

# 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸

赵阔<sup>1,2</sup>, 程金字<sup>1,2</sup>, 郭亮<sup>1,2</sup>, 高聪<sup>1,2</sup>, 宋伟<sup>3</sup>, 吴静<sup>3</sup>, 刘佳<sup>1,2</sup>, 柳亚迪<sup>1,2</sup>,  
刘立明<sup>1,2</sup>, 陈修来<sup>1,2\*</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

3 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122

赵阔, 程金字, 郭亮, 高聪, 宋伟, 吴静, 刘佳, 柳亚迪, 刘立明, 陈修来. 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3253-3272.

ZHAO Kuo, CHENG Jinyu, GUO Liang, GAO Cong, SONG Wei, WU Jing, LIU Jia, LIU Yadi, LIU Liming, CHEN Xiulai. Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3253-3272.

**摘 要:** L-缬氨酸作为一种支链氨基酸, 广泛应用于医药和饲料等领域。本研究借助多种代谢工程策略相结合的方法, 构建了生产 L-缬氨酸的微生物细胞工厂, 实现了 L-缬氨酸的高效生产。首先, 通过增强糖酵解途径、减弱副产物代谢途径相结合的方式, 强化了 L-缬氨酸合成前体丙酮酸的供给; 其次, 针对 L-缬氨酸合成路径关键酶——乙酰羟酸合酶进行定点突变, 提高了菌株的抗反馈抑制能力, 并利用启动子工程策略, 优化了路径关键酶的基因表达水平; 最后, 利用辅因子工程策略, 改变了乙酰羟酸还原异构酶和支链氨基酸转氨酶的辅因子偏好性, 由偏好 NADPH 转变为偏好 NADH, 从而提高了 L-缬氨酸的合成能力。在 5 L 发酵罐中, 最优谷氨酸棒杆菌工程菌株 *Corynebacterium glutamicum* K020 的 L-缬氨酸产量、得率和生产强度分别达到了 110 g/L、0.51 g/g 和 2.29 g/(L·h)。

**关键词:** 谷氨酸棒杆菌; L-缬氨酸; 代谢工程; 路径优化

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(22)1012); 国家自然科学基金(22122806, 22208124, 32000037); 江苏省自然科学基金(BK20211529, BK20200614)

This work was supported by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(22)1012), the National Natural Science Foundation of China (22122806, 22208124, 32000037), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20211529, BK20200614).

\*Corresponding author. E-mail: xlchen@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-12-13; Accepted: 2023-02-17; Published online: 2023-03-13

# Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*

ZHAO Kuo<sup>1,2</sup>, CHENG Jinyu<sup>1,2</sup>, GUO Liang<sup>1,2</sup>, GAO Cong<sup>1,2</sup>, SONG Wei<sup>3</sup>, WU Jing<sup>3</sup>,  
LIU Jia<sup>1,2</sup>, LIU Yadi<sup>1,2</sup>, LIU Liming<sup>1,2</sup>, CHEN Xiulai<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** As a branched chain amino acid, L-valine is widely used in the medicine and feed sectors. In this study, a microbial cell factory for efficient production of L-valine was constructed by combining various metabolic engineering strategies. First, precursor supply for L-valine biosynthesis was enhanced by strengthening the glycolysis pathway and weakening the metabolic pathway of by-products. Subsequently, the key enzyme in the L-valine synthesis pathway, acetylhydroxylase synthase, was engineered by site-directed mutation to relieve the feedback inhibition of the engineered strain. Moreover, promoter engineering was used to optimize the gene expression level of key enzymes in L-valine biosynthetic pathway. Furthermore, cofactor engineering was adopted to change the cofactor preference of acetohydroxyacid isomeroreductase and branched-chain amino acid aminotransferase from NADPH to NADH. The engineered strain *C. glutamicum* K020 showed a significant increase in L-valine titer, yield and productivity in 5 L fed-batch bioreactor, up to 110 g/L, 0.51 g/g and 2.29 g/(L·h), respectively.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum*; L-valine; metabolic engineering; pathway optimization

L-缬氨酸作为必需氨基酸和支链氨基酸,具有多种生理功能,广泛应用于食品<sup>[1-2]</sup>、医药<sup>[3-4]</sup>和饲料<sup>[5-6]</sup>等领域。目前,L-缬氨酸的生产方法主要有3种:直接提取法、化学合成法和微生物发酵法<sup>[7-8]</sup>。直接提取法和化学合成法具有生产成本低、反应条件严苛等问题<sup>[9]</sup>,而微生物发酵法因具有原料成本低且可再生、反应条件温和等优点,受到越来越多的关注<sup>[8,10]</sup>。虽然经过传统育种方法可以获得生产L-缬氨酸的菌株,但是这种方法不仅耗时耗力,而且菌株遗传性状不稳定、容易发生回复突变<sup>[11]</sup>。随着不同微生物基因组测序,以及代谢工程改造技术的发展,科研人员逐渐将目光转向代谢工程改造微生物生产L-缬氨酸<sup>[12-16]</sup>。

目前,用来生产L-缬氨酸的底盘微生物主

要有2种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[17-18]</sup>。*E. coli*作为模式菌株,具有遗传背景清晰、分子操作简单等优点,已经被广泛用于生产L-色氨酸、L-苏氨酸等多种氨基酸<sup>[19-21]</sup>。近年来,借助代谢工程策略改造*E. coli*,获得了一些生产L-缬氨酸的工程菌株<sup>[22-25]</sup>。代谢工程改造*E. coli*生产L-缬氨酸的策略主要有:增强前体供应<sup>[22]</sup>、强化合成路径<sup>[23,26]</sup>、减少副产物积累<sup>[22]</sup>、优化辅因子供给<sup>[18,24]</sup>和改造转运系统<sup>[22,25]</sup>等。例如:以常压室温等离子体(atmospheric pressure room temperature plasma, ARTP)诱变获得的*E. coli* VAL03作为底盘菌株,通过替换*ilvCDE*的启动子来强化合成路径、过表达*brnFE*来加强产物

转运效率和引入异源 Entner-Doudoroff 途径供应辅因子等多模块工程技术, 实现了高效生产 L-缬氨酸, 最终产量达到 92 g/L, 得率为 0.34 g/g<sup>[18]</sup>。虽然通过代谢工程改造 *E. coli* 可以实现 L-缬氨酸的生产, 但是 L-缬氨酸的生产水平仍然不高, 而且 *E. coli* 会产生内毒素<sup>[22]</sup>。*C. glutamicum* 不仅是公认的安全菌株(generally recognised as safe, GRAS), 而且也是最传统的氨基酸生产菌株<sup>[27-29]</sup>。另外, 在 *E. coli* 中应用的代谢工程策略, 也可以借鉴用于改造 *C. glutamicum*<sup>[17,30-35]</sup>。例如, 以 *C. glutamicum* ATCC 13869 为出发菌株, 首先过表达 *lrp* 和 *brnFE* 提高了 L-缬氨酸转运效率、其次敲除了 *aceE*、*alaT* 和 *ilvA* 减少了副产物积累、再次过表达 *ilvBNC* 强化了合成路径, 最终 L-缬氨酸产量达到 51.2 g/L, 得率为 0.32 g/g<sup>[17]</sup>; 以 *C. glutamicum* R 为出发菌株, 通过过表达 *ilvBNCE* 关键基因强化合成路径、解除 *IlvBN* 的

反馈抑制等策略, 最终采用两步发酵法实现了 L-缬氨酸高效生产, 产量达到 227 g/L<sup>[36]</sup>。虽然通过代谢工程改造 *C. glutamicum* 有效提升了 L-缬氨酸的生产水平, 但是发酵工艺相对比较复杂, 不能很好地满足工业化生产需求(表 1)。

本研究以 *C. glutamicum* FMME446 为出发菌株, 借助多种代谢工程策略相结合的方法, 实现了 L-缬氨酸的高效生产(图 1)。首先, 通过改造糖酵解途径, 提高了 L-缬氨酸合成前体丙酮酸的积累量; 其次, 针对 L-缬氨酸合成路径关键酶进行定点突变, 提高了菌株的抗反馈抑制能力, 并利用启动子工程策略, 优化了路径关键酶的表达水平; 最后, 利用辅因子工程策略, 改变了合成路径关键酶的辅因子偏好性, 提高了 L-缬氨酸的合成能力。在 5 L 发酵罐中, 最优工程菌株 *C. glutamicum* K020 的 L-缬氨酸产量、得率和生产强度分别达到了 110 g/L、0.51 g/g 和 2.29 g/(L·h)。

表 1 代谢工程改造微生物生产 L-缬氨酸

Table 1 Metabolic engineering of microorganisms for L-valine production

Microorganisms	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	Cultivation	References
<i>C. glutamicum</i> <i>ilvNM13</i>	15.2	NA	0.32	Shake flask; Supplement L-isoleucine and D-pantothenate	[37]
<i>C. glutamicum</i> $\Delta aceE$	24.5	0.40	1.17	Fed-batch; Supplement potassium acetate	[38]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	31.2	0.17	0.43	Fed-batch	[30]
<i>MPilvA</i> $\Delta avtA$					
<i>C. glutamicum</i> $\Delta aceE\Delta pqo\Delta pgi$	48.0	0.49	0.53	Fed-batch; Supplement acetate	[39]
<i>C. glutamicum</i> WCC003	51.2	0.32	0.53	Fed-batch; Supplement L-isoleucine, potassium acetate, and sodium pyruvate	[17]
<i>C. glutamicum</i> <i>aceE</i> A16 $\Delta pqo\Delta ppc$	86.5	0.23	1.57	Fed-batch; Supplement acetate	[35]
<i>C. glutamicum</i> BN <sup>GE</sup> C <sup>TM</sup> DLD/ $\Delta$ LDH	227.0	0.35	4.73	Two-steps	[36]
<i>C. glutamicum</i> K020	110.0	0.51	2.29	Fed-batch; One-step	This study
<i>E. coli</i> VAL38	92.0	0.34	1.92	Fed-batch	[18]
<i>E. coli</i> VHY18	84.0	0.41	2.33	Fed-batch	[25]
<i>E. coli</i> WLA	60.7	0.22	2.06	Fed-batch	[26]

NA: Not available.

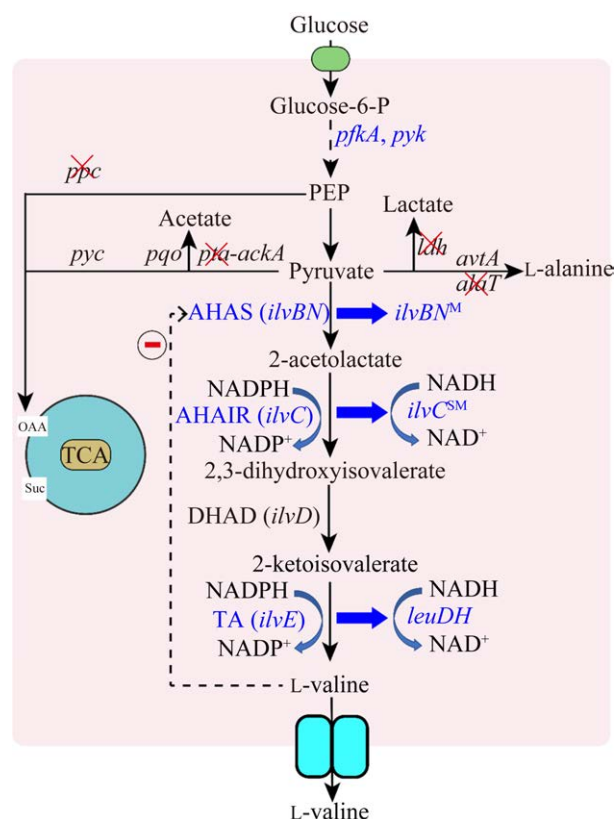


图1 代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产L-缬氨酸

Figure 1 Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-valine production. *pfkA* encoding 6-phosphofructokinase, *pyk* encoding pyruvate kinase, *ldh* encoding lactate dehydrogenase, *pta* encoding phosphotransacetylase, *pzo* encoding pyruvate:quinone oxidoreductase, *ackA* encoding acetate kinase, *alaT* encoding alanine transaminase, *avtA* encoding valine-pyruvate transaminase, *ppc* encoding phosphoenolpyruvate carboxylase, *pyc* encoding pyruvate carboxylase, *ilvBN* encoding acetohydroxyacid synthase (AHAS), *ilvC* encoding acetohydroxyacid isomerase (AHAIIR), *ilvD* encoding dihydroxyacid dehydratase (DHAD), *ilvE* encoding transaminase B (TA); TCA: Tricarboxylic acid cycle; PEP: Phosphoenolpyruvate; OAA: Oxaloacetate; Suc: Succinate.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究使用的大肠杆菌(*Escherichia coli*)

JM109 和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) FMME446 (实验室保藏的, 以 *C. glutamicum* R JCM 18229 为出发菌株, 经诱变筛选获得的遗传性状稳定的能够生产 L-缬氨酸的菌株, *C. glutamicum* K000)分别用于构建表达载体和生产菌株, 其中所使用的重组质粒见表 2, 引物见国家微生物科学数据中心(登录号: NMDCX0000178), 基因工程菌见表 3, 工程菌株构建流程见图 2。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪、全自动凝胶成像系统、电转仪、核酸电泳仪, Bio-Rad 公司产品; 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂产品; 紫外可见分光光度计, 岛津公司产品; SBA 生物传感器, 山东科学院生物研究所产品; 精密 pH 计, METTLER 公司产品; UltiMate 3000 液相色谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司产品; 高速离心机, Eppendorf 公司产品; 2.4 L 迪必尔平行生物反应器, 迪必尔生物工程(上海)有限公司; 5 L 全自动搅拌式发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司。

限制性内切酶、PrimeSTAR 高保真酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、T4 PNK、*Dpn* I、DNA marker 等, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 一步同源重组酶, 购自南京巨匠生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒、硫酸卡那霉素, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 购自天根生化科技(北京)有限公司; L-缬氨酸、L-丙氨酸, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; PCR 引物由亦欣生物科技(上海)有限公司合成; 其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基: 10 g/L NaCl, 5 g/L 酵母提取

物, 10 g/L 蛋白胨。

LBGB 培养基: 10 g/L NaCl, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 葡萄糖, 18.5 g/L 脑心浸液。

LBHIS 培养基: 5 g/L NaCl, 2.5 g/L 酵母提取物, 5 g/L 蛋白胨, 18.5 g/L 脑心浸液, 91 g/L D-山梨醇。

Epo 培养基: 10 g/L NaCl, 5 g/L 酵母提取

物, 10 g/L 蛋白胨, 1 g/L 吐温 80, 25 g/L 甘氨酸, 0.4 g/L 异烟肼。

斜面培养基: 2.5 g/L 尿素, 5 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.8 g/L 酵母浸出粉, 5 g/L 蛋白胨, 6 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mg/L 生物素, 0.2 mg/L 维生素 B1, 50 mg/L 卡那霉素, 40 g/L 葡萄糖, 15 g/L 琼脂粉。

表 2 本研究所使用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Descriptions	Sources
pK000	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector, Kan <sup>R</sup>	This lab
pJYS3-ΔcrtYf	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector, $P_{lacM}$ -FnCpf1, $P_{J23119}$ -crRNA targeting crtYf, Kan <sup>R</sup>	Addgene
pJYS3-JX	Modification in pJYS3-ΔcrtYf, Kan <sup>R</sup>	This study
pJYS3-JX- <i>pfkA</i>	$P_{tac}$ - <i>pfkA</i>	This study
pJYS3-JX- <i>pyk</i>	$P_{tac}$ - <i>pyk</i>	This study
pJYS3-JX-Δ <i>ldh</i>	Deleting <i>ldh</i>	This study
pJYS3-JX-Δ <i>pta</i>	Deleting <i>pta</i>	This study
pJYS3-JX-Δ <i>alaT</i>	Deleting <i>alaT</i>	This study
pJYS3-JX-Δ <i>ppc</i>	Deleting <i>ppc</i>	This study
pJYS3-JX-Δ <i>pyc</i>	Deleting <i>pyc</i>	This study
pJYS3-JX-Δ <i>ilvE</i>	Deleting <i>ilvE</i> and inserting $P_{tac}$ - <i>leuDH</i>	This study
pK001	$P_{ilvBN}$ - <i>ilvBN</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK002	$P_{ilvBN}$ -eco- <i>ilvBN</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK003	$P_{ilvBN}$ -bsu- <i>alsS</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK004	$P_{ilvBN}$ -cgl- <i>ilvBN</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK005	$P_{ilvBN}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK006	$P_{ilvBN}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> C, Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-1	$P_{pgk}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-2	$P_{sod}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-3	$P_{eflu}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-4	$P_{ilvBN}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-5	$P_{ctaD}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-6	$P_{gapA}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-7	$P_{pgm}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK007-8	$P_{tpx}$ - <i>mKate</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
pK008	$P_{eflu}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> C, Kan <sup>R</sup>	This study
pK009	$P_{gapA}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> C, Kan <sup>R</sup>	This study
pK010	$P_{sod}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> C, Kan <sup>R</sup>	This study
pK011	$P_{gapA}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> C <sup>SM</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study

表3 本研究所使用的菌种

Table 3 Strains used in this study

Strains	Descriptions	Sources
<i>E. coli</i> JM109	General cloning host	This lab
<i>C. glutamicum</i> K000	<i>C. glutamicum</i> FMME446	This lab
<i>C. glutamicum</i> K001	$P_{tac}$ - <i>pfkA</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K002	$P_{tac}$ - <i>pyk</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K003	$P_{tac}$ - <i>pfkA</i> - $P_{tac}$ - <i>pyk</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K004	K003 $\Delta$ <i>ldh</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K005	K003 $\Delta$ <i>ldh</i> $\Delta$ <i>pta</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K006	K003 $\Delta$ <i>ldh</i> $\Delta$ <i>pta</i> $\Delta$ <i>alaT</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K007	K006 $\Delta$ <i>ppc</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K008	K006 $\Delta$ <i>pyc</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K009	K006 $\Delta$ <i>ppc</i> $\Delta$ <i>pyc</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K010	K007- <i>ilvBN</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K011	K007- <i>eco-ilvBN</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K012	K007- <i>bsu-alsS</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K013	K007- <i>cgl-ilvBN</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K014	<i>ilvBN</i> <sup>M</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015	<i>ilvBN</i> <sup>M</sup> <i>C</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-1	$P_{pgk}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-2	$P_{sod}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-3	$P_{eftu}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-4	$P_{ilvBN}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-5	$P_{ctaD}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-6	$P_{gapA}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-7	$P_{pgm}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K015-8	$P_{tpx}$ - <i>mKate</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> K016	$P_{sod}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> <i>C</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K017	$P_{gapA}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> <i>C</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K018	$P_{eftu}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> <i>C</i> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K019	$P_{gapA}$ - <i>ilvBN</i> <sup>M</sup> <i>C</i> <sup>SM</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>C. glutamicum</i> K020	K019- <i>ilvE</i> :: $P_{tac}$ - <i>leuDH</i> , Kan <sup>R</sup>	This study

一级种子培养基：2.5 g/L 尿素，5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，1.8 g/L 酵母浸出粉，5 g/L 蛋白胨，6 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，4 mg/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O，0.2 mg/L 生物素，0.2 mg/L 维生素 B1，50 mg/L 卡那霉素，40 g/L 葡萄糖。

二级种子培养基：8 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，0.8 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.8 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，1.8 g/L 安琪 FM902 酵母粉，10 mg/L

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，4 mg/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O，0.02 mg/L 生物素，2 mg/L 维生素 B1，50 mg/L 卡那霉素，40 g/L 葡萄糖。

发酵培养基：8 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，2.5 g/L 安琪 FM902 酵母粉，10 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，4 mg/L MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O，0.02 mg/L 生物素，2 mg/L 维生素 B<sub>1</sub>，30 mg/L 维生素 B<sub>3</sub>，50 mg/L 卡那霉素，90 g/L 葡萄糖，消泡剂 1 mL/L。

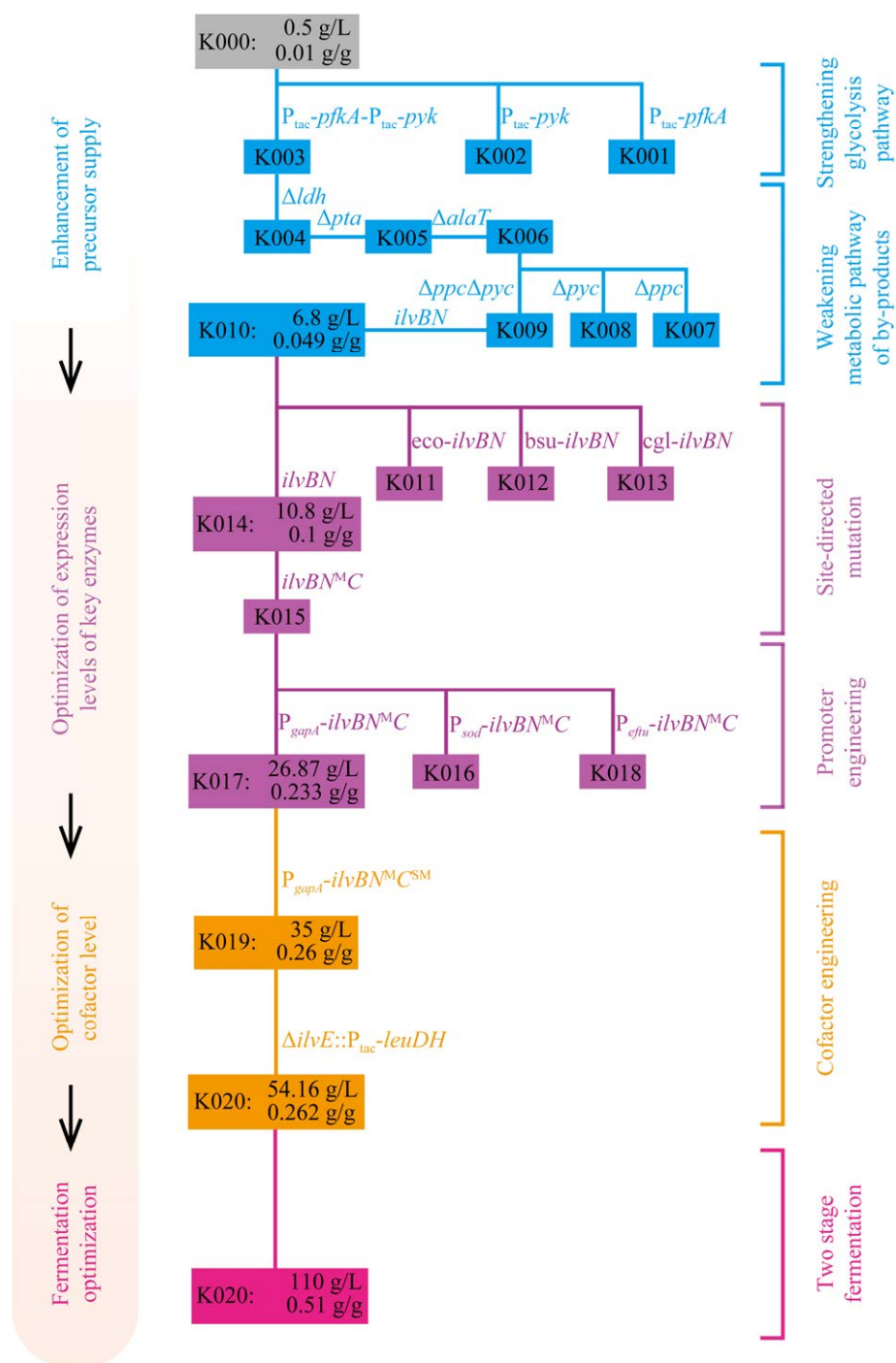


图2 L-缬氨酸工程菌株构建流程

Figure 2 Process for constructing L-valine-producing strains.

## 1.2 方法

### 1.2.1 CRISPR-Cpf1 技术的基因编辑

*C. glutamicum* 的基因敲除和基因敲入可以由 CRISPR-Cpf1 基因编辑技术完成<sup>[14]</sup>, 并在此

基础上进行相应改进。以 *alaT* 的基因敲除为例说明本研究的基因敲除过程: (1) 首先利用引物 P1 和 P2 改造初始敲除质粒 pJYS3- $\Delta crtYf$ , 除去不发挥作用的同源臂区, 减小质粒大小,

命名为 pJYS3-JX; (2) 以 pJYS3-JX 质粒为模板、P3 和 P4 为引物, 将质粒上的 crRNA (5'-TTCCTGCCCTATGGTTGCCTGATCTACAA CAGTAGAAATTC-3') 更换成 *alaT* 的 crRNA (5'-AACATGGCATGGACGAACTATCTACAA CAGTAGAAATTC-3'), 并利用引物 P5 和 P6 线性化上述载体。以 *C. glutamicum* 基因组为模板, P7 和 P8、P9 和 P10 为引物, 扩增 *alaT* 上、下游同源臂, 3 片段同源重组构建敲除质粒 pJYS3-JX- $\Delta$ *alaT*; (3) 将 pJYS3-JX- $\Delta$ *alaT* 电转入 *C. glutamicum* 中, 划线于 LBGB 平板上进行静态敲除过程, 引物 P11 和 P12 验证并测序正确代表成功敲除 *alaT*; (4) 敲除质粒带有温敏型复制子, 34 °C 传代培养消除敲除质粒, 得到敲除 *alaT* 的 *C. glutamicum*。引物 P13-P22 用于更换 *pfkA* 启动子, P23-P32 用于更换 *pyk* 启动子, P33-P42 用于敲除 *ldh*, P43-P52 用于敲除 *pta*, P53-P62 用于敲除 *ppc*, P63-P72 用于敲除 *pyc*, P111-P122 用于敲除 *ilvE* 并插入 *P<sub>lac</sub>-leuDH*。

### 1.2.2 重组质粒和重组菌株的构建

所有质粒的构建均通过标准分子克隆操作和吉布森组装法, 其中一步同源重组法是根据目的片段与表达载体之间具有相同序列连接的方法。P73 和 P74 扩增本源 *ilvBN* 并连接到线性化 pK000 片段上得到质粒 pK001, P75 和 P76 扩增 *E. coli* MG1655 来源的 *ilvBN* 并连接到线性化 pK000 片段上得到质粒 pK002, P77 和 P78 扩增枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 163 来源的 *alsS* 并连接到线性化 pK000 片段上得到质粒 pK003, P79 和 P80 扩增 *C. glutamicum* ATCC 13032 来源的 *ilvBN* 并连接到线性化 pK000 片段上得到质粒 pK004, P81 和 P82 用于 *IlvN* 的定点突变得到质粒 pK005, P83 和 P84 用于串联 *ilvC* 得到质粒 pK006, P85-P86、P87-P88、P89-P90、P91-P92、P93-P94、P95-P96、P97-P98 和 P99-P100 分别用来扩增启动子 *P<sub>pgk</sub>*、

*P<sub>sod</sub>*、*P<sub>eftu</sub>*、*P<sub>ilvBN</sub>*、*P<sub>ctaD</sub>*、*P<sub>gapA</sub>*、*P<sub>pgm</sub>* 和 *P<sub>tpx</sub>*, 分别得到荧光蛋白表达质粒 pK007-1、pK007-2、pK007-3、pK007-4、pK007-5、pK007-6、pK007-7 和 pK007-8, P101 和 P84 用于构建质粒 pK008, P103 和 P84 用于构建质粒 pK009, P105 和 P84 用于构建质粒 pK010, P107-P110 用于 *IlvC* 的定点突变得到质粒 pK011。*C. glutamicum* 的转化采用电转化法<sup>[13]</sup>。

### 1.2.3 发酵条件

斜面培养: 把甘油管中的菌体划线活化于斜面培养基, 30 °C 恒温培养 24 h。

一级种子培养: 用无菌水洗下斜面培养基上的菌苔, 按 1% 接种量接种于装有 100 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中, 120 r/min、30 °C 恒温培养 6–8 h, *OD*<sub>610</sub> 在 6.0–10.0 之间。

二级种子培养: 按照 2% 的接种量将一级摇瓶接种于装有 100 mL 二级种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 120 r/min、30 °C 恒温培养 6–8 h, *OD*<sub>610</sub> 在 8.0–12.0 之间。

摇瓶发酵: 按照 10% 的接种量将二级摇瓶接种于装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 120 r/min、30 °C 恒温发酵, 需要在发酵培养基中添加 20 g/L CaCO<sub>3</sub> 以维持 pH。

2.4 L 迪必尔平行反应器发酵: 发酵罐初始装液量为 1.2 L, 将二级种子液按总体积 10% (体积比) 的接种量接种至发酵培养基中, 温度 30 °C, 初始通气量 1 vvm, 发酵过程中流加氨水控制 pH (7.3±0.2), 发酵前期控制溶解氧不低于 20%。进行微溶氧发酵时, 通气量降低到 0.2 vvm, 转速降低到 100–200 r/min。

5 L 保兴发酵罐: 发酵罐初始装液量为 2.5 L, 将二级种子液按总体积 10% (体积分数) 的接种量接种至发酵培养基中, 温度 30 °C, 初始通气量 1 vvm, 发酵过程中流加氨水控制 pH (7.3±0.2), 发酵前期控制溶解氧不低于



20%。进行微溶氧发酵时,通气量降低到 0.2 vvm,转速降低到 100–200 r/min。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 细胞浓度测定

取适量发酵液稀释,使用紫外分光光度计在波长 610 nm 条件下测定的  $OD_{610}$  表示。

#### 1.3.2 葡萄糖浓度测定

利用 SBA-40E 生物传感分析仪测定。

#### 1.3.3 酶活力和辅因子测定

乙酰羟酸还原异构酶的酶活测定方法参考文献[36],并对酶活定义进行了适当修改,将其中的 NADPH 更改为等摩尔的 NADPH 或 NADH。辅因子 NADH 和  $NAD^+$  的测定采用 NADH 检测试剂盒(WST-8 法)进行测定(上海碧云天生物科技有限公司)。

#### 1.3.4 氨基酸检测方法

取发酵液 12 000 r/min 离心 10 min,取上清稀释一定倍数,高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定 L-缬氨酸和 L-丙氨酸的含量。HPLC 检测条件:色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m),采用柱前在线衍生化法测定氨基酸含量;衍生剂为邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA),流动相 A 为 0.01 mol/L  $KH_2PO_4$ ,流动相 B 为乙腈:甲醇:流动相 A=5:3:1, pH 均调至 5.3,流速为 1.0 mL/min,梯度洗脱,柱温为 35  $^{\circ}C$ ,检测器为紫外检测器,波长为 254 nm。若产品达到溶解度上限而析出,则进行加热复溶或者稀释操作。

#### 1.3.5 有机酸检测方法

取发酵液 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液稀释一定倍数,高效液相色谱(HPLC)测定丙酮酸、琥珀酸、乳酸和乙酸的含量。HPLC 检测条件:色谱柱为 Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm),流动相为 5 mmol/L 稀硫酸,柱温

52  $^{\circ}C$ ,检测器为紫外检测器,波长为 210 nm,进样量 10  $\mu$ L,流速 0.6 mL/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 L-缬氨酸合成路径的构建

为了加强 L-缬氨酸合成前体——丙酮酸的积累,以 *C. glutamicum* FMME446 为出发菌株(*C. glutamicum* K000),进行糖酵解途径关键酶的过表达。通过在 *C. glutamicum* K000 中过表达 6-磷酸果糖激酶(*pfkA*)和丙酮酸激酶(*pyk*),获得工程菌株 *C. glutamicum* K001 ( $P_{tac}$ -*pfkA*)、*C. glutamicum* K002 ( $P_{tac}$ -*pyk*)和 *C. glutamicum* K003 ( $P_{tac}$ -*pfkA*- $P_{tac}$ -*pyk*),其中 *C. glutamicum* K003 的丙酮酸积累量最高,达到了 5.6 g/L,比对照菌株 *C. glutamicum* K000 提高了 86.67% (图 3B)。上述结果表明,过表达糖酵解途径关键酶可以有效增加丙酮酸的积累量。另外,在丙酮酸积累量增加的同时,还发现了一些代谢副产物的积累,主要为乳酸、乙酸、L-丙氨酸和琥珀酸,积累量分别为 5.5、6.2、9.3 和 14.2 g/L。因此,需要敲除副产物合成的相关基因,进一步增加丙酮酸的积累量。

为了进一步增加丙酮酸积累量,利用 CRISPR-Cpf1 技术敲除副产物相关合成基因,从而减少了副产物的积累。首先,对丙酮酸下游直接代谢副产物,如乳酸、乙酸和 L-丙氨酸,涉及的相关基因,如乳酸脱氢酶(*ldh*)、磷酸转乙酰基酶(*pta*)和丙氨酸合成酶(*alaT*),进行叠加基因敲除,获得工程菌株 *C. glutamicum* K004 ( $K003\Delta ldh$ )、*C. glutamicum* K005 ( $K003\Delta ldh\Delta pta$ )和 *C. glutamicum* K006 ( $K003\Delta ldh\Delta pta\Delta alaT$ )。随着 *ldh*、*pta* 和 *alaT* 基因的依次敲除,丙酮酸产量分别增加到了 6.7、7.9 和 10.3 g/L,而乳酸、乙酸和 L-丙氨酸积累量分别降低了 74.55%、46.77%和 65.59% (图

3C)。其次,对丙酮酸上游间接代谢副产物,如琥珀酸,涉及的相关基因,如磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*ppc*)和丙酮酸羧化酶(*pyc*),进行组合敲除,获得工程菌株 *C. glutamicum* K007

(K006 $\Delta$ *ppc*)、*C. glutamicum* K008 (K006 $\Delta$ *pyc*)和 *C. glutamicum* K009 (K006 $\Delta$ *ppc* $\Delta$ *pyc*), 丙酮酸产量分别提高到了 11.3、11.6 和 9.4 g/L, 琥珀酸积累量分别下降了 66.20%、43.66%和 71.83%

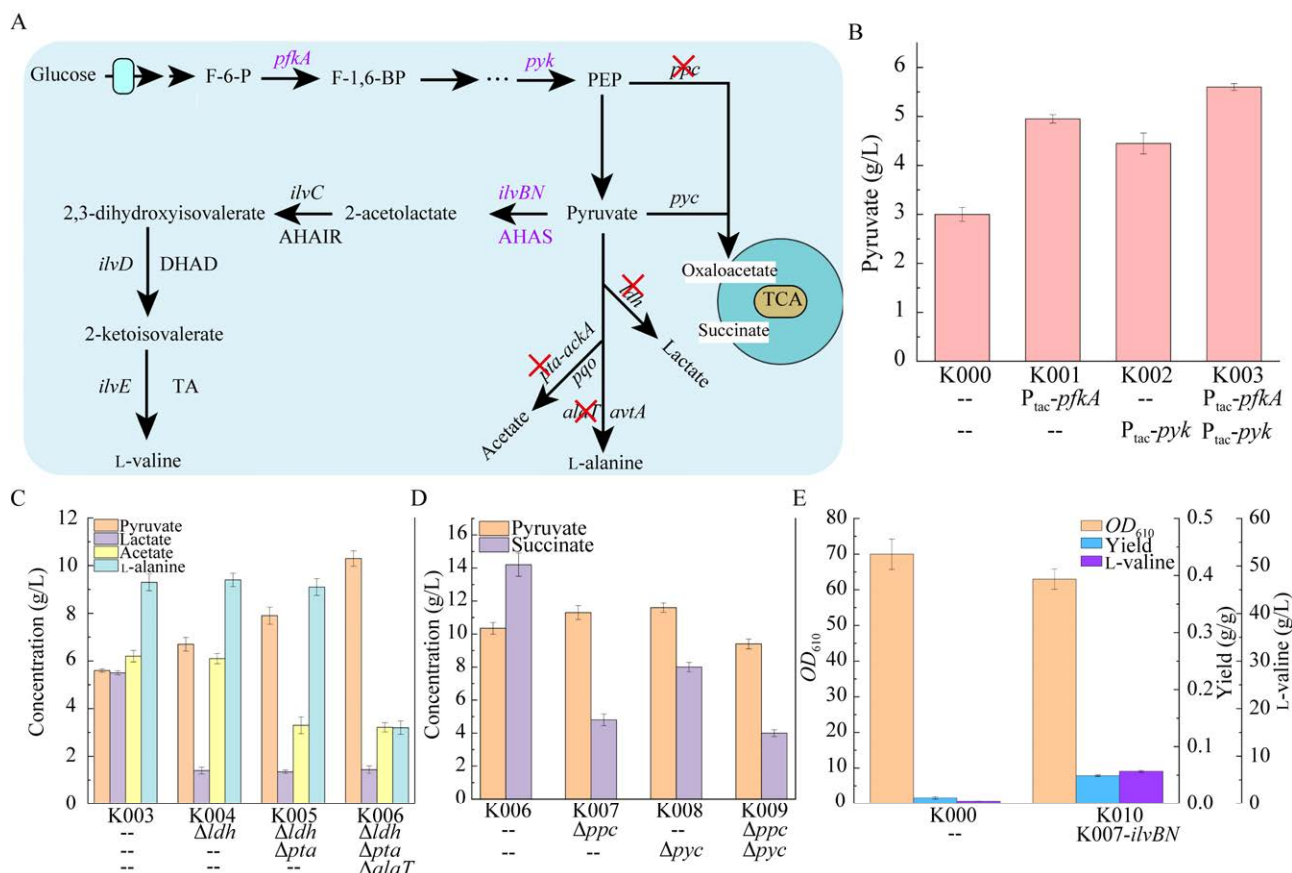


图 3 丙酮酸前体的积累和 L-缬氨酸合成路径的构建 A: 前体积累和路径构建的改造靶点. B: 过表达糖酵解途径关键酶对丙酮酸积累的影响. C: 敲除 *ldh*、*pta* 和 *alaT* 基因对乳酸、乙酸、L-丙氨酸和丙酮酸积累的影响. D: 敲除 *ppc* 和 *pyc* 对琥珀酸和丙酮酸积累的影响. E: 过表达本源 *ilvBN* 基因对 L-缬氨酸合成的影响

Figure 3 Accumulation of precursor pyruvate and construction of L-valine synthesis pathway. A: Engineering targets for precursor accumulation and pathway construction. B: Effect of overexpression of glycolytic key enzymes on pyruvate accumulation. C: Effect of knocking out *ldh*, *pta* and *alaT* genes on the accumulation of lactate, acetate, L-alanine and pyruvate. D: Effect of knocking out *ppc* and *pyc* genes on the accumulation of succinate and pyruvate. E: Effects of overexpression of the original *ilvBN* gene on L-valine production. *pfkA* encodes 6-phosphofructokinase, *pyk* encodes pyruvate kinase, *ldh* encodes lactate dehydrogenase, *pta* encodes phosphotransacetylase, *ppo* encodes pyruvate:quinone oxidoreductase, *ackA* encodes acetate kinase, *alaT* encodes alanine transaminase, *avtA* encodes valine-pyruvate transaminase, *ppc* encodes phosphoenolpyruvate carboxylase, *pyc* encodes pyruvate carboxylase, *ilvBN* encodes acetohydroxyacid synthase (AHAS), *ilvC* encodes acetohydroxyacid isomeroreductase (AHAIR), *ilvD* encodes dihydroxyacid dehydratase (DHAD), *ilvE* encodes transaminase B (TA). F-6-P: Fructose-6-phosphate; F-1,6-BP: Fructose-1,6-bisphosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; TCA: Tricarboxylic acid cycle.

(图 3D)。上述结果表明,通过敲除副产物相关合成基因,可以有效减少副产物积累,提高丙酮酸的产量。综合考虑上述菌株的丙酮酸和琥珀酸积累量,选择工程菌株 *C. glutamicum* K007 作为后续研究菌株。

由于 *C. glutamicum* 本源的二羧基酸脱水酶(DHAD, *ilvD*)和支链氨基酸转氨酶(TA, *ilvE*)表达量较高,并且乙酰羟酸合酶(AHAS, *ilvBN*)是 L-缬氨酸合成路径中的限速酶<sup>[12,17,40]</sup>。因此,通过过表达限速酶 AHAS,可以将丙酮酸节点的代谢流导向 L-缬氨酸合成<sup>[17]</sup>。基于此,在 *C. glutamicum* K007 中过表达本源 *ilvBN* 基因,获得工程菌株 *C. glutamicum* K010 (K007-*ilvBN*), L-缬氨酸产量和得率分别达到了 6.8 g/L 和 0.049 g/g, 分别比菌株 *C. glutamicum* K000 提高了 1 260%和 390%,但是菌株的最大生长  $OD_{610}$  比菌株 *C. glutamicum* K000 降低了 10% (图 3E)。上述结果表明,菌株 *C. glutamicum* K010 可以用于生产 L-缬氨酸,但是 L-缬氨酸的生产水平仍然较低,需要进行代谢工程改造进一步提高 L-缬氨酸产量。

## 2.2 L-缬氨酸合成路径关键酶的表达水平优化

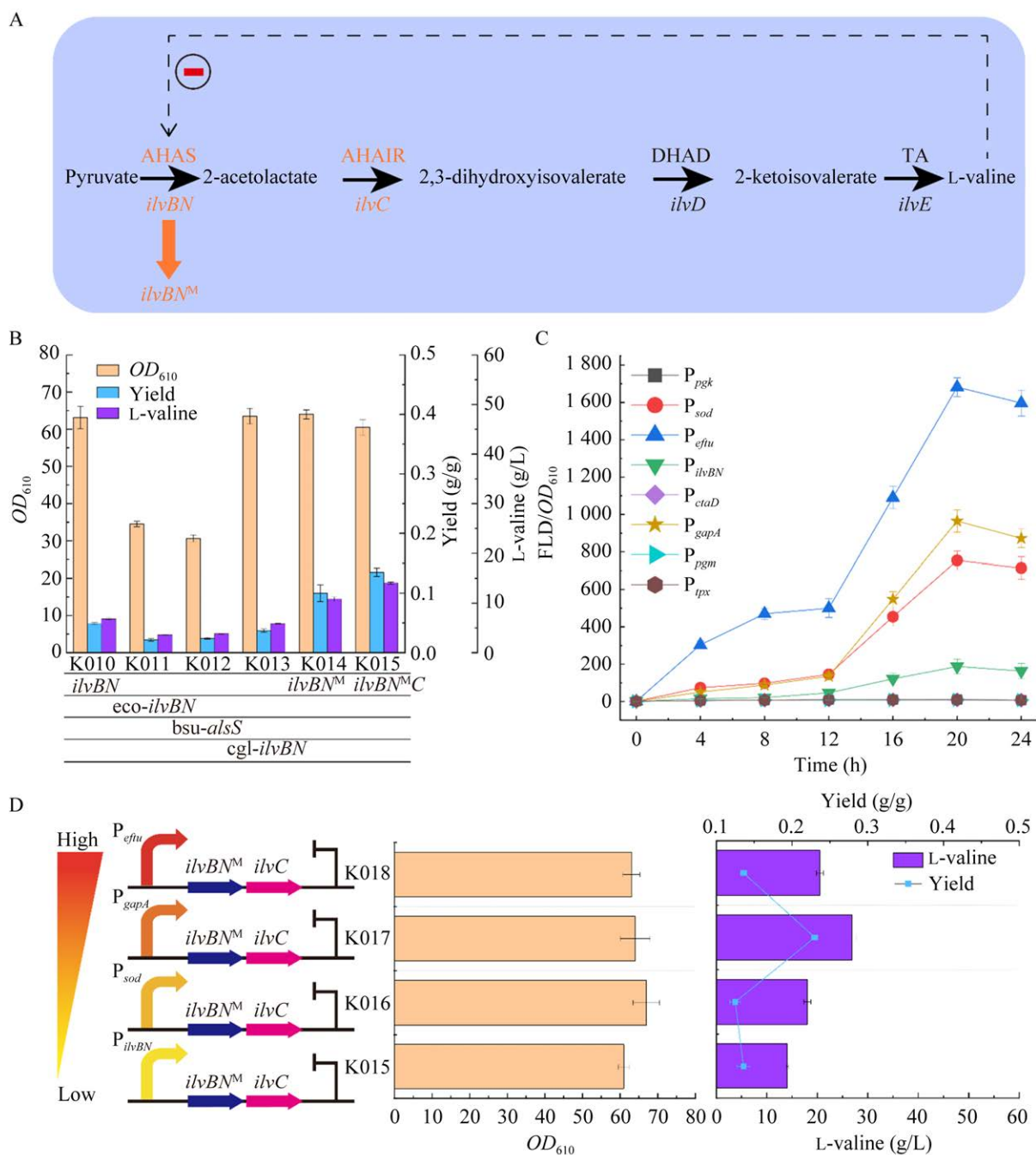
为了获得最优的乙酰羟酸合酶 AHAS (*ilvBN*),在 *C. glutamicum* K010 中表达并筛选了不同来源的 AHAS,包括 *E. coli* MG1655 来源的 *ilvBN*、*B. subtilis* 163 来源的 *alsS* 和 *C. glutamicum* ATCC 13032 来源的 *ilvBN*, 分别获得工程菌株 *C. glutamicum* K011 (K007-*eco-ilvBN*)、*C. glutamicum* K012 (K007-*bsu-alsS*) 和 *C. glutamicum* K013 (K007-*cgl-ilvBN*)。虽然 *C. glutamicum* K013 菌株的 L-缬氨酸产量和得率均优于 *C. glutamicum* K011 和 *C. glutamicum* K012,但是却全部低于 *C. glutamicum* K010。因此,表达本源 *ilvBN* 的 *C. glutamicum* K010 仍然是最优菌株,故仍然选

择 *C. glutamicum* K010 进行后续研究(图 4B)。

在 L-缬氨酸合成过程中, L-缬氨酸对本源关键酶 AHAS 存在着反馈抑制。AHAS 由 *ilvB* 编码的催化亚基和 *ilvN* 编码的调节亚基构成,调节亚基 *IlvN* 的 156 位 Gly 定点突变为 Glu 可以提高 AHAS 的抗反馈抑制能力<sup>[37,41]</sup>。因此,采用定点突变策略,将 *C. glutamicum* K010 中 *IlvN* 第 156 位 Gly 定点突变成 Glu,获得工程菌株 *C. glutamicum* K014 (*ilvBN<sup>M</sup>*), L-缬氨酸产量和得率分别达到了 10.8 g/L 和 0.1 g/g, 比 *C. glutamicum* K010 分别提高了 58.82%和 104.08% (图 4B)。上述结果表明,定点突变 AHAS,有效改善了 *C. glutamicum* K014 的抗反馈抑制能力,从而提高了 L-缬氨酸的产量和得率。

为了进一步强化表达 L-缬氨酸合成路径关键酶,在 *C. glutamicum* K014 的 AHAS (*ilvBN<sup>M</sup>*) 之后继续串联表达乙酰羟酸还原异构酶(*ilvC*),获得工程菌株 *C. glutamicum* K015 (*ilvBN<sup>M</sup>C*), L-缬氨酸产量和得率进一步提升至 14.04 g/L 和 0.135 g/g, 比 *C. glutamicum* K014 分别提高了 30%和 35% (图 4B)。上述结果表明,串联过表达 *ilvBN<sup>M</sup>* 和 *ilvC*,有利于提高 *C. glutamicum* 的 L-缬氨酸生产能力。

在此基础上,利用启动子工程策略,优化了 *ilvBN<sup>M</sup>* 和 *ilvC* 的基因串联表达水平,进一步提高了 L-缬氨酸的产量。首先,以 mKate 作为报告蛋白,测试了 8 个不同启动子  $P_{pgk}$ 、 $P_{sod}$ 、 $P_{eftu}$ 、 $P_{ilvBN}$ 、 $P_{ctaD}$ 、 $P_{gapA}$ 、 $P_{pgm}$  和  $P_{tpx}$ , 获得了 4 种不同启动强度的启动子,由强到弱的顺序为  $P_{eftu}$ 、 $P_{gapA}$ 、 $P_{sod}$  和  $P_{ilvBN}$  (图 4C);其次,采用上述筛选的 4 种不同启动强度的启动子,分别过表达一个拷贝的 *ilvBN<sup>M</sup>C* 基因,获得工程菌株 *C. glutamicum* K016 ( $P_{sod}$ -*ilvBN<sup>M</sup>C*)、*C. glutamicum* K017 ( $P_{gapA}$ -*ilvBN<sup>M</sup>C*)、*C. glutamicum* K018 ( $P_{eftu}$ -*ilvBN<sup>M</sup>C*)和 *C. glutamicum* K015 (*ilvBN<sup>M</sup>C*)。



**图 4** L-缬氨酸合成路径关键酶的表达水平优化 A: 路径关键酶的改造靶点. B: *ilvBN* 和 *ilvC* 的改造与串联表达对 L-缬氨酸生产的影响. C: 启动子强度评价. D: 启动子工程优化基因串联表达水平对 L-缬氨酸生产的影响

Figure 4 Optimization of the expression levels of key enzymes in L-valine synthesis pathway. A: Targets of pathway key enzymes for engineering. B: Effect of the modification and tandem expression of *ilvBN* and *ilvC* on L-valine production. C: Evaluation of promoter strength. D: Effect of gene tandem expression level on L-valine production. *ilvBN* encodes acetohydroxyacid synthase (AHAS), *ilvC* encodes acetohydroxyacid isomeroreductase (AHAIIR), *ilvD* encodes dihydroxyacid dehydratase (DHAD), *ilvE* encodes transaminase B (TA).

其中, *C. glutamicum* K016、*C. glutamicum* K017 和 *C. glutamicum* K018 的 L-缬氨酸产量分别达到了 18.03 g/L、26.87 g/L 和 20.51 g/L, 分别比 *C. glutamicum* K015 提高了 28.42%、91.38% 和 46.08% (图 4D)。上述结果表明, 筛选获得的启动子  $P_{gapA}$  能够改善关键酶  $ilvBN^M C$  的表达水平。综上所述, 通过 L-缬氨酸合成路径关键酶的表达水平优化, *C. glutamicum* K017 的 L-缬氨酸产量和得率分别达到了 26.87 g/L 和 0.233 g/g, 比优化前的菌株 *C. glutamicum* K010 分别提高了 2.95 倍和 3.76 倍。

### 2.3 L-缬氨酸合成路径的辅因子平衡优化

在 *C. glutamicum* 的 L-缬氨酸合成途径中, 辅因子的生成与消耗存在不平衡: 1 mol 葡萄糖合成 1 mol L-缬氨酸时, 糖酵解途径会产生 2 mol NADH, 但是 L-缬氨酸生产过程中却是消耗 2 mol NADPH, 即: 乙酰羟酸还原异构酶(IlvC)催化 2-乙酰乳酸形成 2,3-二羟基异戊酸和支链氨基酸转氨酶(IlvE)催化 2-酮基异戊酸形成 L-缬氨酸<sup>[36,42]</sup>。这种辅因子生成和消耗的不平衡, 导致了糖酵解途径生成的 NADH 过度积累, 造成了 NADH 资源的浪费, 最终引起了代谢流的分散、影响了 L-缬氨酸的合成。

研究表明, 通过对 IlvC 氨基酸残基进行定点突变可以改变其辅因子特异性, 从偏好 NADPH 转变为偏好 NADH<sup>[36,43]</sup>。为了优化辅因子的供需平衡, 首先利用定点突变策略改造 IlvC, 将 S34G、L48E 和 R49F 这 3 个氨基酸残基突变引入 IlvC, 获得了突变体 IlvC<sup>SM</sup>, 从而将 IlvC 的辅因子偏好性从 NADPH 转变为 NADH, 构建了工程菌株 *C. glutamicum* K019 ( $P_{gapA}$ - $ilvBN^M C^{SM}$ ), L-缬氨酸的产量和得率分别达到了 35 g/L 和 0.26 g/g, 比 *C. glutamicum* K017 分别提高了 30.26% 和 13.04% (图 5B)。另外, 通过测定 IlvC 辅因子偏好性改造前后的酶活力, 发现改造前 IlvC 以 NADPH 为辅因子的

酶活力为 0.375 U/mg, 改造后 IlvC<sup>SM</sup> 以 NADH 为辅因子的酶活力为 0.389 U/mg (图 5C)。上述结果表明, IlvC 的定点突变, 有利于提高 L-缬氨酸的产量和得率。

研究表明, 引入异源的 NADH 依赖型酶替换本源转氨酶(IlvE)也可以实现辅因子偏好性的转换<sup>[25,41]</sup>。为了进一步优化辅因子的供需平衡, 提高对 NADH 的利用效率, 对于 IlvE 催化的 NADPH 消耗反应, 采用引入异源酶的方式进行辅因子的平衡优化。通过将球形赖氨酸芽孢杆菌中的 NADH 依赖型亮氨酸脱氢酶(LeuDH)插入 *C. glutamicum* K019 的 IlvE 位点, 获得了工程菌株 *C. glutamicum* K020 ( $K019$ - $ilvE::P_{tac}$ - $leuDH$ ), 使得 L-缬氨酸的产量和得率分别达到了 54.16 g/L 和 0.262 g/g, 产量比 *C. glutamicum* K019 提高了 54.74%, 得率并未明显提升, 但是平均耗糖速率明显加快, 达到 3.45 g/(L·h), 比引入 LeuDH 前提高了 54% (图 5B、5D)。上述结果表明, 采用异源酶替换策略, 将支链氨基酸转氨酶(IlvE)替换成亮氨酸脱氢酶(LeuDH), 提高了 L-缬氨酸的产量。

最后, 为了进一步验证辅因子平衡优化的效果, 测试了不同菌株中的辅因子比例。*C. glutamicum* K017、*C. glutamicum* K019 和 *C. glutamicum* K020 中辅因子比例(NADH/NAD<sup>+</sup>)逐渐降低, 表明 NADH 已经逐渐被消耗(图 5E)。上述研究结果表明, 通过对路径关键酶的定点突变和异源替换, 显著改善了 L-缬氨酸合成路径中辅因子供需平衡, 提高了菌株的 L-缬氨酸合成能力。

### 2.4 发酵优化生产 L-缬氨酸

为了提高 L-缬氨酸生产效率, 对 *C. glutamicum* K020 的 L-缬氨酸发酵条件进行了优化。首先, 评价了构成脱氢酶辅酶的维生素 B3 对 *C. glutamicum* K020 发酵性能的影响。随着维生素 B3 浓度的增加(0、10、20、30 和 40 mg/L),

L-缬氨酸的产量先增加后降低。当维生素 B3 浓度为 30 mg/L 时, L-缬氨酸产量达到最高为 72 g/L,

得率为 0.335 g/g, 比不添加维生素 B3 分别提高了 32.94% 和 27.86% (图 6A)。上述研究结果表明,

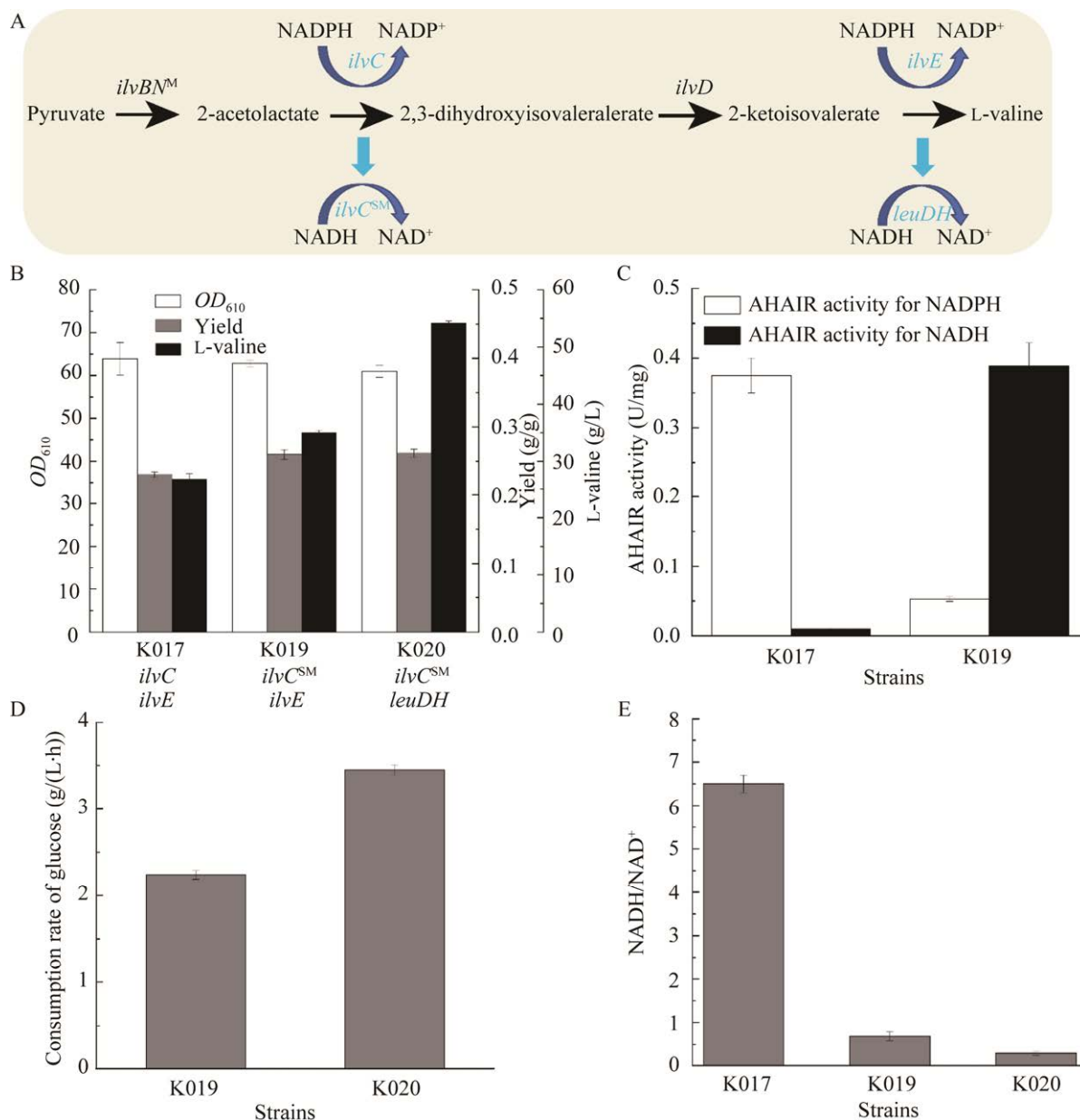


图 5 辅因子水平优化提高 L-缬氨酸产量和得率

A: 辅因子水平优化的改造靶点. B: 辅因子水平优化对 L-缬氨酸生产的影响. C: 改造 *IlvC* 辅因子后的 AHAIR 酶活力. D: 引入 *LeuDh* 后的葡萄糖消耗速率. E: 不同菌株中辅因子水平

Figure 5 The optimization of cofactor level increased the titer and yield of L-valine. A: Targets to be engineered for cofactor level optimization. B: Effect of cofactor level optimization on L-valine production. C: AHAIR activity after modification of *IlvC* cofactors. D: Glucose consumption rate after *LeuDh* introduction. E: Level of cofactors in different strains. *ilvBN* encodes acetohydroxyacid synthase (AHAS), *ilvC* encodes acetohydroxyacid isomeroreductase (AHAIR), *ilvD* encodes dihydroxyacid dehydratase (DHAD), *ilvE* encodes transaminase B (TA), *leuDh* encodes leucine dehydrogenase.



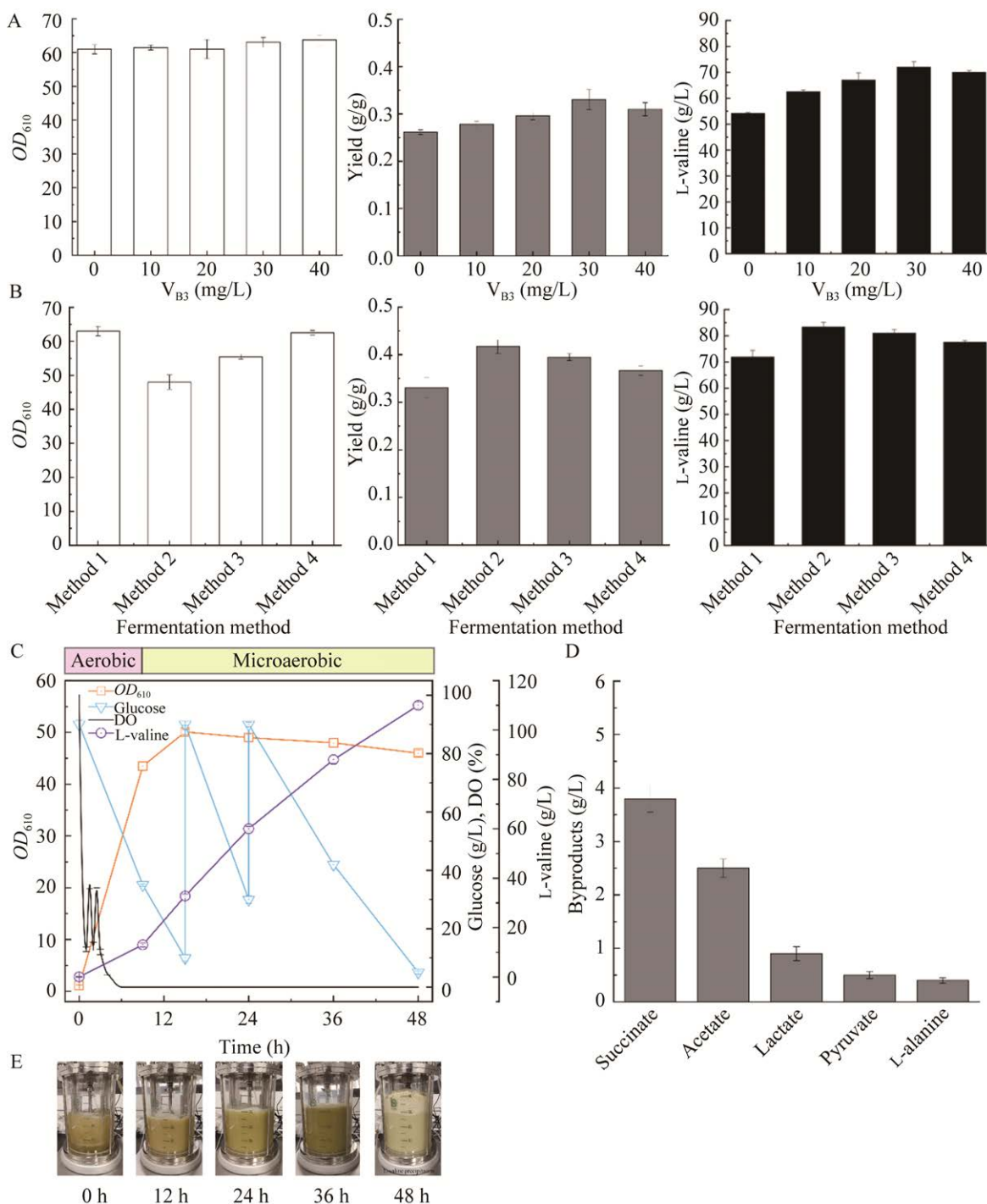


图6 发酵优化生产 L-缬氨酸 A: 维生素 B3 对发酵生产 L-缬氨酸的影响. B: 不同发酵方式对发酵生产 L-缬氨酸的影响. C: 在 5 L 发酵罐中 *C. glutamicum* K020 发酵生产 L-缬氨酸. D: *C. glutamicum* K020 发酵过程中的副产物. E: *C. glutamicum* K020 发酵过程中的发酵液变化

Figure 6 Fermentation optimization of L-valine production. A: Effect of vitamin B3 on L-valine production. B: Effect of different fermentation methods on the production of L-valine. C: L-valine production of *C. glutamicum* K020 in 5 L fermenter. D: Byproducts during the fermentation of *C. glutamicum* K020. E: Changes of fermentation broth during fermentation of *C. glutamicum* K020. Method 1: Aerobic fermentation; Method 2: Two-stage fermentation (aerobic first, microaerobic at 9 h); Method 3: Two-stage fermentation (aerobic first, microaerobic at 12 h); Method 4: Two-stage fermentation (aerobic first, microaerobic at 15 h).

通过优化营养物质-维生素 B3 的添加量,显著改善了 L-缬氨酸的生产。其次,分析了不同发酵方式(如有氧发酵、两阶段发酵)对 *C. glutamicum* K020 发酵性能的影响。在有氧发酵时(method 1),菌株生长  $OD_{610}$  在 15 h 已经进入稳定期并不再增加,最终 L-缬氨酸的产量为 72 g/L,得率为 0.335 g/g (图 6B)。当采用两阶段发酵时,选择在发酵前期(9、12 和 15 h)进行发酵转换(method 2、method 3 和 method 4),结果表明在 9 h 进行发酵方式转换的效果最优,L-缬氨酸的产量达到 83.33 g/L,得率为 0.42 g/g (图 6B)。上述结果表明,在 9 h 时进行发酵方式的转换更有利于 L-缬氨酸的发酵生产。

最后,在最优条件进行 5 L 发酵罐发酵生产 L-缬氨酸(图 6E)。经过 48 h 的一步法直接发酵,菌株生长的最大  $OD_{610}$  为 50.1, L-缬氨酸产量、得率和生产强度分别达到了 110 g/L、0.51 g/g 和 2.29 g/(L·h) (图 6C)。另外,发酵的主要副产物,包括琥珀酸、乙酸和乳酸,积累量分别为 3.8、2.5 和 1.0 g/L,而丙酮酸和 L-丙氨酸副产物积累量均在 1 g/L 以下(图 6D)。上述结果表明,在最优条件下进行 5 L 发酵罐的一步直接发酵实验可以实现 L-缬氨酸的高效生产。

### 3 讨论

利用工业微生物(如 *C. glutamicum*)高效生产高价值化学品[如 L-缬氨酸(表 1)]时,加强并优化目标产物合成路径关键酶的基因表达水平是提高目标产物产量最直接的方式。目前,在 *C. glutamicum* 中采用的策略主要有 3 种:解除反馈抑制、过表达单个关键酶编码基因和过表达基因簇<sup>[36,44]</sup>。例如:在 *C. glutamicum* ATCC 13032 中,通过改造乙酰羟酸合酶,将 IlvN20-22 位 Gly-Ile-Ile 突变为 Asp-Asp-Phe,获得了抗反

馈抑制突变株 *C. glutamicum* ilvNM13, L-缬氨酸产量提高了 44.44%,达到了 15.2 g/L<sup>[37]</sup>;串联过表达 *ilvBNCE*,使 L-缬氨酸产量提高了 223%,达到了 12.29 g/L<sup>[38]</sup>。在上述研究中,虽然通过解除限速酶反馈抑制或者直接过表达路径关键酶提高了 L-缬氨酸的产量,但是前体供应量不明确、未关注代谢路径的平衡性,采取的代谢工程策略也较为单一、产量提升效果不显著。本研究在丙酮酸充足供应的基础上,借助定点突变和启动子工程等多种代谢工程策略相结合的方式,显著提高了 L-缬氨酸产量和得率。虽然异源乙酰羟酸合酶(*E. coli*-AHAS 和 *B. subtilis*-ALS)可以直接解除产物对限速酶的反馈抑制<sup>[25]</sup>,但是本研究发现表达异源基因(*E. coli*-*ilvBN* 和 *B. subtilis*-*alsS*)后,显著降低了菌体浓度和 L-缬氨酸产量。为了解决上述问题,本研究通过对本源 AHAS 进行定点突变,改善了菌株抗反馈抑制能力,提高了 L-缬氨酸产量。在此基础上,利用启动子工程策略,优化了 *ilvBN<sup>M</sup>* 和 *ilvC* 的基因串联表达水平,进一步提高了 L-缬氨酸的产量,使 L-缬氨酸产量比优化前提高了 295%,达到了 26.87 g/L。通过 L-缬氨酸合成路径的基因表达水平优化,实现了代谢路径的平衡,提高了 L-缬氨酸的生产水平。

辅因子工程作为一种增强代谢路径效率的有效策略,可以实现目标产物代谢流通量的最大化。在 *C. glutamicum* 的 L-缬氨酸合成途径中,辅因子的生成与消耗存在不平衡:1 mol 葡萄糖合成 1 mol L-缬氨酸时,糖酵解途径会产生 2 mol NADH,但是 L-缬氨酸生产过程中却是消耗 2 mol NADPH。这种辅因子生成和消耗的不平衡,会造成 NADH 的资源浪费,引起代谢流分散,最终影响 L-缬氨酸的合成。目前,采用的策略主要有 2 种:辅因子特异性系统和辅因子再生系统<sup>[36,42,45]</sup>。在 *C. glutamicum* ATCC



13869 中,通过加强合成路径等策略虽然使 L-缬氨酸最终产量达到 51.2 g/L,但是在菌株改造过程中并未关注辅因子供给情况<sup>[17]</sup>;通过敲除 *pgi* 基因,利用磷酸戊糖途径产生的 NADPH 进行辅因子供应,使 L-缬氨酸产量提高了 82.3%,虽然强化了 NADPH 的供给,但是并未关注辅因子不平衡的问题<sup>[39]</sup>。为了解决辅因子不平衡的问题,本研究利用定点突变策略,改变了 *IlvC* 的辅因子特异性,从偏好 NADPH 转变为偏好 NADH,并利用外源 NADH 依赖型 *LeuDH* 替换本源 NADPH 依赖型 *IlvE*,有效降低了辅因子比例(NADH/NAD<sup>+</sup>),工程菌株 *C. glutamicum* K020 的 L-缬氨酸产量比优化前提提高了 101.56%,达到了 54.16 g/L。通过辅因子工程策略,解决了合成路径中 NADH 浪费的问题,实现了 L-缬氨酸合成路径中辅因子的供需平衡,避免了代谢流分散,最大化程度上提高了 L-缬氨酸合成的代谢流量,提高了菌株的 L-缬氨酸合成能力。

发酵优化策略对于提高目标化合物的产量和得率起着不可替代的作用。例如,针对代谢工程改造获得的营养缺陷型菌株 *C. glutamicum* WCC003 ( $\Delta ilvA\Delta aceE$ )进行发酵条件优化(包括 L-异亮氨酸和乙酸盐添加量),使 L-缬氨酸产量提高了 39.89%,达到了 51.2 g/L<sup>[17]</sup>;针对基因工程改造获得的营养缺陷型菌株 *C. glutamicum*  $\Delta aceE\Delta pqr\Delta pgi$  进行乙酸盐添加量的优化,将 L-缬氨酸产量提高到了 48 g/L<sup>[39]</sup>。然而,上述研究仅仅对营养缺陷型菌株进行了相关营养物质添加量的优化,未对整体发酵工艺进行优化。针对工程菌株 *C. glutamicum* BN<sup>GE</sup>C<sup>TM</sup>DLD/ $\Delta LDH$ ,利用两步发酵法,即:第一步菌株经发酵培养后,离心收集菌体并重悬于 50 mL 新培养基中;第二步菌体厌氧催化,最终产量达到 227 g/L<sup>[36]</sup>。虽然在最终产量上具有优势,但

是利用两步发酵法反应体系小、菌体需求量大并且经过离心重悬过程,工艺相对比较复杂,不利于工业化生产。本研究利用工程菌株 *C. glutamicum* K020,在 5 L 发酵罐中进行两阶段发酵,不需要经过离心重悬等步骤,最终 L-缬氨酸产量达到 110 g/L,是目前报道利用微生物一步发酵法直接生产 L-缬氨酸的最高水平。

## 4 结论

本研究利用多种代谢工程策略,构建了高效的 L-缬氨酸合成途径,获得了高效生产 L-缬氨酸的谷氨酸棒杆菌,并结合新型两阶段发酵工艺实现了 L-缬氨酸的高效生产。首先,通过增强糖酵解途径和减弱副产物代谢路径相结合,强化了 L-缬氨酸合成前体丙酮酸的供给;其次,利用定点突变策略,提高了菌株的抗反馈抑制能力,并结合启动子工程策略,优化了合成路径关键酶的表达水平,强化了 L-缬氨酸的合成能力;再次,利用辅因子工程策略,解决了合成路径中 NADH 浪费的问题,优化了辅因子供需水平,进一步提高了 L-缬氨酸的产量;最后,通过发酵优化,在 5 L 发酵罐中工程菌株 *C. glutamicum* K020 的 L-缬氨酸产量、得率和生产强度分别达到了 110 g/L、0.51 g/g 和 2.29 g/(L·h)。上述策略为 L-缬氨酸菌株的改造和工业化生产奠定了基础,也为代谢工程改造生产其他氨基酸提供了借鉴。

## REFERENCES

- [1] OLDIGES M, EIKMANN BJ, BLOMBACH B. Application of metabolic engineering for the biotechnological production of L-valine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(13): 5859-5870.
- [2] KARAU A, GRAYSON I. Amino acids in human and animal nutrition[M]// *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 189-228.

- [3] BISHOP CA, SCHULZE MB, KLAUS S, WEITKUNAT K. The branched-chain amino acids valine and leucine have differential effects on hepatic lipid metabolism[J]. *The FASEB Journal*, 2020, 34(7): 9727-9739.
- [4] CHEN XH, LIU SR, PENG B, LI D, CHENG ZX, ZHU JX, ZHANG S, PENG YM, LI H, ZHANG TT, PENG XX. Exogenous L-valine promotes phagocytosis to kill multidrug-resistant bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 207.
- [5] WEN J, HELMBRECHT A, ELLIOT MA, THOMSON J, PERSIA ME. Evaluation of the valine requirement of small-framed first cycle laying hens[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(3): 1272-1279.
- [6] LIAQAT U, DITTA Y, NAVEED S, KING A, PASHA T, ULLAH S, MAJEED KA. Effects of L-valine in layer diets containing 0.72% isoleucine[J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): e0258250.
- [7] D'ESTE M, ALVARADO-MORALES M, ANGELIDAKI I. Amino acids production focusing on fermentation technologies-a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 14-25.
- [8] WANG XY, ZHANG HL, QUINN PJ. Production of L-valine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4319-4330.
- [9] GAO H, TUYISHIME P, ZHANG X, YANG TW, XU MJ, RAO ZM. Engineering of microbial cells for L-valine production: challenges and opportunities[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-16.
- [10] ZHAO K, LIU JM, GAO C, LIU J, CHEN XL, LIU LM, GUO L. Advances in microbial production of feed amino acid[M]// *Advances in Applied Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2022: 1-33.
- [11] PARK JH, LEE SY. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 491-506.
- [12] LIU J, XU JZ, WANG BB, RAO ZM, ZHANG WG. L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* based on systematic metabolic engineering: progress and prospects[J]. *Amino Acids*, 2021, 53(9): 1301-1312.
- [13] van der REST ME, LANGE C, MOLENAAR D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(4): 541-545.
- [14] JIANG Y, QIAN FH, YANG JJ, LIU YM, DONG F, XU CM, SUN BB, CHEN B, XU XS, LI Y, WANG RX, YANG S. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15179.
- [15] REED JL, VO TD, SCHILLING CH, PALSSON BO. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (*iJR904 GSM/GPR*)[J]. *Genome Biology*, 2003, 4(9): R54.
- [16] SEGRÈ D, VITKUP D, CHURCH GM. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(23): 15112-15117.
- [17] CHEN C, LI YY, HU JY, DONG XY, WANG XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 for L-valine production[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 66-75.
- [18] HAO YN, PAN XW, XING RF, YOU JJ, HU MK, LIU ZF, LI XF, XU MJ, RAO ZM. High-level production of L-valine in *Escherichia coli* using multi-modular engineering[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127461.
- [19] LI YJ, WEI HB, WANG T, XU QY, ZHANG CL, FAN XG, MA Q, CHEN N, XIE XX. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1588-1602.
- [20] GUO L, DING S, LIU YD, GAO C, HU GP, SONG W, LIU J, CHEN XL, LIU LM. Enhancing tryptophan production by balancing precursors in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(3): 983-993.
- [21] LIU JH, LI HL, XIONG H, XIE XX, CHEN N, ZHAO GR, CAIYIN Q, ZHU HJ, QIAO JJ. Two-stage carbon distribution and cofactor generation for improving L-threonine production of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(1): 110-120.
- [22] PARK JH, LEE KH, KIM TY, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(19): 7797-7802.
- [23] PARK JH, KIM TY, LEE KH, LEE SY. Fed-batch

- culture of *Escherichia coli* for L-valine production based on *in silico* flux response analysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(4): 934-946.
- [24] SAVRASOVA EA, STOYNOVA NV. Application of leucine dehydrogenase Bcd from *Bacillus subtilis* for L-valine synthesis in *Escherichia coli* under microaerobic conditions[J]. *Heliyon*, 2019, 5(4): e01406.
- [25] HAO YN, MA Q, LIU XQ, FAN XG, MEN JX, WU HY, JIANG S, TIAN DG, XIONG B, XIE XX. High-yield production of L-valine in engineered *Escherichia coli* by a novel two-stage fermentation[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 198-206.
- [26] PARK JH, JANG YS, LEE JW, LEE SY. *Escherichia coli* W as a new platform strain for the enhanced production of L-valine by systems metabolic engineering[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(5): 1140-1147.
- [27] YUKAWA H, OMUMASABA CA, NONAKA H, KÓSP, OKAI N, SUZUKI N, SUDA M, TSUGE Y, WATANABE J, IKEDA Y, VERTÈS AA, INUI M. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R[J]. *Microbiology*, 2007, 153(4): 1042-1058.
- [28] LIU J, LIU MS, SHI T, SUN GN, GAO N, ZHAO XJ, GUO X, NI XM, YUAN QQ, FENG JH, LIU ZM, GUO YM, CHEN JZ, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 891.
- [29] WOLF S, BECKER J, TSUGE Y, KAWAGUCHI H, KONDO A, MARIENHAGEN J, BOTT M, WENDISCH VF, WITTMANN C. Advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* to produce high-value active ingredients for food, feed, human health, and well-being[J]. *Essays in Biochemistry*, 2021, 65(2): 197-212.
- [30] HOU XH, CHEN XD, ZHANG Y, QIAN H, ZHANG WG. L-valine production with minimization of by-products' synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum*[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(6): 2301-2311.
- [31] DENINA I, PAEGLE L, PROUZA M, HOLÁTKO J, PÁTEK M, NEŠVERA J, RUKLISHA M. Factors enhancing L-valine production by the growth-limited L-isoleucine auxotrophic strain *Corynebacterium glutamicum*  $\Delta$ ilvA  $\Delta$ panB ilvNM13 (pECKAilvBNC)[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(7): 689-699.
- [32] HOLÁTKO J, ELIŠÁKOVÁ V, PROUZA M, SOBOTKA M, NEŠVERA J, PÁTEK M. Metabolic engineering of the L-valine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum* using promoter activity modulation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 139(3): 203-210.
- [33] HAN GQ, XU N, SUN XP, CHEN JZ, CHEN C, WANG Q. Improvement of L-valine production by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(10): 4751-4758.
- [34] SCHWENTNER A, FEITH A, MÜNCH E, BUSCHE T, RÜCKERT C, KALINOWSKI J, TAKORS R, BLOMBACH B. Metabolic engineering to guide evolution-creating a novel mode for L-valine production with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 31-41.
- [35] BUCHHOLZ J, SCHWENTNER A, BRUNNENKAN B, GABRIS C, GRIMM S, GERSTMEIR R, TAKORS R, EIKMANN BJ, BLOMBACH B. 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.
- [36] HASEGAWA S, UEMATSU K, NATSUMA Y, SUDA M, HIRAGA K, JOJIMA T, INUI M, YUKAWA H. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(3): 865-875.
- [37] ELIŠÁKOVÁ V, PÁTEK M, HOLÁTKO J, NEŠVERA J, LEYVAL D, GOERGEN JL, DELAUNAY S. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 207-213.
- [38] BLOMBACH B, SCHREINER ME, HOLÁTKO J, BARTEK T, OLDIGES M, EIKMANN BJ. L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(7): 2079-2084.
- [39] BLOMBACH B, SCHREINER ME, BARTEK T, OLDIGES M, EIKMANN BJ. *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production[J]. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology, 2008, 79(3): 471-479.
- [40] YU SZ, ZHENG B, CHEN ZY, HUO YX. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 1-14.
- [41] HASEGAWA S, SUDA M, UEMATSU K, NATSUMA Y, HIRAGA K, JOJIMA T, INUI M, YUKAWA H. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(4): 1250-1257.
- [42] BARTEK T, BLOMBACH B, ZÖNNCHEN E, MAKUS P, LANG S, EIKMANN BJ, OLDIGES M. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(2): 361-371.
- [43] BRINKMANN-CHEN S, FLOCK T, CAHN JKB, SNOW CD, BRUSTAD EM, McINTOSH JA, MEINHOLD P, ZHANG L, ARNOLD FH. General approach to reversing ketol-acid reductoisomerase cofactor dependence from NADPH to NADH[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(27): 10946-10951.
- [44] RADMACHER E, VAITSIKOVA A, BURGER U, KRUMBACH K, SAHM H, EGGELING L. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2246-2250.
- [45] CHEN XL, GAO C, GUO L, HU GP, LUO QL, LIU J, NIELSEN J, CHEN J, LIU LM. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(1): 4-72.

(本文责编 郝丽芳)