酸循环和谷氨酸合成途径并增强柠檬酸合成代谢策略通过敲除异柠檬酸裂解酶编码基因 *aceA* 和谷氨酸合酶编码基因 *gogat* 并过

表达柠檬酸合酶编码基因 *gluA* 以期增加 α -KG 的合成(图 1)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株及质粒

本研究所用菌株及质粒如表 1 所示。

表 1 菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株或质粒	特性	来源或参考文献
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	As host for plasmid duplication	[20]
GKGD	<i>C. glutamicum</i> GDK-9 with deletion of <i>gdh</i>	[18]
GKGD-1	GKGD with deletion of <i>aceA</i>	This work
GKGD-2	GKGD-1 with deletion of <i>gogat</i>	This work
GKGD-3	GKGD-2 harboring pX- <i>gluA</i>	This work
GKGDpM	GKGD harboring pXMJ19	This work
GKGDpX	GKGD-2 harboring pXMJ19	This work
pK18mobsacB	Integration vector, Km ^r oriV _{Ec} oriT <i>sacB</i>	[21]
pXMJ19	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, Cm ^r	Lab stored
pX- <i>gluA</i>	pXMJ19 carrying the <i>gluA</i>	This work
pK18mobsacB Δ <i>aceA</i>	Plasmid for <i>aceA</i> knockout	This work
pK18mobsacB Δ <i>gogat</i>	Plasmid for <i>gogat</i> knockout	This work

1.1.2 引物

参考 NCBI 中 *C. glutamicum* ATCC13032 *aceA* 和 *gluA* 及 *gogat* 序列,采用 Primer5.0 软件设计引物(表 2)。

表 2 引物
Table 2 Primers

引物名称	序列(5'-3')
<i>aceA</i> -1	GGCgaattcGGCTCCTTTTAAAGCATGGGT(<i>EcoR</i> I)
<i>aceA</i> -2	GCTGGTCTGGGAAGTCTGAGCGACATCAAAGTCACTTCTTAAGTGC
<i>aceA</i> -3	GCACTTAAGGAAGTGACTTTGATGCTCGCTCTGACTTCCAGACCAGC
<i>aceA</i> -4	GGCgtcgacGTATGCTTTTCATTGACGACTTTAAT(<i>Sal</i> I)
<i>gogat</i> -1	GATaagcttGAAACCACAAGGACTCTACAAC(<i>Hind</i> III)
<i>gogat</i> -2	ATAAATGCGTTGTCCAGGGCTGAAGATAGCGACGGGAAATACA
<i>gogat</i> -3	TGTATTTCCCGTCGCTATCTTCAGCCCTGGACAACGCATTTAT
<i>gogat</i> -4	TAAggaatccATTGATCTTCTGCTTTAGGTCC(<i>Bam</i> H I)
<i>gluA</i> -1	GGCaaagcttGGAAGACTTTTTTCCGAACAAATA(<i>Hind</i> III)
<i>gluA</i> -2	GGCgaattc TTAGCGCTCTCGCGAGG(<i>EcoR</i> I)

1.1.3 培养基

利用 LB 培养基培养大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌,必要时添加卡那霉素(50 μ g/mL)或氯霉素(30 μ g/mL)。

摇瓶种子培养基:葡萄糖 25 g/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.9 g/L, 尿素 3.5 g/L, 玉

米浆 40 mL/L, 豆粕水解液 15 mL/L, pH 7.0 ~ 7.2, 121 $^{\circ}C$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

摇瓶发酵培养基:葡萄糖 80 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.8 g/L, Na_2HPO_4 2.8 g/L, KCl 1.3 g/L, V_{B1} 0.23 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.3 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.3 mg/L, 玉米浆 1 mL/L, 豆粕水解液 15 mL/L, pH 7.0 ~ 7.2, 121 $^{\circ}C$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

发酵罐种子培养基:葡萄糖 30 g/L, 玉米浆 35 mL/L, 豆粕水解液 20 mL/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.9 g/L, pH 7.0 ~ 7.2, 121 $^{\circ}C$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

发酵罐发酵培养基:葡萄糖 80 g/L, Na_2HPO_4 3 g/L, KCl 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mg/L, $ZnSO_4$ 5 mg/L, V_{B1} 0.4 mg/L, 玉米浆 3 mL/L, 豆粕水解液 20 mL/L, 必要时加入谷氨酸钠 2 g/L, pH 7.0 ~ 7.2, 121 $^{\circ}C$ 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.4 试剂

限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶,宝生物工程(大连)有限公司;PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒,北京博迈德生物技术有限公司;异柠檬酸裂解酶试剂盒、柠檬酸合

酶试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;α-KG:分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

生物传感仪(SBA-40C),山东省科学院生物研究所;高效液相色谱仪(Agilent 1100),美国安捷伦科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 用于 *aceA* 和 *gogat* 敲除及 *gltA* 基因过表达重组质粒的构建

以 GKGD 基因组为模板利用引物 *aceA*-1 和 *aceA*-2 及 *aceA*-3 和 *aceA*-4 获得 *aceA* 基因上下游同源片段,并以其为模板利用引物 *aceA*-1 和 *aceA*-4 获得重组片段。回收后经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切、电泳、回收并连接 pK18mobsacB 后转化至 *E. coli* DH5α 中。经筛选后提取重组质粒进行酶切验证,将重组质粒命名为 pK18mobsacB Δ*aceA*。同理获得用于 *gogat* 敲除的重组质粒 pK18mobsacB Δ*gogat*。

以 GKGD 基因组 DNA 为模板利用引物 *gltA*-1 和 *gltA*-2 扩增获得 *gltA* 片段,回收后经 *Hind* I 和 *EcoR* I 酶切、回收并连接 pXMJ19 后转化至 *E. coli* DH5α 中。经筛选后提取重组质粒进行酶切验证,将重组质粒命名为 pX-*gltA*。

1.3.2 重组菌株 GKGD-1、GKGD-2 和 GKGD-3 的构建

取适宜浓度的 pK18mobsacB Δ*aceA* 电转化至 GKGD 感受态细胞(2.5 kV, 25 μF, 200 Ω, 1 mm 电击杯)^[22]。将电转后的菌液涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,32 ℃ 倒置培养 36 h 后,挑取单菌落活化后提取其基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定。将阳性转化子在 10% 蔗糖的 LB 摇管中反复传代后,筛选在 LB 平板上生长、在含卡那霉素平板上不生长的单菌落,提取其基因组 DNA 进行 PCR 验证,获得 *aceA* 基因缺失菌株 GKGD-1。采用相同方法获得 *gogat* 敲除菌株 GKGD-2。

提取质粒 pXMJ19 及 pX-*gltA* 电转化至 GKGD-2、将 pXMJ19 电转化至 GKGD,经活化后涂布于含氯霉素平板进行筛选,挑选单菌落并提取质粒经酶切验证,分别获得 GKGDpX、GKGD-3 和 GKGDpM。

1.3.3 酶活性测定

收集培养至对数中期的菌体,分别按异柠檬酸裂解酶试剂盒和柠檬酸合酶试剂盒说明书处理菌体并测定异柠檬酸裂解酶和柠檬酸合酶活性。

1.3.4 摇瓶发酵

将种子培养物按 10% 的接种量接种至含 30 mL 摇瓶发酵培养基的 500 mL 挡板瓶中,于 34 ℃ 200 r/min 振荡培养,维持 pH 7.0 ~ 7.2。GKGDpM、GKGDpX 和 GKGD-3 生长至 OD₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8 时添加 0.2 mmol/L 的 IPTG。

1.3.5 发酵罐发酵

以 15% 接种量将种子培养物接至含 4.5 L 发酵培养基的 7.5 L 发酵罐中,发酵温度为 34 ℃;通气量为 2 ~ 5 L/min,搅拌转速 200 ~ 1 000 r/min;分阶段控制溶氧:发酵初期维持 30%,稳定期维持 50% ~ 60%,发酵后期维持 40%。待细胞转型后,以 25% NaOH 调节 pH 7.0 ~ 7.2;根据需要流加泡敌消泡。发酵过程中,流加 80% ~ 90% 的葡萄糖溶液,维持残糖 1% ~ 2%。

1.3.6 葡萄糖、L-谷氨酸和 α-KG 含量测定及数据分析

采用 SBA-40C 生物传感仪测定葡萄糖和 L-谷氨酸浓度。

采用 Agilent 1100 高效液相色谱仪测定 α-KG 浓度。色谱柱 Bio-Rad Aminex HPLC-87H(300 mm × 7.8 mm, L × I.D.);流动相 0.005 mol/L H₂SO₄;柱温 30 ℃;流速 0.5 mL/min;检测波长 215 nm。

根据公式 $DCW = 0.2445 \times OD_{600} - 0.0126$ 计算菌体干重(dry cell weight, DCW)。

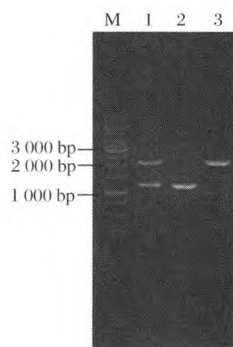
1.4 数据分析

每组实验均设 3 个平行并重复 3 次,利用 Origin 8.0 和 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行分析 and 处理。

2 结果与讨论

2.1 异柠檬酸裂解酶编码基因 *aceA* 敲除对 α-KG 合成的影响

异柠檬酸经异柠檬酸裂解酶催化生成乙醛酸和琥珀酸^[19],从而减弱 α-KG 合成代谢流,故认为阻断该途径可为 α-KG 提供更多的前体物异柠檬酸。将重组质粒 pK18mobsacB Δ*aceA* 转化至 GKGD 后经筛选,挑选重组子利用引物 *aceA*-1 和 *aceA*-4 对其进行 PCR 鉴定,获得碱基数约为 2 000 bp 和 1 200 bp 的片段,与理论值 2 104 bp 和 1 240 bp 一致(图 2),表明 pK18mobsacB Δ*aceA* 成功整合至 GKGD 基因组。利用引物 *aceA*-1 和 *aceA*-4 对第二次重组的重组子进行 PCR 鉴定,获得碱基数约为 1 200 bp 的片段,与理论值 1 240 bp 一致,表明 *aceA* 被成功敲除,命名为 GKGD-1。



M - DNA marker; 1 - 以第 1 次重组的菌株基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳图谱; 2 - 以第 2 次重组的菌株 (即 GKGD-1) 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳图谱; 3 - 以 GKGD 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳图谱

图 2 *aceA* 基因敲除株 GKGD-1 的 PCR 鉴定图谱

Fig.2 Map for identification of *aceA*-knockout strain GKGD-1

分别收集培养至对数中期的 GKGD 和 GKGD-1

菌体细胞测定其异柠檬酸裂解酶活性,结果表明,GKGD-1 未检测到异柠檬酸裂解酶活性,进一步说明 *aceA* 被成功敲除 (表 3)。

表 3 各菌株异柠檬酸裂解酶和柠檬酸合酶活性
Table 3 Activity of Isocitrate lyase and citrate synthase of strains

菌株	酶活性/[nmol · (min · g) ⁻¹]	
	异柠檬酸裂解酶	柠檬酸合酶
GKGD	1.39 ± 0.02	2.01 ± 0.06
GKGD-1	- *	- **
GKGD-3	- -	4.28 ± 0.12

注: * 未检测到; ** :未检测。

利用 GKGD-1 进行摇瓶发酵,以测定 *aceA* 敲除对其 α -KG 合成的影响。结果如表 4 所示,GKGD-1 的 α -KG 产量和转化率分别为 12.86 g/L 和 8.66%,较出发菌株 GKGD 分别提高 14.72% 和 9.76%,而其生物量未见明显变化。

表 4 各菌株摇瓶发酵参数

Table 4 Fermentation parameters in flask by strains

参数	DCW/ (g · L ⁻¹)	α -KG/ (g · L ⁻¹)	单位菌体产量/ (g · g ⁻¹)	谷氨酸/ (g · L ⁻¹)	转化率/ %
GKGD	6.37 ± 0.09	11.21 ± 0.01	1.76 ± 0.02	2.29 ± 0.06	7.89 ± 0.04
GKGD-1	6.51 ± 0.08	12.86 ± 0.05	1.98 ± 0.04	2.44 ± 0.17	8.66 ± 0.02
GKGD-2	6.53 ± 0.07	13.81 ± 0.03	2.11 ± 0.06	1.15 ± 0.12	9.13 ± 0.04
GKGDpM	6.01 ± 0.03	10.50 ± 0.03	1.77 ± 0.06	2.12 ± 0.11	7.91 ± 0.03
GKGDpX	5.92 ± 0.04	12.50 ± 0.05	2.11 ± 0.04	1.18 ± 0.27	8.95 ± 0.05
GKGD-3	5.73 ± 0.11	14.27 ± 0.09	2.49 ± 0.03	1.51 ± 0.35	9.27 ± 0.01

2.2 谷氨酸合酶编码基因 *gogat* 敲除对 α -KG 合成的影响

1 分子 α -KG 和谷氨酰胺经谷氨酸合酶催化生成 2 分子 L-谷氨酸^[19],故推测阻断该途径可增强 α -KG 的积累并减少副产物 L-谷氨酸的合成。将重组质粒 pK18mobsacB Δ *gogat* 转化至 GKGD-1 后经筛选,挑选重组子利用引物 *gogat*-1 和 *gogat*-4 对其进行 PCR 鉴定,获得碱基数约为 4 000 bp 和 1 000 bp 的片段,与理论值 4 328 bp 和 1 184 bp 一致 (图 3),表明 pK18mobsacB Δ *gogat* 成功整合至 GKGD-1 基因组。利用引物 *gogat*-1 和 *gogat*-4 对第二次重组的重组子进行 PCR 鉴定,获得碱基数约为 1 000 bp 的片段,与理论值 1 184 bp 一致,表明 *gogat* 被成功敲除,命名为 GKGD-2。

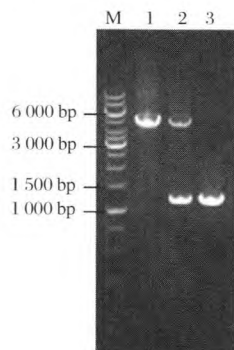
利用 GKGD-2 进行摇瓶发酵,以测定 *gogat* 敲除对其 α -KG 合成的影响。结果如表 4 所示,GKGD-2 的 α -KG 产量和转化率分别为 13.81 g/L 和 9.13%,

较出发菌株 GKGD-1 分别提高 7.39% 和 5.43%,较 GKGD 分别提高 21.19% 和 15.72%,其 L-谷氨酸积累量为 1.15 g/L,较 GKGD-1 降低 52.87%,而其生物量未见明显变化。由此可见,阻断谷氨酸合酶途径可显著增强 α -KG 的积累并减少副产物 L-谷氨酸的合成。

2.3 过表达柠檬酸合酶编码基因 *gltA* 对 α -KG 合成的影响

柠檬酸合酶催化柠檬酸合成,是 TCA 循环中的关键酶^[19]。以 GKGD 基因组为模板利用引物 *gltA*-1 和 *gltA*-2 扩增获得柠檬酸合酶编码基因 *gltA* 片段 (图 3A),将其克隆并转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。将筛选获得的转化子活化后提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定。质粒经 PCR 扩增获得碱基数为约 1 300 bp 的片段与理论值 1 314 bp 一致;质粒经单、双酶切分别获得碱基数约为 8 000 bp 及 7 000 bp 和 1 300 bp 的片段,与理论值 7 915 bp 及 6 601 bp

和 1 314 bp 一致(图 4A),表明质粒构建成功,命名为 pX-gltA。将重组质粒 pX-gltA 转化至 GKGD-2,筛选获得的转化子活化后提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定,获得片段的碱基数与理论值一致(图 4B),表明菌株构建成功,命名为 GKGD-3。分别收集培养至对数中期的 GKGD 和 GKGD-3 菌体细胞测定其柠檬酸合酶活性,发现 GKGD-3 的柠檬酸合酶活性较 GKGD 提高 112.9%,由此可见,过表达 *gltA* 可有效提高柠檬酸合酶活性(表 3)。



M - DNA marker; 1 - 以第 1 次重组的菌株基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳图谱; 2 - 以第 2 次重组的菌株(即 GKGD-2)基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳图谱; 3 - 以 GKGD-1 基因组 DNA 为模

板的 PCR 产物电泳图谱

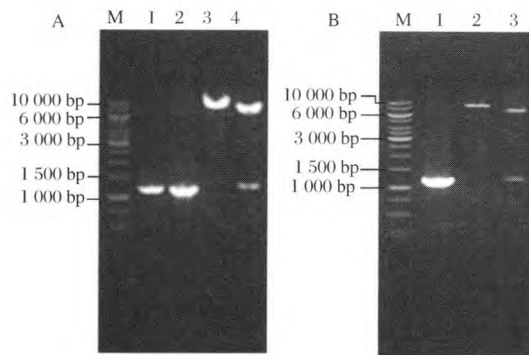
图 3 *gogat* 基因敲除株 GKGD-2 的 PCR 鉴定图谱

Fig. 3 Map for identification of *gogat*-knockout strain GKGD-2

利用 GKGD-3 进行摇瓶发酵,以测定过表达柠檬酸合酶对其 α -KG 合成的影响。结果如表 4 所示, GKGD-3 的 α -KG 产量为 14.27 g/L,分别较对照菌株 GKGDpX 和 GKGDpM 提高 14.16% 和 35.9%。值得注意的是,与 GKGD-2 相比 GKGD-3 α -KG 产量提高不显著,但其单位菌体产量提高 18.01%。其原因可能是质粒造成菌体生长和代谢负担致使生物量下降 12.4%。因此在后续研究中可采用基因整合的方式将 *gltA* 启动子替换为强启动子(如 *P_{tuf}* 等)以增强 *gltA* 的表达量同时不影响菌体生物量。

2.4 发酵罐条件下 GKGD-3 的发酵特性

利用重组菌株 GKGD-3 于 7.5 L 发酵罐进行发酵实验,以 GKGD 和 GKGDpM 为对照,结果如表 5 和图 5 所示。经 30 h 发酵, GKGD-3 α -KG 产量达到 49.5 g/L,分别较对照菌株 GKGDpM 和 GKGD 提高 36.4% 和 9.8%;其单位菌体产量为 3.9 g/g,分别较 GKGDpM 和 GKGD 提高 39.3% 和 50.0%;L-谷氨酸



A: pX-gltA 的 PCR 及酶切鉴定图谱

M - marker; 1 - 以 GKGD 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物电泳图谱; 2 - 以重组质粒 pX-gltA 为模板 PCR 产物电泳图谱; 3 - 重组质粒 pX-gltA 单酶切产物电泳图谱; 4 - 重组质粒 pX-gltA 双酶切产物电泳图谱

B: 从 GKGD-3 提取质粒的 PCR 及酶切鉴定图谱

M - marker; 1 - 以从 GKGD-3 提取质粒的重组质粒 pX-gltA 为模板 PCR 产物电泳图谱; 2 - 从 GKGD-3 提取质粒的重组质粒 pX-gltA 的单酶切产物电泳图谱; 3 - 从 GKGD-3 提取质粒的重组质粒 pX-gltA 的双酶切产物电泳图谱

图 4 *gltA* 基因过表达重组质粒 pX-gltA 及菌株

GKGD-3 PCR 鉴定图谱

Fig. 4 Map for identification of pX-gltA and GKGD-3

积累量分别降低 60.8% 和 50.0%;其转化率分别提高 8.8% 和 4.5%。

表 5 菌株于 7.5 L 发酵罐条件下的发酵参数

Table 5 Fermentation parameters in 7.5 L fermentor by strains

参数	菌株		
	GKGD-3	GKGD	GKGDpM
最大生物量/(g DCW · L ⁻¹)	12.8 ± 0.3	17.5 ± 0.2	13.2 ± 0.5
α -KG 产量/(g · L ⁻¹)	49.5 ± 1.3	45.1 ± 1.1	36.3 ± 0.8
单位菌体产量/(g · g ⁻¹)	3.9 ± 0.3	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.1
谷氨酸浓度/(g · L ⁻¹)	4.9 ± 0.2	12.5 ± 1.5	9.8 ± 0.6
转化率/%	37.1 ± 0.2	34.1 ± 0.1	35.5 ± 0.1

3 结论

本研究以 α -KG 生产菌 GKGD 为出发菌株,采用增强柠檬酸合成代谢流、阻断乙醛酸循环及谷氨酸合成途径策略通过敲除异柠檬酸裂解酶编码基因 *aceA* 和谷氨酸酶编码基因 *gogat* 并过表达柠檬酸合酶编码基因 *gltA* 使得 α -KG 产量分别于摇瓶条件和 7.5 L 发酵罐条件下提高 35.9% 和 36.4%,使得 L-谷氨酸生成量分别降低 28.8% 和 50%。由此可见,敲除 *aceA* 和 *gogat* 并过表达 *gltA* 可显著提高 α -KG 产量并

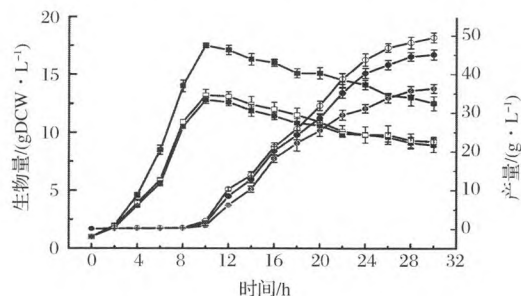


图5 菌株发酵过程曲线

Fig.5 Fermentation process curve of strains
方形和圆形分别代表生物量和 α -KG 产量;黑色实心为 GKGD;灰色实心为 GKGDpM;空心为 GKGD-3

降低 *L*-谷氨酸生成量。

参 考 文 献

- [1] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法 主编. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 92 - 113.
- [2] FINOGENOVA T V, MORGUNOV I G, KAMZOLOVA SV, et al. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya, 2005, 41 (5): 478 - 486.
- [3] COOPERA J L, GINOS J Z, MEISTER A. Synthesis and properties of the α -keto acids[J]. Chemical Reviews, 1983, 83: 321 - 358.
- [4] HUA Q, YANG C, SHIMIZU K. Metabolic flux analysis for efficient pyruvate fermentation using vitamin-auxotrophic yeast of *Torulopsis glabrata*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(2): 206 - 213.
- [5] OTTO C, YOVKOVA V, BARTH G. Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(4): 689 - 695.
- [6] STOTTMEISTER U, AURICH A, Wilde H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005, 32 (11 - 12): 651 - 64.
- [7] BARRETT D G, YOUSAF M N. Poly (triol- α -ketoglutarate) as biodegradable, chemoselective and mechanically tunable elastomers[J]. Macromolecules, 2008, 41: 6 347 - 6 352.
- [8] LOCKWOOD L B, STODOLA F H. Preliminary studies of the production of alpha-ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1946, 164 (1): 81 - 83.
- [9] ASAI T, AIDA K, SUGISAKI Z, YAKEISHI N. On α -ketoglutaric acid fermentation[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1955, 1: 308 - 346.
- [10] TSUGAWA R, NAKASE T, KOBAYASHI T, et al. Fermentation of n-paraffins by yeast. I. Fermentative production of alpha-ketoglutaric acid by *Candida lipolytica*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1969, 33 (2): 158 - 167.
- [11] CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, IL'CHENKO A P, et al. Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53 (2): 152 - 158.
- [12] CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, IL'CHENKO A P, et al. Metabolic characteristics of the mutant *Yarrowia lipolytica* strain 1 producing alpha-ketoglutaric and citric acids from ethanol and the effect of $[NH_4^+]$ and $[O_2]$ on yeast respiration and acidogenesis[J]. Microbiology, 2001, 70(2): 151 - 157.
- [13] CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, IL'CHENKO A P, et al. Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of alpha-ketoglutaric and citric acids: A comparative study of the central metabolism enzymes[J]. Microbiology, 2002, 71(3): 269 - 274.
- [14] CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, IL'CHENKO A P, et al. Biochemical characterization of the yeast *Yarrowia lipolytica* overproducing carboxylic acids from ethanol: Nitrogen metabolism enzymes[J]. Microbiology, 2003, 72(4): 418 - 422.
- [15] Zhou J W, YIN X X, Madzak C, et al. Enhanced α -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 161(3): 257 - 264.
- [16] SCHNEIDER J, NIERMANN K, WENDISCH V F. Production of the amino acids *L*-glutamate, *L*-lysine, *L*-ornithine and *L*-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 154(2 - 3): 191 - 198.
- [17] VERSECK S, KARAU A, WEBER M. Fermentative production of alpha-ketoglutaric acid: USA, 2009053489 [P]. 2009 - 05 - 01.
- [18] LI Y, SUN L, FENG J, et al. Efficient production of α -ketoglutarate in the *gdh* deleted *Corynebacterium glutamicum* by novel double-phase pH and biotin control strategy[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, 39 (6): 967 - 976.
- [19] EGGELING L, BOTT M. Handbook of *Corynebacterium*

- glutamicum*[M]. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005, 439–457.
- [20] GRANT S G, JESSEE J, BLOOM F R, et al. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(12): 4 645–4 649.
- [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] LIEBLW, BAYERL A, SCHEIN B, et al. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 65(3): 299–303.

Effect of *aceA* and *gogat* knockout combined *gltA* overexpression in GKGD on α -ketoglutarate production

XUE Ning¹, LI Zhi-xiang¹, ZHAN Jun-jie¹, Zhao Lei¹, LIANG Yun-long¹, FENG Jia¹, LIU Tao¹, XU Qing-yang^{1, 2, 3}, ZHANG Cheng-lin^{1, 2, 3}, CHEN Ning^{1, 2, 3*}

1 (Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

2 (National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin 300457, China)

3 (Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT α -Ketoglutarate (α -KG) plays an important role in life activities and has been widely applied in food and medicine. Isocitrate lyase encoding gene *aceA* was knocked out to improve isocitrate supply and obtain GKGD-1, by which the α -KG production and yield was increased by 14.72% and 9.76%. In order, glutamate synthase encoding gene *gogat* was knocked out to reduce *L*-glutamate accumulation and thus obtain GKGD-2, by which the α -KG production and yield was increased by 7.39% and 5.43% and *L*-glutamate was decreased by 52.87%. Citrate synthase encoding gene *gltA* was overexpressed to further increase precursor supply and thus obtain GKGD-3, by which α -KG production was increased by 35.9%. Fermentation assay was performed in 7.5-L fermentor with GKGD-3, α -KG production achieve 49.5 g/L (increased by 36.4%) and *L*-glutamate accumulation was decreased by 50%. In summary, *aceA* and *gogat* knockout combined with *gltA* overexpression in GKGD remarkably improved α -ketoglutarate production.

Key words α -ketoglutarate; *L*-glutamate; glutamate synthase; Isocitrate lyase; citrate synthase