

改造谷氨酸棒杆菌 CmpLs 转运系统促进 L-谷氨酸合成

左兴涛^{1,2}, 钟沙沙^{1,2}, 蔡柠匀^{1,2}, 石拓^{2,3}, 张志丹^{2,3}, 刘元涛⁴, 刘娇^{2,3}, 王德培¹, 陈久洲^{2,3*}, 郑平^{2,3*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

4 呼伦贝尔东北阜丰生物科技有限公司, 内蒙古 呼伦贝尔 162650

左兴涛, 钟沙沙, 蔡柠匀, 石拓, 张志丹, 刘元涛, 刘娇, 王德培, 陈久洲, 郑平. 改造谷氨酸棒杆菌 CmpLs 转运系统促进 L-谷氨酸合成[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 271-287.

ZUO Xingtao, ZHONG Shasha, CAI Ningyun, SHI Tuo, ZHANG Zhidan, LIU Yuantao, LIU Jiao, WANG Depei, CHEN Jiuzhou, ZHENG Ping. Engineering of CmpLs enhances L-glutamate production of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 271-287.

摘要: L-谷氨酸的高效生产依赖于产物的快速外排, 其转运系统和细胞膜壁结构的人工改造已成为近年来研究的热点。针对谷氨酸棒杆菌特殊的细胞壁结构和组分, 本研究在一株能够组成型分泌 L-谷氨酸的菌株 SCgGC7 中验证了 CmpLs 转运系统对 L-谷氨酸合成及转运的影响。首先, 构建了不同 CmpLs 转运蛋白的敲除菌株, 明确了 CmpL1 和 CmpL4 敲除可以显著提高菌株的 L-谷氨酸生产性能; 其次, 利用温敏发酵工艺在 5 L 发酵罐中对上述菌株进行了发酵测试, 发现 CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株可以叠加 L-谷氨酸生产的温敏特性, 进一步强化高温条件下 L-谷氨酸的生产, 其中 CmpL1 敲除菌株表现出更好的 L-谷氨酸生产性能, 产量和糖酸转化率分别比对照菌株提高了 69.2% 和 55.3%, 最后, 对发酵终点样品进行了胞内和胞外代谢物组分析, 明确了 CmpLs 转运系统的改造可以明显促进 L-谷氨酸外排, 强化 L-谷氨酸合成和转运的代谢通量, 并且发现 CmpL1 敲除菌株胞内三羧酸循环中间代谢物和 L-谷氨酸下游代谢物的积累明显更少, 与其更强的 L-谷氨酸生产性能一致。不同 CmpLs 蛋白功能上的冗余和互补, 不仅为谷氨酸工业菌株的稳定性改造和性能提升提供了理想的靶点, 也为改造谷氨酸棒杆菌的细胞膜壁结构强化其他代谢产物的外排提供了新的靶点和策略。

关键词: L-谷氨酸; 谷氨酸棒杆菌; 分枝菌酸; 转运蛋白; 生物合成

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1301001); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CXRC-079); 中国科学院战略性先导科技专项(XDC0110000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1301001), the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-079), and the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDC0110000).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Jiuzhou, chen_jz@tib.cas.cn; ZHENG Ping, zheng_p@tib.cas.cn

Received: 2024-04-08; Accepted: 2024-05-30

Engineering of CmpLs enhances L-glutamate production of *Corynebacterium glutamicum*

ZUO Xingtao^{1,2}, ZHONG Shasha^{1,2}, CAI Ningyun^{1,2}, SHI Tuo^{2,3}, ZHANG Zhidan^{2,3},
LIU Yuantao⁴, LIU Jiao^{2,3}, WANG Depei¹, CHEN Jiuzhou^{2,3*}, ZHENG Ping^{2,3*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

4 Hulunbeier Northeast Fufeng Biotechnologies Co., Ltd., Hulunbuir 162650, Inner Mongolia, China

Abstract: The efficient production of L-glutamate is dependent on the product's rapid efflux, hence researchers have recently concentrated on artificially modifying its transport system and cell membrane wall structure. Considering the unique composition and structure of the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*, we investigated the effects of CmpLs on L-glutamate synthesis and transport in SCgGC7, a constitutive L-glutamate efflux strain. First, the knockout strains of CmpLs were constructed, and it was confirmed that the deletion of CmpL1 and CmpL4 significantly improved the performance of L-glutamate producers. Next, temperature-sensitive L-glutamate fermentation with the CmpL1 and CmpL4 knockout strains were carried out in 5 L bioreactors, where the knockout strains showcased temperature-sensitive characteristics and enhanced capacities for L-glutamate production under high temperatures. Notably, the CmpL1 knockout strain outperformed the control strain in terms of L-glutamate production, showing production and yield increases of 69.2% and 55.3%, respectively. Finally, the intracellular and extracellular metabolites collected at the end of the fermentation process were analyzed. The modification of CmpLs greatly improved the L-glutamate excretion and metabolic flux for both L-glutamate production and transport. Additionally, the CmpL1 knockout strain showed decreased accumulation of downstream metabolites of L-glutamate and intermediate metabolites of tricarboxylic acid (TCA) cycle, which were consistent with its high L-glutamate biosynthesis capacity. In addition to offering an ideal target for improving the stability and performance of the industrial strains for L-glutamate production, the functional complementarity and redundancy of CmpLs provide a novel target and method for improving the transport of other metabolites by modification of the cell membrane and cell wall structures in *C. glutamicum*.

Keywords: L-glutamate; *Corynebacterium glutamicum*; mycolic acid; transporter; biosynthesis

L-谷氨酸是全球第一大氨基酸品类, 全球年产量近400万t, 在食品、医药、化工、畜牧等领域应用广泛^[1]。L-谷氨酸主要通过微生物发酵法生产, 是最早的生物发酵产品之一。谷

氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种非致病性革兰氏阳性菌, 并且被认证为安全菌株(generally recognized as safe, GRAS), 因具有天然的谷氨酸高效合成能力而得名, 也是目

前发酵法生产 L-谷氨酸的主要菌种^[2]。在谷氨酸棒杆菌中,葡萄糖经糖酵解途径和三羧酸循环生成 α -酮戊二酸,并在谷氨酸脱氢酶(*gdh* 基因编码)的催化下合成 L-谷氨酸^[1](图 1)。近年来,基于理性代谢工程的微生物育种技术已经广泛用于 L-谷氨酸菌种的设计开发,通过对胞内核心代谢途径的优化改造, L-谷氨酸的合成能力得到了显著提升^[3]。然而, L-谷氨酸的生产不仅需要高效的合成通路,还需要利用跨膜转运系统快速分泌至胞外,以减少胞内代谢物积累产生的细胞压力和反馈调控^[4]。

谷氨酸棒杆菌可以在限制生物素含量、添加表面活性剂或抑制细胞壁合成的抗生素、提高发酵过程温度等条件下高效合成 L-谷氨酸,上述条件不仅可以改变胞内代谢流向促进 L-谷氨酸的合成,还可以影响细胞表面完整性诱发 L-谷氨酸的快速外排^[5-6]。谷氨酸棒杆菌中 *NCgl1221* 基因编码的机械敏感通道蛋白 *MscCG* (mechanosensitive channels of *Corynebacterium glutamicum*)是介导 L-谷氨酸跨过细胞膜的主要通道,传统诱导 L-谷氨酸合成的条件可以通过影响细胞外膜张力触发 *MscCG* 蛋白构象发生变化,激活其外排 L-谷氨酸的功能^[7-9]。然而,谷氨酸棒杆菌的膜壁结构中除了磷脂双分子层组成的细胞膜以外,还包括由肽聚糖和分枝菌酸为主构成的细胞壁结构^[10]。上述诱导 L-谷氨酸生产的条件大多也会直接影响细胞膜或细胞壁组分的合成和结构完整性,提高细胞的整体通透性,促进 L-谷氨酸的外排^[11-13]。因此,膜壁通透性的提高和 *MscCG* 介导的特异性外排是 L-谷氨酸高效分泌的关键,针对膜壁合成的位点进行改造也成为了进一步提升 L-谷氨酸菌种生产性能的研究热点。例如,Shi 等^[14]通过在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中敲除肽聚糖合成的关键基因 *murA* 和 *murB*,降低了细胞壁肽聚

糖的含量,促进了 L-谷氨酸温度敏感性外排。Yao 等^[15]通过敲除谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中编码乙酰-CoA 羧化酶亚基的 *dtsR1* 基因和编码丙酮酸羧化酶的 *pyc* 基因,抑制脂肪酸合成,使菌体在非诱导条件下即可促使 L-谷氨酸大量积累。

分枝菌酸作为棒杆菌属-分枝杆菌属-诺卡氏菌属(*Corynebacteria-Mycobacteria-Nocardia*, CMN)菌株细胞壁中特有的组分,与阿拉伯半乳糖和肽聚糖各自形成一层独立结构,各组分之间通过共价交联,形成分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合体(mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan, mAGP),共同构成了 CMN 菌属的细胞壁^[16]。2006 年,Hashimoto 等^[17]发现在生物素限制、添加表面活性剂和抗生素等诱导 L-谷氨酸过量产生的条件下分枝菌酸层产生缺陷,提示着分枝菌酸与 L-谷氨酸分泌同样密切相关。谷氨酸棒杆菌分枝菌酸的合成如图 1 所示,首先在聚酮合酶 *Pks13* 的催化下 2 条脂肪酸链缩合形成分枝菌酸(mycolic acid, MA),并与海藻糖连接形成 β -酮酯-海藻糖单分枝菌酸(β -keto-trehalose monocorynomycolate, β -keto- TCMC),然后在酮酰还原酶 *CmrA* 的催化下被还原成海藻糖单分枝菌酸(trehalose monocorynomycolate, TCMC)^[18-20],随后 TCMC 从胞内转运到周质空间,一部分结合 1 分子游离 MA 形成海藻糖双分枝菌酸(trehalose dicorynomycolates, TDCM),另一部分脱去海藻糖并与阿拉伯半乳糖共价连接,二者共同构成细胞外层的糖脂结构^[18]。江南大学王小元团队首先探索了分枝菌酸合成途径改造对 L-谷氨酸合成的影响,在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 中分别敲除 *pks13*、*cmrA* 或海藻糖生物合成的必需基因(*treS*、*treY* 和 *otsA*),可以部分或者完全阻断分枝菌酸的合成,非诱导条件下胞外 L-谷氨酸产量提高了 9 倍以上^[21-23]。

上述研究证实了改造分枝菌酸合成途径可以有效促进 L-谷氨酸的分泌，但完全阻断分枝菌酸合成的改造策略会影响细胞正常的生长和代谢^[16]，不适用于工业菌种的开发。

CMN 菌株中 RND (resistance-nodulation-division) 家族转运蛋白负责分枝菌酸的跨膜转运，对细胞壁的合成和细胞的生理代谢至关重要^[24]。谷氨酸棒杆菌中存在 4 个参与分枝菌酸转运的 RND 蛋白，即 CmpLs (Corynebacterial membrane protein large) 蛋白，分别为 CmpL1、CmpL2、CmpL3 和 CmpL4，4 种蛋白都在不同

程度上参与细胞膜壁结构中脂质的合成和转运，具体功能既互补又存在一定的差异^[24-25]，CmpLs 的功能和特点使其成为重塑谷氨酸棒杆菌的细胞膜壁结构，进一步提升 L-谷氨酸合成和分泌的理想改造靶点。本研究以一株基于谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 改造获得具有一定 L-谷氨酸生产能力的菌株 SCgGC7 为出发菌株，分别构建了不同 CmpL 同源蛋白的敲除菌株，通过孔板发酵评价了不同 CmpL 蛋白对菌株生长及 L-谷氨酸合成的影响；进一步利用 5 L 发酵罐测试了有效靶点的应用效果，确定了 CmpL1

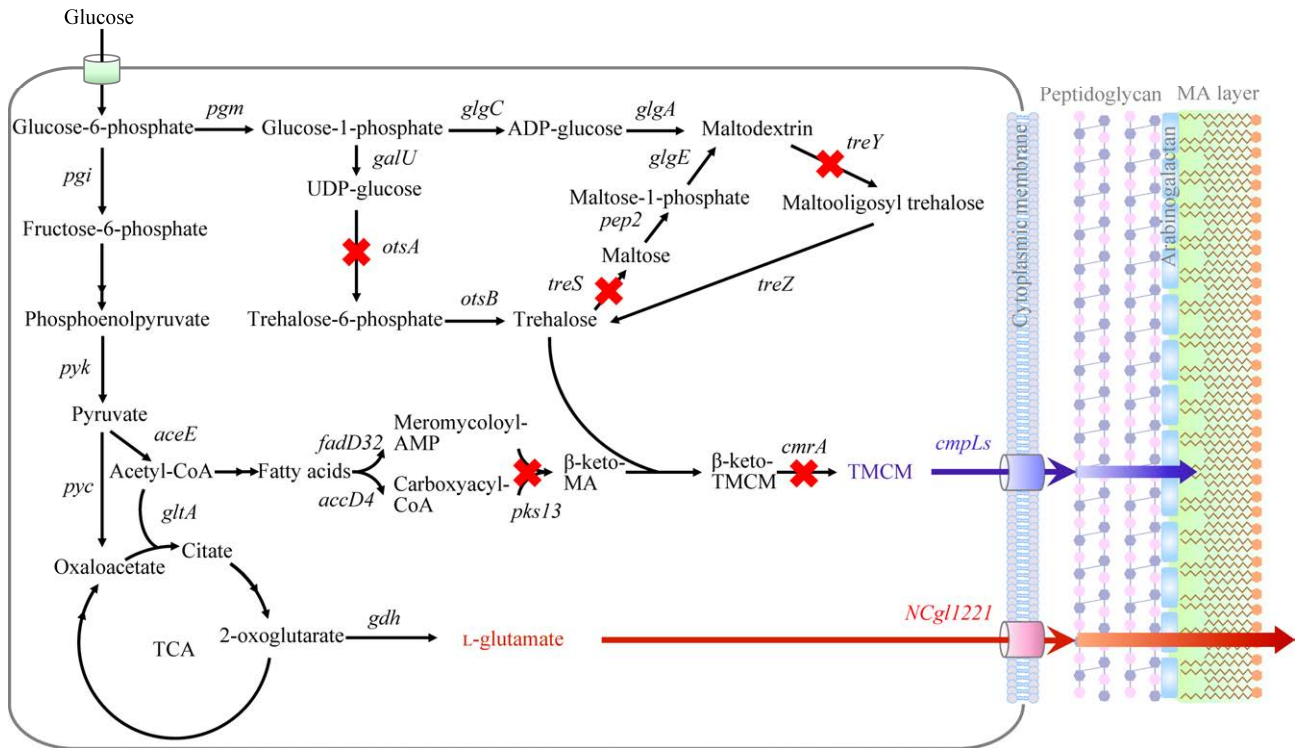


图 1 谷氨酸棒杆菌中 L-谷氨酸和分枝菌酸的生物合成途径

Figure 1 L-glutamate and mycolic acid biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. TCMC represents trehalose monocorynomylates; ADP represents adenosine diphosphate; UDP represents uridine diphosphate; AMP represents adenosine monophosphate; CoA represents coenzyme A; β-keto-MA represents β-keto-mycolic acid; β-keto-TMCM represents β-keto-trehalose monocorynomylate; TCA represents tricarboxylic acid cycle. Blue arrow represents the transportation of TCMC; Red arrow indicates represents the transportation of L-glutamate. The red cross represents the deletion of genes involved in mycolic acid biosynthesis, including *otsA* encoding trehalose-6-phosphate synthase, *treS* encoding trehalose-6-phosphate synthase, *treY* encoding maltooligosyltrehalose synthase, *pks13* encoding polyketide synthase, and *cmrA* encoding corynebacterineae mycolate reductase.

和 CmpL4 敲除对 L-谷氨酸生产的重要价值, 并通过胞内和胞外关键代谢物的检测, 明确了分枝菌酸转运系统的弱化可以有效促进 L-谷氨酸等代谢物的外排, 降低胞内 L-谷氨酸及上下游代谢物的积累, 为 L-谷氨酸生产菌种的创制提供了重要的新策略和新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及培养基

本研究所用菌株及质粒见表 1。

LB 培养基: 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl, 固体培养基添加 15 g/L 琼脂粉。

TSB 培养基: 5 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母粉, 9 g/L 大豆蛋白胨, 1 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g/L 尿素, 0.5 g/L 丁二酸, 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g/L 3-吗啉丙磺酸(3-morpholinopropanesulfoinc acid, MOPS), 10 μ g/L 生物素, 0.1 mg/L 维生素 B₁ (thiamine, VB₁), 用 NaOH 调节 pH 至 7.2。

CGXII 培养基: 40 g/L 葡萄糖, 20 g/L

$(NH_4)_2SO_4$, 5 g/L 尿素, 1 g/L KH_2PO_4 , 1.3 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 42 g/L MOPS, 0.01 g/L $CaCl_2$, 0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 mg/L $CuSO_4$, 0.2 mg/L $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03 g/L 原儿茶酸, 0.1 mg/L VB₁, 0.2 mg/L 生物素, 用 NaOH 调节 pH 至 7.0。

谷氨酸种子培养基(孔板): 25 g/L 葡萄糖, 2.2 g/L $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g/L 尿素, 10 g/L 玉米浆干粉, 0.9 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 22 g/L 豆饼水解液, 20 g/L MOPS, 用 NaOH 调节 pH 至 7.2。

谷氨酸发酵培养基(孔板): 80 g/L 葡萄糖, 1 g/L KH_2PO_4 , 10 g/L 尿素, 5 g/L 玉米浆干粉, 0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/L $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 200 μ g/L VB₁, 40 g/L MOPS, 用 NaOH 调节 pH 至 7.5。

谷氨酸平板活化培养基(发酵罐): 15 g/L 琼脂粉, 0.5 g/L 丁二酸, 1 g/L K_2HPO_4 , 3 g/L 尿素, 5 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母粉, 15 g/L 豆粕提取物, 10 μ g/L 生物素, 用 NaOH 调节 pH 至 7.0。

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains or plasmids | Relevant characteristic | Sources |
|--------------------------|--|----------------------------|
| <i>E. coli</i> Trans1 T1 | Host for cloning | TransGen Biotech Co., Ltd. |
| SCgGC7 | Derivative of strain ATCC 13869 with MscCG ^{A111V} and GltA ^{C316Y} mutation, a constitutive L-glutamate efflux strain | [26] |
| SCgGC7 Δ CmpL1 | Derivative of strain SCgGC7 with its <i>cmpL1</i> gene deleted | This study |
| SCgGC7 Δ CmpL2 | Derivative of strain SCgGC7 with its <i>cmpL2</i> gene deleted | This study |
| SCgGC7 Δ CmpL3 | Derivative of strain SCgGC7 with its <i>cmpL3</i> gene deleted | This study |
| SCgGC7 Δ CmpL4 | Derivative of strain SCgGC7 with its <i>cmpL4</i> gene deleted | This study |
| pK18 <i>mobsacB</i> | Suicide plasmid for gene deletion and mutation, <i>mob</i> , <i>sacB</i> , Km ^R | [27] |
| pK18- Δ CmpL1 | pK18 <i>mobsacB</i> derivative for deleting <i>cmpL1</i> | This study |
| pK18- Δ CmpL2 | pK18 <i>mobsacB</i> derivative for deleting <i>cmpL2</i> | This study |
| pK18- Δ CmpL3 | pK18 <i>mobsacB</i> derivative for deleting <i>cmpL3</i> | This study |
| pK18- Δ CmpL4 | pK18 <i>mobsacB</i> derivative for deleting <i>cmpL4</i> | This study |

谷氨酸种子培养基(发酵罐): 30 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母粉, 5 g/L 蛋白胨, 5 g/L 尿素, 0.8 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L K_2HPO_4 , 2 mg/L $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 2 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 mg/L VB_1 , 0.2 mg/L 生物素, 用NaOH调节pH至7.0–7.2。

谷氨酸发酵培养基(发酵罐): 50 g/L 葡萄糖, 4.5 g/L K_2HPO_4 , 10 g/L 玉米浆, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 30 mg/L $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 30 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 mg/L VB_1 , 0.3 mg/L 生物素, 0.5 g/L 蛋氨酸, 1 g/L 甜菜碱, 用NaOH调节pH至7.0–7.2, 550 g/L 流加糖。

1.1.2 引物设计及合成

本研究所用引物名称及序列见表2, 引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.3 主要试剂及仪器

ClonExpress® CE III重组克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 酵母粉和蛋白胨均购自ThermoFisher Scientific公司; 其余所有试剂均为国产分析纯。PCR仪, ThermoFisher Scientific公司; 分光光度计,

表2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

| Primer names | Primer sequences (5'→3') |
|--------------|--|
| CmpL1-UH-F | TGACATGATTACGAATTCCTGAAAGTGTCTTCTAGTGTG |
| CmpL1-UH-R | AATGACAAACAAAGCCAAAATCGCG |
| CmpL1-DH-F | TTGGCTTTGTTTGTTCATTGGTTTGTAGCACGCGAGAAAAC |
| CmpL1-DH-R | CGACGGCCAGTGCCAGATCAGTGACCATAAGTTCAGCGAT |
| CmpL2-UH-F | TGACATGATTACGAATCCCATCGAACTTGTC AAGGTCTTTGTGTC |
| CmpL2-UH-R | CCCAACTGTTGATGTTGAAGGTG |
| CmpL2-DH-F | AACATCAACGTTGGGGATACCTATGAGATCGCAAGCCAG |
| CmpL2-DH-R | CGACGGCCGGTGCCAAGCTTGATTATCCTCGCTCAGGATGGATTT |
| CmpL3-UH-F | TGACATGATTACGAATTTCTGCCAAGTCACGGAGAAAGTTAATT |
| CmpL3-UH-R | GTGCCTGCTTTGTTTCTACGACA |
| CmpL3-DH-F | GTAGAACAAAGCAGGCACGACCTCACTAACCTTGCCAAAAT |
| CmpL3-DH-R | CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGGGTGAGTTTCTTGATGTGGGATTA |
| CmpL4-UH-F | TGACATGATTACGAATTTCAAAGTAAGAACCGGTTCTCAGGTA |
| CmpL4-UH-R | AACAATGGCCAAAATAAGTAGCCAT |
| CmpL4-DH-F | CTTATTTTGCCATTGTTCTTAAGTGGCTGGATCGAATTCTG |
| CmpL4-DH-R | CGACGGCCAGTGCCAAGCTTCCATCGATAACAGATTTGAAATCCA |
| CmpL1-JD-F | AATGTCTGATGTGCATGAGGTCA |
| CmpL1-JD-R | CGCAGCTGCTCAATGCTTCC |
| CmpL2-JD-F | AGTCTTCTTCTGAGCTGTCGTCTGA |
| CmpL2-JD-R | GAATTGCTCCGTTGACAATACTCC |
| CmpL3-JD-F | ACGAATATCAGCGATGAGATCTTCT |
| CmpL3-JD-R | CACAATCTAATGGGCTACTTATGGG |
| CmpL4-JD-F | GTGAAAAGGTAAAGGACGACGACTAA |
| CmpL4-JD-R | CCACAGATTCCACCTGGTAGTCATA |
| pK-F | AAGCTTGGCACTGGCCGCTCG |
| pK-R | GAATTCGTAATCATGTGCATAGCTGT |
| pK18-JD-F | CATTAATGCAGCTGGCAGCAGACAG |
| pK18-JD-R | CATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGG |

Shimadzu 公司; NanoDrop 超微量核酸蛋白测定仪, ThermoFisher Scientific 公司; 电击转化仪, Eppendorf 公司; 多功能微孔板检测仪, Molecular Devices 公司; 生物传感分析仪 SBA-40D, 山东省科学院生物研究所; 高通量振荡培养系统, INFORS 公司; 5 L 发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; 高通量实时微生物生长曲线分析仪, 杰灵仪器制造(天津)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pK18- Δ CmpL1/2/3/4 质粒的构建

以 pK18- Δ CmpL1 质粒构建为例, 以 SCgGC7 基因组为模板, 用引物 CmpL1-UH-F/CmpL1-UH-R 和引物 CmpL1-DH-F/CmpL1-DH-R 分别通过 PCR 扩增获得敲除 *cmpL1* 基因的上同源臂片段及下同源臂片段, 以 pK18*mobsacB* 质粒为模板, 用引物 pK-F/pK-R 扩增 pK18*mobsacB* 线性化载体片段, 以上 3 片段产物纯化回收后进行 3 片段同源重组连接, 连接产物转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans1-T1 感受态细胞中, 涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 固体平板上。从转化平板上挑取单菌落作为模板用引物 pK18-JD-F/pK18-JD-R 进行菌落 PCR 验证, 将条带正确的阳性转化子接入含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养, 获得重组质粒 pK18- Δ CmpL。按上述相同方法构建获得重组质粒 pK18- Δ CmpL2、pK18- Δ CmpL3 及 pK18- Δ CmpL4。

1.2.2 基因缺失突变株的构建

以 *cmpL1* 基因敲除菌株构建为例, 采用电穿孔法将 pK18- Δ CmpL1 质粒转化至 SCgGC7 感受态细胞中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后涂布于含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 TSB 固体平板, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜培养, 从转化平板上挑取单菌落作为模板用引物 CmpL1-JD-F/pK18-JD-R 进行菌落 PCR 验证鉴定出第一轮重组正确的阳性转化子, 接入含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 TSB 液体培养基中

培养 4 h 后, 吸取 100 μL 菌液涂布于含有 10% 蔗糖的 TSB 固体平板。待平板长出单克隆后, 分别挑取单克隆先后划线至卡那霉素平板和蔗糖平板, 将在卡那霉素平板不生长而蔗糖平板能够正常生长的克隆用引物 CmpL1-JD-F/CmpL1-JD-R 进行菌落 PCR 验证, 条带正确的克隆为第二轮阳性转化子, 即为敲除菌株 SCgGC7 Δ CmpL1。利用上述同样的方法构建获得菌株 SCgGC7 Δ CmpL2、SCgGC7 Δ CmpL3 及 SCgGC7 Δ CmpL4。

1.2.3 CmpLs 敲除菌生长验证

将-80 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的菌种接种至含有 5 mL TSB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养。随后将培养的菌液在 12 000 r/min 下离心 2 min, 收集沉淀, 并用 CGXII 基本培养基清洗 2 次, 之后以 0.1 的初始 OD_{600} 接种至每孔含有 400 μL CGXII 液体培养基的 48 孔板中, 每个菌株设置 3 个平行, 置于高通量实时微生物生长曲线分析仪中培养 48 h, 每隔 1 h 测定 1 次菌株生长情况。

1.2.4 L-谷氨酸孔板发酵

在 TSB 固体平板上对菌株进行活化, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12 h, 随后, 接种到每孔含 800 μL 谷氨酸种子培养基的 24 孔板中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 条件下培养 6-7 h。待种子 OD_{600} 达到 7.0-8.0 时以 0.5 的初始 OD_{600} 转接至每孔含 800 μL 谷氨酸发酵培养基的 24 孔板中, 每个菌株设置 3 个平行, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 培养 25 h, 发酵结束后, 检测菌液 OD_{600} , 并用 SBA-40D 检测 L-谷氨酸和葡萄糖的含量。

1.2.5 5 L 发酵罐测试

在谷氨酸活化平板培养基上活化菌株, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 用接种环划取菌落接种于含有 100 mL 谷氨酸种子培养基的 500 mL 三角瓶中。32 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 12-14 h, 按照 25% 的接种量转接至含有 1.5 L 谷氨酸发酵培养基的 5 L 发酵罐中。发酵初始条件为: 32.5 $^{\circ}\text{C}$,

pH 6.95, 转速 300 r/min, 溶氧 100%, 罐压 0.05 MPa。发酵过程维持溶氧在 35%–45%, pH 6.95, 葡萄糖含量 0–10 g/L, 并从发酵 0 h 开始测量发酵液 OD_{600} 、L-谷氨酸及残糖含量, 并在发酵终点根据 L-谷氨酸产量及总糖消耗量计算葡萄糖转化率。当 OD_{600} 大于 40.0 时, 将温度提升至 37.5 °C 直至发酵结束。

1.2.6 胞内和胞外代谢物组样品处理及检测分析

胞内代谢物提取: 快速吸取 0.2 mL 发酵结束后的菌液放入 1 mL 淬灭剂(–25 °C 预冷的 40% 甲醇)中, 快速摇匀, 4 °C、10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。向菌体沉淀中加入 4 °C 预冷的代谢物提取液(甲醇:乙腈:水=2:2:1, 体积比, 含 0.1% 甲酸)重悬, 按照样品中的最小菌体密度进行归一化。取 12.84 OD_{600} 菌体量加入 800 mg 玻璃珠(粒径 0.1 mm), 冷冻研磨(70 Hz, 60 s, –50 °C, 重复 10 次), 取出后超声 5 min, 超声结束后于 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 取上清液至干净的 1.5 mL 离心管中, 重复提取 2 次, 合并上清液, 于 4 °C 真空离心浓缩仪下浓缩至完全干燥, 放置 –80 °C 冰箱保存。

将上述代谢物样品加入 100 μ L 50% 乙腈复溶, 10 000 r/min、4 °C 离心 30 min, 取上清液放入液相瓶中, 使用超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪(液相部分: UPLC primer 系统, Waters LLC.; 质谱部分: TripleTOF 6600, SCIEX 公司)进行液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析。色谱条件: ACQUITY BEH Amide (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m) 色谱柱, 流动相为 25 mmol/L 乙酸铵和 0.1% 氨水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0–18 min, 95%–65% B; 18–22 min, 40% B; 22–30 min, 40%–95% B; 柱温 30 °C; 流速 0.3 mL/min; 进样体积 5 μ L。质谱条件: 采用 ESI 电喷雾离子源, 负离子模式, 喷雾电压

–4 500 V, 离子源温度 550 °C; 去簇电压 –80 V; 碰撞能量(35 \pm 15) V; 气帘气压力 35 psi; 雾化气和辅助气均为 55 psi。采用 Data Dependent Acquisition 进行二级数据采集, 每个扫描周期包含 1 次飞行时间质谱(time of flight mass spectrometry, TOF MS)扫描和 12 次串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)扫描。TOF MS 的质量范围为 62–1 000 Da, MS/MS 的质量范围为 30–1 000 Da。

胞外代谢物样品制备及检测: 将 1 mL 发酵结束的菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 1 min, 取上清, 用 0.22 μ m 的滤膜处理后进行 LC-MS/MS 分析, 色谱及质谱条件同上。胞外 L-谷氨酸使用发酵过程 SBA-40D 检测的数据。

2 结果与分析

2.1 CmpLs 敲除菌株的构建及生长测试

为了研究 CmpLs 改造对 L-谷氨酸合成和转运的影响, 本研究在一株具有 L-谷氨酸生产能力的菌株——SCgGC7^[26]中对不同的 CmpL 分别进行了敲除。其中, SCgGC7 的出发菌株为谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869, 是 L-谷氨酸生产常用的宿主菌株, 介导 L-谷氨酸跨过细胞膜的通道蛋白 MscCG 的第 111 位丙氨酸突变为缬氨酸, 具有组成型分泌 L-谷氨酸的能力, 清晰的遗传背景和组成型的跨细胞膜转运有利于验证细胞壁结构改变对 L-谷氨酸外排的影响。根据基因组功能注释和序列比对, 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中 4 个 CmpLs 的编码基因 *NCgl2769* (编码 CmpL1)、*NCgl0887* (编码 CmpL2)、*NCgl0559* (编码 CmpL3)、*NCgl0228* (编码 CmpL4) 在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 中对应的基因分别为 BBD29_RS14025、BBD29_RS05080、BBD29_RS03570 和 BBD29_RS01380, 由于 2 个菌株中对应蛋白的氨基酸一致性较高(表 3), 推测相同蛋白具有类似的功能。

首先构建了基于 pK18*mobsacB* 的敲除质粒 pK18- Δ CmpL1、pK18- Δ CmpL2、pK18- Δ CmpL3 及 pK18- Δ CmpL4, 携带目标基因上下游序列的敲除片段大小分别为 1 400、1 200、1 500、1 300 bp, 片段大小与预期一致(图 2A)。之后利用上述构建的编辑质粒分别对 SCgGC7 菌株的目标基因进行染色体整合操作, 得到一次重组菌株。最后, 通过基于 SacB 的反向筛选得到二次重组菌株, PCR 验证结果如图 2B 所示, 敲除后的片段大小分别为 1 586、1 517、1 635、1 502 bp, 条带大小符合预期, 证明基因 *cmpL1*、*cmpL2*、*cmpL3*、*cmpL4* 敲除成功, 获得的 CmpLs 敲除菌株分别命名为 SCgGC7 Δ CmpL1、SCgGC7 Δ CmpL2、SCgGC7 Δ CmpL3 和 SCgGC7 Δ CmpL4。

为了验证 CmpLs 敲除对 ATCC 13869 菌株生理状态的影响, 根据 1.2.3 描述的方法将上述获得的菌株在 CGXII 基本培养基中进行生长测试。结果如图 2C 所示, CmpL2、CmpL3 和 CmpL4 敲除菌株与对照菌株 SCgGC7 相比没有表现出明显的生长差异, 而 CmpL1 敲除菌株生长受到明显的抑制, 其最大 OD_{600} 值为对照菌株的 91.0%。该结果表明 ATCC 13869 中 CmpL1 的功能与 ATCC 13032 中的类似^[24], 敲除菌株的生长受到较为明显的抑制, 原因可能是由于在谷氨酸棒杆菌中敲除 CmpL1 对分枝菌酸等膜壁脂质成分的合成和转运影响较大, 使细胞壁的合成受阻, 进而影响了菌株的生长; 不同的是, ATCC 13869 中敲除 CmpL1 仅体现在最大

表 3 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 中 CmpLs 的同源序列及比对信息

Table 3 Homologous sequence and alignment information of CmpLs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869

| Name | Accession number for <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 | Size in amino acid | Closest homolog in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869 (identities) |
|-------|---|--------------------|--|
| CmpL1 | NCgl2769 | 773 | BBD29_RS14025 (99.35%) |
| CmpL2 | NCgl0887 | 792 | BBD29_RS05080 (99.37%) |
| CmpL3 | NCgl0599 | 707 | BBD29_RS03570 (99.38%) |
| CmpL4 | NCgl0228 | 797 | BBD29_RS01380 (99.38%) |

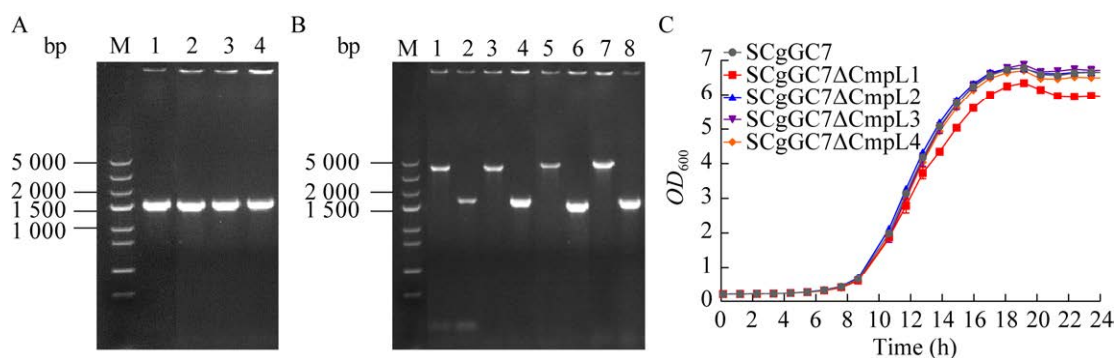


图 2 CmpLs 敲除菌株构建的 PCR 验证及生长测试

Figure 2 Construction and test of CmpLs knockout strains. A: Electrophoresis identification of PCR test of pK18- Δ CmpLs. Lane M: 5 000 bp DNA Marker; Lane 1, 2, 3, 4: pK18- Δ CmpL1, 2, 3, 4. B: Electrophoresis identification of PCR test of CmpLs deletion. Lane M: 5 000 bp DNA Marker; Lane 1, 3, 5, 7: PCR product of SCgGC7 genome with primers CmpLs-JD-F/R; Lane 2, 4, 6, 8: PCR product of SCgGC7 Δ CmpL1, 2, 3, 4 genome with primers CmpLs-JD-F/R. C: Growth of the control strain SCgGC7 and CmpLs knockout strains. Error bars represent means and standard deviations ($n=3$).

OD_{600} 值的降低, 延迟期没有显著延长。综合来看, ATCC 13869 中不同 CmpL 的功能与 ATCC 13032 相似, 主要参与细胞膜壁结构的合成。

2.2 CmpLs 敲除对 L-谷氨酸合成的影响

为了测试敲除 CmpLs 对 L-谷氨酸合成的影响, 将菌株 SCgGC7 Δ CmpL1、SCgGC7 Δ CmpL2、SCgGC7 Δ CmpL3、SCgGC7 Δ CmpL4 及对照菌株 SCgGC7 在 TSB 平板上活化, 经种子培养后在 24 孔板中进行常规温度条件下的发酵测试,

结果见图 3。由图 3A 可知, 在发酵培养基中培养 25 h 后, SCgGC7 Δ CmpL1 菌株的最终 OD_{600} 仅为 9.2, 明显低于 SCgGC7, 而 SCgGC7 Δ CmpL2、SCgGC7 Δ CmpL3 和 SCgGC7 Δ CmpL4 菌株的生长并未受到明显影响, 与 CGXII 基本培养基的生长情况一致, 表明敲除 CmpL1 对菌株生长的抑制作用与培养基的营养丰富程度无关, 而是菌株相应功能缺失的结果。L-谷氨酸产量如图 3B 所示, SCgGC7 Δ CmpL2、SCgGC7 Δ CmpL3

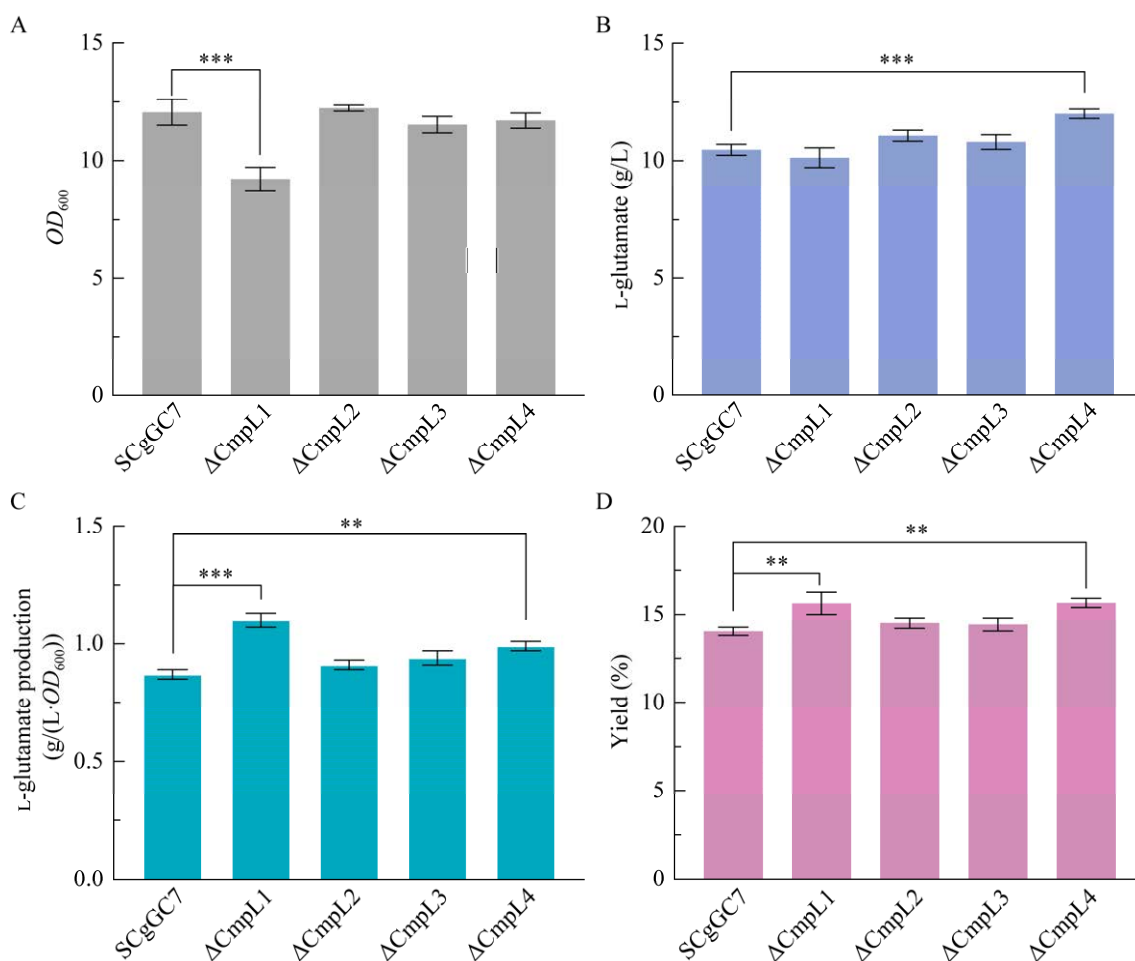


图 3 不同 CmpLs 敲除菌株 L-谷氨酸孔板发酵

Figure 3 Effects of deletion of CmpLs on growth (A), L-glutamate production (B), L-glutamate production per OD_{600} (C) and yield (D) were conducted on 24-deep-well plates. Error bars represent mean \pm SD (n=3), symbols on the top of standard error bars indicate the significance of the differences between data for control and different treatments. **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

和 SCgGC7 Δ CmpL4 菌株 L-谷氨酸产量达到了 (11.1 \pm 0.2) g/L、(10.8 \pm 0.3) g/L 和 (12.0 \pm 0.2) g/L, 分别比对照菌株 (10.4 \pm 0.2) g/L 提升了 5.7%、3.2% 和 14.6%, 其中 CmpL4 敲除显著提升了菌株 L-谷氨酸的产量。尽管 CmpL1 敲除会显著抑制菌株的生长, 但 SCgGC7 Δ CmpL1 菌株 L-谷氨酸产量却达到了对照菌株同等的水平 (10.1 \pm 0.4) g/L, 单位菌体 L-谷氨酸产量达到了 1.1 g/(L \cdot OD₆₀₀), 比对照菌株 [0.9 g/(L \cdot OD₆₀₀)] 提升了 22.2% (图 3C)。从图 3D 可以看出, SCgGC7 Δ CmpL1 菌株虽没有提升 L-谷氨酸产量, 但由于生物量相对较低, 减少了生长对葡萄糖的消耗, 从而使糖酸转化率达到了 (15.7 \pm 0.6)%, 与对照菌株 (14.0 \pm 0.2)% 相比明显提高了 12.1%。SCgGC7 Δ CmpL4 菌株凭借更高的产量水平, 其糖酸转化率 (15.7 \pm 0.3)% 也比对照菌株提高了 12.1%。上述结果表明, 在谷氨酸棒杆菌中弱化 CmpLs 转运系统, 尤其是敲除 CmpL1 或 CmpL4, 能够显著提高菌株 L-谷氨酸的生产性能。

2.3 CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株高温发酵测试

近年来, 温度敏感型谷氨酸菌种和生产工艺逐步在 L-谷氨酸的规模化生产中广泛应用^[2]。

高温以及部分关键基因的突变导致细胞膜壁结构发生变化, 分枝菌酸等组分含量降低, 有利于 L-谷氨酸的快速分泌^[14,17,28-30]。为了进一步验证 CmpL1 和 CmpL4 敲除对高温条件下的 L-谷氨酸合成的影响, 将菌株 SCgGC7 Δ CmpL1、SCgGC7 Δ CmpL4 及其对照菌株 SCgGC7 在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵, 过程中参考温度敏感型工艺进行了变温处理, 在 6 h 将发酵温度从 32 °C 提升至 37.5 °C^[28], 发酵过程数据如图 4 所示。从图 4A 可以看出, CmpL4 敲除菌株与对照菌株 SCgGC7 生长趋势基本相同, 而 CmpL1 敲除菌株的生长速率和最高 OD₆₀₀ 值均明显低于对照菌株 SCgGC7, 与孔板发酵数据基本一致。而从图 4C 可以看出, CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株 L-谷氨酸产量明显高于对照菌株, 发酵 18 h L-谷氨酸产量达到 22.0 g/L 和 16.0 g/L, 分别比对照菌株 SCgGC7 (13.0 g/L) 提高了 69.2% 和 23.1%。与孔板发酵数据不同的是, CmpL1 敲除菌株表现出了更大的优势, L-谷氨酸产量比 CmpL4 敲除菌株提高了 37.5%, 且还在持续提升, 而对照菌株和 CmpL4 敲除菌株中 L-谷氨酸产量已经不再继续提高。此外, 从图 4C 还可以看出, 6 h 升温后 CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株

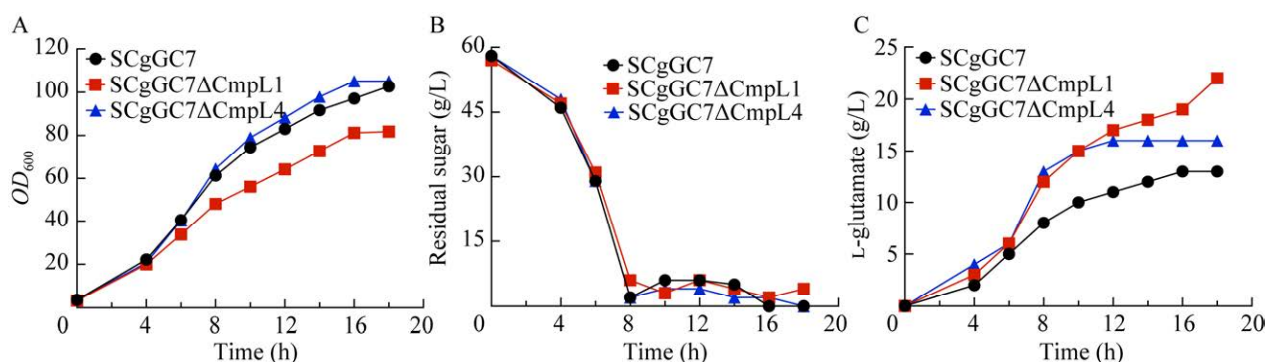


图 4 5 L 发酵罐分批补料发酵结果

Figure 4 Fed-batch fermentation in a 5 L bioreactor. A: Effects of CmpL1 and CmpL4 knockout strains on growth; B: Effects of CmpL1 and CmpL4 knockout strains on residual glucose; C: Effects of CmpL1 and CmpL4 knockout strains on L-glutamate production.

L-谷氨酸积累速度明显加快, 而对照菌株 L-谷氨酸积累速度在升温前后没有明显变化, 提示着 CmpLs 转运系统的改造可以强化高温条件下 L-谷氨酸的合成和转运, 提高 L-谷氨酸产量。最终, CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株的葡萄糖转化率达到 14.6% 和 10.1%, 分别比对照菌株提升了 55.3% 和 7.4%。上述结果表明敲除 CmpL1 和 CmpL4 均可以叠加 L-谷氨酸生产的温敏特性, 进一步促进高温条件下 L-谷氨酸的生产; 同时, CmpL1 敲除菌株具有更好的 L-谷氨酸生产性能, 更少的菌体能够积累更高浓度的 L-谷氨酸。

2.4 CmpLs 敲除菌株胞内和胞外代谢物组分析

为了探究改造 CmpLs 转运系统对 L-谷氨酸合成和转运的影响, 本研究进一步对上述 SCgGC7 Δ CmpL1 和 SCgGC7 Δ CmpL4 菌株以及对照菌株 SCgGC7 的发酵终点样品进行了胞内和胞外代谢物组分析。本研究选择质控(quality control, QC)样本中的 6 个离子(637.371_1.2 min, 218.102_8.5 min, 254.96_13.8 min, 341.144_16.5 min, 128.035_18.2 min, 400.145_22.1 min)提取色谱峰进行方法学验证, 所选的离子均分布在分析时间和质量范围内。连续进样同一个 QC 样本 6 次, 色谱峰强度和保留时间的相对标准偏差(relative

standard deviation, RSD) 分别为 1.3%–9.3% 和 4.8%–13%。将 QC 样品置于自动进样器(4 °C)中, 分别于 0、4、8、12、24 h 进样, 色谱峰强度和保留时间的 RSD 分别为 2.4%–11% 和 4.4%–14.9%。方法学验证结果表明了仪器和方法均具有良好的重现性, 采集的数据具有可靠性, 可用于下一步寻找差异代谢物和代谢通路分析。采用主成分分析技术(principal component analysis, PCA)对代谢轮廓进行分析, 从图 5 中可以看出, 在 95% 的置信区间内, 胞内与胞外代谢轮廓规律相似, 各组组内的 3 个生物学重复样品聚集明显, 说明 LC-MS 系统重复性较好, 采集方法稳定, 数据可靠。组间分离明显, 说明 3 组菌株在负离子模式下检测到的代谢物组间差异较大, 代谢物的种类或者浓度水平发生了显著变化。

对不同菌株胞内和胞外中心代谢及 L-谷氨酸上下游代谢物进行了详细分析。首先对 LC-MS/MS 检测所得数据进行整理, 将每个样本 3 个平行数据中各代谢物的相对含量取平均值; 然后根据不同样本中代谢物的浓度倍数(fold change, FC)取对数, 并绘制差异代谢物变化图, 以更直观地分析关键代谢通路差异代谢物相对浓度的变化, 具体分析结果见图 6。从数据可以看出, CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株胞

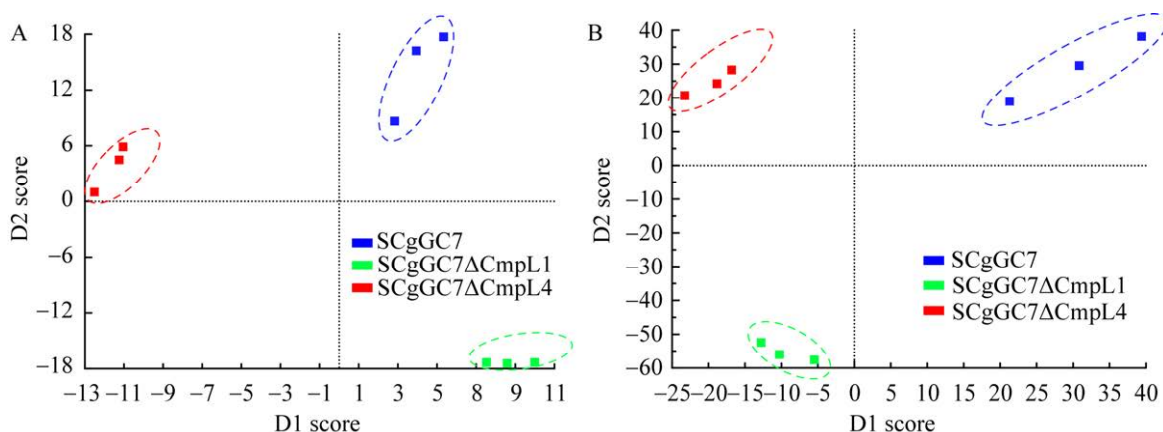


图 5 负离子电离模式下 PCA 得分散点图

Figure 5 PCA model result. A: Intracellular; B: Extracellular.

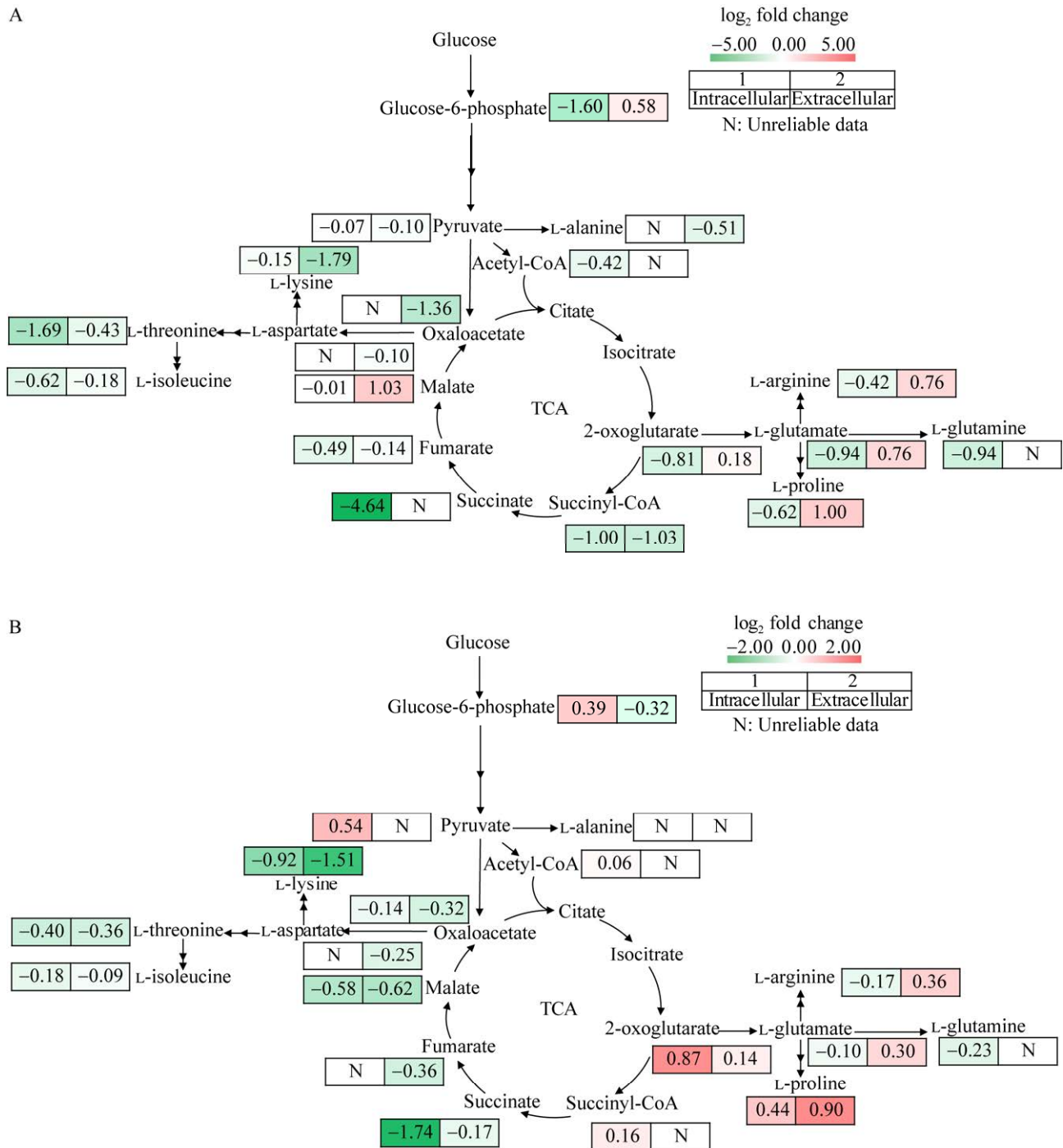


图 6 发酵样品代谢组学分析

Figure 6 Metabolomics analysis of fermented samples. A: Effects of deletion of CmpL1 on L-glutamate biosynthesis were analyzed based on metabolomic data; B: Effects of deletion of CmpL4 on L-glutamate biosynthesis were analyzed based on metabolomic data. CoA represents coenzyme A; TCA represents tricarboxylic acid cycle. The numbers in squares represent the metabolic flux ratios of the knockout strain to the control strain. The red and green squares represent up/down-regulation of metabolites, respectively. Left squares represent the intracellular metabolic fluxes; Right squares represent the extracellular metabolic fluxes. N represents unreliable data.

外 L-谷氨酸含量显著提高,但胞内 L-谷氨酸含量明显降低,这表明敲除 CmpL1 和 CmpL4 后促进了 L-谷氨酸的外排,增加了发酵液中 L-谷氨酸的产量。同时,两菌株胞内和胞外天冬氨酸家族氨基酸含量均出现明显的下降,表明 L-谷氨酸合成通路的强化降低了天冬氨酸家族氨基酸合成的代谢通量。不同的是,CmpL1 敲除菌株胞内 L-谷氨酸的下降幅度明显更高,且胞内 α -酮戊二酸等糖酵解和三羧酸循环的中间代谢物以及 L-谷氨酸下游代谢物脯氨酸也呈现明显的下降趋势,表明 CmpL1 敲除菌株 L-谷氨酸的快速外排导致代谢流更多地流向了 L-谷氨酸的合成和转运,加快了胞外 L-谷氨酸的积累;而 CmpL4 敲除菌株胞内 L-谷氨酸下降幅度相对较小,糖酵解和三羧酸循环部分中间代谢物以及脯氨酸在胞内均出现了明显的积累,一定程度上限制了 L-谷氨酸的合成,导致胞外 L-谷氨酸产量低于 CmpL1 敲除菌株;因此,CmpL1 和 CmpL4 具体功能上的差异在 L-谷氨酸合成和转运中也会产生不同的应用效果。综上所述,CmpLs 转运系统功能缺失导致的细胞壁合成受阻可以有效促进 L-谷氨酸的外排,并将胞内代谢更多地引向 L-谷氨酸的合成和转运,大幅提高了高温条件下 L-谷氨酸的产量。

3 讨论与结论

自 1950 年谷氨酸棒杆菌被鉴定以来,经过几十年的发展,L-谷氨酸发酵技术生产已经取得了巨大进步,同时也带动了其他氨基酸发酵技术的研究与应用。由于具有天然的 L-谷氨酸合成能力,早期谷氨酸生产菌种主要通过不断迭代诱变筛选获得。近年来,随着基因工程技术和合成生物技术的快速发展,L-谷氨酸高产机制逐步得到解析,基于新型合成生物技术的 L-谷氨酸生产菌种的创新升级也已经逐步展

开,大量新技术、新靶点在谷氨酸菌种的创建中应用并取得了良好的效果^[31-33]。相对于代谢通路的优化改造和全局调控元件的挖掘应用,产物的跨膜转运对 L-谷氨酸的高效合成同样重要。由于必须同时跨越两层膜屏障,因此细胞膜(内膜)和细胞壁(外膜)的完整性、组分构成和流动性都会影响 L-谷氨酸的转运。为了强化 L-谷氨酸跨膜转运,工业发酵过程中通常利用生物素限制、升高温度等条件改变细胞的通透性,同时,细胞膜壁结构的人工改造近年来也成为研究者关注的焦点^[34-36]。分枝菌酸作为 CMN 菌属特有的组分,与阿拉伯半乳糖和肽聚糖组成的 mAGP 复合体共同构成了 CMN 菌属复杂的细胞壁结构。该结构形成的渗透性屏障可以阻止抗生素等物质进入细胞,有利于维持菌株在复杂环境中的正常生长代谢,但同时也限制了胞内代谢物的外排^[36]。已有研究表明抑制脂肪酸、肽聚糖、海藻糖、分支菌酸的合成可以限制 CMN 细胞壁的形成,进而有效加快不同代谢产物的外排,提高目标代谢物的产量^[14,28,37]。但完全限制上述细胞膜壁组分的合成大多会严重抑制菌株生长,不利于平衡菌株的生长和代谢。CMN 菌属中天然存在但相对冗余的 CmpLs 转运系统,为谷氨酸棒杆菌代谢物转运系统的改造提供了重要靶点。本研究在 L-谷氨酸组成型分泌的谷氨酸棒杆菌中对 CmpLs 转运系统进行了改造测试,明确了 CmpL1 和 CmpL4 的敲除可以显著提高 L-谷氨酸的外排,结合温敏生产工艺的应用,SCgGC7 Δ CmpL1 和 SCgGC7 Δ CmpL4 菌株在 5 L 发酵罐中 L-谷氨酸产量分别提升了 69.2%和 23.1%,为改造谷氨酸棒杆菌的细胞膜壁结构来强化代谢产物的外排提供了新型靶点和有效策略。

本研究发现在 L-谷氨酸生产菌株中分别敲除 4 种 CmpLs 蛋白产生了不同的效果,其中

CmpL2 和 CmpL3 的敲除对菌株生长和 L-谷氨酸合成的影响都不明显, 而 CmpL1 和 CmpL4 敲除菌株则大幅提升了 L-谷氨酸的生产性能。尽管 CmpL1 敲除菌株生长受到了一定程度的抑制, 但其对 L-谷氨酸生产的提升效果优于 CmpL4 敲除菌株。进一步的代谢物组分析发现 CmpL1 敲除对菌株代谢产生的影响与 CmpL4 存在较大的差别, 主要表现为胞内前体 α -酮戊二酸和下游产物 L-脯氨酸在 CmpL1 敲除菌株中明显下降, 而 CmpL4 敲除菌株中上述物质却明显积累, 这可能直接影响了不同菌株的 L-谷氨酸生产性能。前期有研究发现谷氨酸棒杆菌中 CmpL2 和 CmpL3 单独敲除不会对细胞壁中脂质的组成产生明显影响, 但 CmpL1 和 CmpL4 在细胞壁合成过程中发挥重要的作用, 敲除菌株细胞壁中脂质组分的合成会受到明显限制, 二者同时敲除的菌株生长会受到明显的抑制, 且细胞壁中几乎检测不到含有分支菌酸的组分; 在上述菌株中单独回补 CmpL4 可以恢复 TMCM、TDCM 及游离分枝菌酸盐的平衡, 而单独回补 CmpL1 不能减少 TMCM 和游离分枝菌酸盐的积累, 但外膜中磷脂酰肌醇甘露糖苷的含量增加^[24-25]。上述研究结果说明 CmpL1 和 CmpL4 在谷氨酸棒杆菌细胞中发挥的功能并不完全相同, 这种功能上的差异可能是造成不同 CmpLs 敲除菌株 L-谷氨酸生产性能差异的主要原因, 而这种功能上的冗余和互补, 为工业菌株的稳定性改造和性能提升提供了理想的靶点。

REFERENCES

- [1] 李学朋, 陈久洲, 张东旭, 李树标, 王小平, 吕金东, 周敬, 许志颖, 郑平, 孙际宾. L-谷氨酸生产关键技术创新与产业化应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4343-4351.
LI XP, CHEN JZ, ZHANG DX, LI SB, WANG XP, LÜ JD, ZHOU J, XU ZY, ZHENG P, SUN JB. Innovation
- [2] LEE JY, NA YA, KIM E, LEE HS, KIM P. The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(5): 807-822.
- [3] 刘佳峰, 乔郅钠, 赵有玺, 徐美娟, 张显, 杨套伟, 饶志明. 理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌高效合成 L-谷氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3273-3289.
LIU JF, QIAO ZN, ZHAO YX, XU MJ, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. Rational metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient synthesis of L-glutamate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3273-3289 (in Chinese).
- [4] WANG JL, MA WJ, ZHOU JW, WANG XY. Microbial chassis design and engineering for production of amino acids used in food industry[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2023, 3(1): 28-48.
- [5] HIRASAWA T, KIM J, SHIRAI T, FURUSAWA C, SHIMIZU H. Molecular mechanisms and metabolic engineering of glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2012, 64: 261-281.
- [6] HIRASAWA T, WACHI M. Glutamate fermentation-2: mechanism of L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2017, 159: 57-72.
- [7] LEVINA N, TÖTEMEYER S, STOKES NR, LOUIS P, JONES MA, BOOTH IR. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity[J]. The EMBO Journal, 1999, 18(7): 1730-1737.
- [8] NAKAMURA J, HIRANO S, ITO H, WACHI M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4491-4498.
- [9] NAKAYAMA Y. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensing: from osmoregulation to L-glutamate secretion for the avian microbiota-gut-brain axis[J]. Microorganisms, 2021, 9(1): 201.
- [10] KLATT S, BRAMMANANTH R, O'CALLAGHAN S, KOUREMENOS KA, TULL D, CRELLIN PK, COPPEL RL, McCONVILLE MJ. Identification of novel lipid modifications and intermembrane dynamics in *Corynebacterium glutamicum* using high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Lipid Research, 2018,

- 59(7): 1190-1204.
- [11] GUTMANN M, HOISCHEN C, KRÄMER R. Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1112(1): 115-123.
- [12] HOISCHEN C, KRÄMER R. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(6): 3409-3416.
- [13] KIMURA E, YAGOSHI C, KAWAHARA Y, OHSUMI T, NAKAMATSU T, TOKUDA H. Glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum* triggered by a decrease in the level of a complex comprising DtsR and a biotin-containing subunit[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63(7): 1274-1278.
- [14] SHI T, MA Q, LIU XQ, HAO YN, LI YJ, XU QY, XIE XX, CHEN N. Double deletion of *murA* and *murB* induced temperature sensitivity in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioengineered*, 2019, 10(1): 561-573.
- [15] YAO WJ, DENG XZ, ZHONG H, LIU M, ZHENG P, SUN ZH, ZHANG Y. Double deletion of *dtsR1* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(7): 911-921.
- [16] GAO YF, HU XQ, WANG JL, LI HZ, WANG XY. Impact of mycolic acid deficiency on cells of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018, 65(3): 435-445.
- [17] HASHIMOTO KI, KAWASAKI H, AKAZAWA K, NAKAMURA J, ASAKURA Y, KUDO T, SAKURADANI E, SHIMIZU S, NAKAMATSU T. Changes in composition and content of mycolic acids in glutamate-overproducing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(1): 22-30.
- [18] GAVALDA S, BARDOU F, LAVAL F, BON C, MALAGA W, CHALUT C, GUILHOT C, MOUREY L, DAFFÉ M, QUÉMARD A. The polyketide synthase Pks13 catalyzes a novel mechanism of lipid transfer in mycobacteria[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(12): 1660-1669.
- [19] LEA-SMITH DJ, PYKE JS, TULL D, McCONVILLE MJ, COPPEL RL, CRELLIN PK. The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(15): 11000-11008.
- [20] PORTEVIN D, DE SOUSA-D'AURIA C, HOUSSIN C, GRIMALDI C, CHAMI M, DAFFÉ M, GUILHOT C. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(1): 314-319.
- [21] LI HD, XU DQ, LIU YT, TAN X, QIAO J, LI ZH, QI B, HU XQ, WANG XY. Preventing mycolic acid reduction in *Corynebacterium glutamicum* can efficiently increase L-glutamate production[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 177: 108255.
- [22] LI HD, XU DQ, TAN X, HUANG DY, HUANG Y, ZHAO GH, HU XQ, WANG XY. The role of trehalose biosynthesis on mycolate composition and L-glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbiological Research*, 2023, 267: 127260.
- [23] 李贺丹. 谷氨酸棒杆菌分枝菌酸糖脂结构改造及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- LI HD. Structural modifications of mycolate in *Corynebacterium glutamicum* and its application[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [24] VARELA C, RITTMANN D, SINGH A, KRUMBACH K, BHATT K, EGGELING L, BESRA GS, BHATT A. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(4): 498-506.
- [25] YANG L, LU S, BELARDINELLI J, HUC-CLAUSTRE E, JONES V, JACKSON M, ZGURSKAYA HI. RND transporters protect *Corynebacterium glutamicum* from antibiotics by assembling the outer membrane[J]. *MicrobiologyOpen*, 2014, 3(4): 484-496.
- [26] 郑平, 周文娟, 李广玉, 孙际宾, 蔡柠匀, 陈久洲, 王小平, 刘世周, 赵兰坤. 柠檬酸合酶启动子突变体及其应用: CN115927325A[P]. 2023-04-07.
- ZHENG P, ZHOU WJ, LI GY, SUN JB, CAI NY, CHEN JZ, WANG XP, LIU SZ, ZHAO LK. Citrate synthase promoter mutant and application thereof: CN115927325A[P]. 2023-04-07 (in Chinese).
- [27] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, KALINOWSKI J, THIERBACH G, PÜHLER A. 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.
- [28] SHI T, FAN XG, WU YS, MA Q, XU QY, XIE XX, CHEN N. Mutation of genes for cell membrane synthesis in *Corynebacterium glutamicum* causes temperature-sensitive trait and promotes L-glutamate excretion[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34: 38-47.
- [29] LEVEFAUDES M, PATIN D, de SOUSA-D'AURIA C,

- CHAMI M, BLANOT D, HERVÉ M, ARTHUR M, HOUSSIN C, MENGIN-LECREULX D. Diaminopimelic acid amidation in corynebacteriales: new insights into the role of *ltsA* in peptidoglycan modification[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(21): 13079-13094.
- [30] HIRASAWA T, WACHI M, NAGAI K. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum ltsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(10): 2696-2701.
- [31] KRUMBACH K, SONNTAG CK, EGGELING L, MARIENHAGEN J. CRISPR/Cas12a mediated genome editing to introduce amino acid substitutions into the mechanosensitive channel MscCG of *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2726-2734.
- [32] LI XF, BAO T, OSIRE T, QIAO ZN, LIU JF, ZHANG X, XU MJ, YANG TW, RAO ZM. MarR-type transcription factor RosR regulates glutamate metabolism network and promotes accumulation of L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum* G01[J]. Bioresource Technology, 2021, 342: 125945.
- [33] SUN DH, CHEN JZ, WANG Y, LI MY, RAO DM, GUO YM, CHEN N, ZHENG P, SUN JB, MA YH. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* by synthetic small regulatory RNAs[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(2): 203-208.
- [34] NIE ZH, LIU P, WANG Y, GUO X, TAN ZJ, SHEN J, TANG ZJ, LIN JP, SUN JB, ZHENG P, ZHU LL. Directed evolution and rational design of mechanosensitive channel MscCG2 for improved glutamate excretion efficiency[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(51): 15660-15669.
- [35] NAKAYAMA Y, ROHDE PR, MARTINAC B. “force-from-lipids” dependence of the MscCG mechanosensitive channel gating on anionic membranes[J]. Microorganisms, 2023, 11(1): 194.
- [36] LANÉELLE MA, TROPIS M, DAFFÉ M. Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 9923-9930.
- [37] GEBHARDT H, MENICHE X, TROPIS M, KRÄMER R, DAFFÉ M, MORBACH S. The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterineae*[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 5): 1424-1434.