



NADPH 缺陷型 *Corynebacterium glutamicum* 重组菌株的构建及其性能分析

阮浩哲¹, 刘立明^{1,2*}, 张伟国¹, 徐建中^{1*}

¹江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

²江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】改造谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中 NADPH 合成途径, 阻断胞内 NADPH 的合成, 获得 1 株 NADPH 营养缺陷型菌株。【方法】通过失活 L-赖氨酸高产菌 *C. glutamicum* Lys- χ 中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Zwf)和苹果酸酶(MalE)并将 NADP⁺依赖型异柠檬酸脱氢酶(NADP⁺-Icd_{Cg})替换成变形链球菌(*Streptococcus mutans*)中的 NAD⁺-Icd_{Sm}, 阻断胞内 NADPH 的合成。随后结合辅因子工程, 引入大肠杆菌(*Escherichia coli*)中膜结合吡啶核苷酸转氢酶(PntAB)并通过不同强度启动子控制 PntAB 的表达水平。最后, 分析不同重组菌中胞内氧化还原水平和 L-赖氨酸生产强度的变化。【结果】重组菌 *C. glutamicum* Lys- χ Δ ZMI_{Cg}::I_{Sm}(即 Lys- χ 1)胞内检测不到 NADPH, 为 1 株 NADPH 营养缺陷型菌株。该重组菌只在以葡萄糖酸为碳源的基础培养基中生长和积累 L-赖氨酸, 而以葡萄糖、丙酮酸、 α -酮戊二酸和草酰乙酸为碳源时无法生长。此外, 表达 *E. coli* 中的 PntAB 可回补重组菌 Lys- χ 1 胞内 NADPH 的水平, 但由于不同强度启动子控制 PntAB 表达水平不同, 重组菌胞内 NADPH 水平也不同, 并影响 L-赖氨酸的生产强度。【结论】重组菌 Lys- χ 1 可作为有效的底盘细胞, 用于考察不同的 NADPH 再生策略, 获得不同胞内 NADPH 水平的重组菌株, 为进一步阐明 NADPH 调控微生物细胞生理代谢功能的机制提供研究基础。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, NADPH 缺陷体, NADPH 再生, L-赖氨酸合成, 氧化还原水平, 启动子工程

辅因子 NADPH 在细胞内分布广泛, 通过参与 800 多个氧化还原反应来调节胞内氧化还原水平并影响众多基因表达、细胞功能、代谢途径、物质跨

膜运输和胞内微环境^[1]。胞内 NADPH 水平与目标代谢产物的合成之间的关系可分为以下几种类型: (1) 影响目标代谢产物产量: 提高胞内 NADPH 水

基金项目: 国家自然科学基金(31601459); 国家双一流轻工业技术与工程一级学科计划(LITE2018-08)

*通信作者。刘立明, Tel/Fax: +86-510-85197875, E-mail: mingLL@jiangnan.edu.cn; 徐建中, Tel/Fax: +86-510-85329312, E-mail: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-09-18; 修回日期: 2020-11-07; 网络出版日期: 2021-03-22

平, 能促进胞内 NADPH-依赖型产物的合成^[2-3];
(2) 影响底物转化率: 调控胞内 NADPH 水平, 能有效降低副产物积累, 提高原料的转化率^[4]; (3) 影响目标代谢产物生产强度: 增加胞内 NADPH 供给, 满足中心碳代谢途径中关键酶对 NADPH 的需求, 可实现目标产物高强度的生产^[5]; (4) 拓宽底物利用范围: 促进胞内 NADPH 的再生, 可提高菌体对糖蜜、羧基化合物等的利用^[6-7]; (5) 影响胞内微环境: 改变 NADPH 水平会影响胞内 NAD(H⁺)状态和 ATP 含量, 可调节胞内 pH (pH_i)和活性氧簇(ROS)的形成, 提高细胞对酸胁迫和氧胁迫的适应力^[8-10]。因此, 对胞内 NADPH 水平的调控是菌种改造和发酵过程优化需考虑的一个重要指标。

胞内 NADPH 水平的调控策略可分为外源调控和内源调控。外源调控是指采用生化工程的方法, 通过添加外源电子受体^[8]、不同还原态碳源和 NADP⁺前体物^[11], 改变溶氧^[12]等实现对 NADPH 代谢的调控; 而内源调控是基于细胞内 NADPH 合成与代谢的途径, 通过代谢工程策略调节与 NADP(H⁺)代谢相关途径或酶活性。目前, 内源调控是调节胞内 NADPH 水平的常用策略, 具体思路可分为以下几个方面: (1) 调控磷酸戊糖(PP)途径: PP 途径是多数微生物中主要的 NADPH 供给途径, 由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Zwf, 编码基因 *zwf*)和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(Gnd, 编码基因 *gnd*)催化合成^[1,13]; (2) 调控糖酵解(EMP)途径: 将菌体内源的 NAD⁺-依赖型甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NAD⁺-GADPH)换成 NADP⁺-GAPDH, 可显著增加胞内 NADPH 水平, 促进目标产物的合成^[5,14]; (3) 调控三羧酸循环(TCA)途径: 敲除琥珀酰-CoA 合成酶, 扰乱正常的 TCA, 强化流经苹果酸酶(MalE, 编码基因 *malE*)的碳通量, 可增加胞内 NADPH 的水平^[15]; (4) 调控转氢酶循环途径: 调

节 *E. coli* 中由膜结合吡啶核苷酸转氢酶 PntAB (或 mTH, 编码基因 *pntAB*)或可溶性吡啶核苷酸转氢酶 UdhA (或 sTH)组成的转氢酶循环途径, 调控 NAD(H⁺)与 NADP(H⁺)的相互转化水平, 从而实现调节胞内 NADPH 水平^[16]。*C. glutamicum* 没有转氢酶循环途径, 只有由丙酮酸/磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、MalE 和苹果酸脱氢酶组成的类似转氢酶循环(transhydrogenase-like cycle)途径, MalE 可将 NADH 转化为 NADPH, 提高胞内 NADPH 供给水平, 促进目的产物的合成^[17]。虽然上述代谢改造取得了比较显著的成果, 但还存在以下不足: 辅因子 NADPH 调控微生物细胞生理代谢功能的机制还不清晰, 进而难以通过控制胞内 NADPH 水平实现目标产物合成途径的精细化调控。

本研究旨在通过阻断 *C. glutamicum* 胞内所有参与 NADPH 合成途径(图 1), 构建 1 株 NADPH 缺陷型的重组菌株。该菌株可以作为有效的底盘细胞, 用于比较不同的 NADPH 再生策略, 进而可以直接筛选具有不同 NADPH 再生率的氧化还原酶, 获得不同胞内 NADPH 水平的重组菌株, 实现精确调控胞内 NADPH 的水平, 为进一步阐明 NADPH 调控微生物细胞生理代谢功能的机制提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

D-葡萄糖酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸和草酰乙酸购自国药集团化学试剂有限公司。胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司。质粒提取试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker 和蛋白质 Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。各种限制性内切酶购自美国 ThermoFisher Scientific 公司。

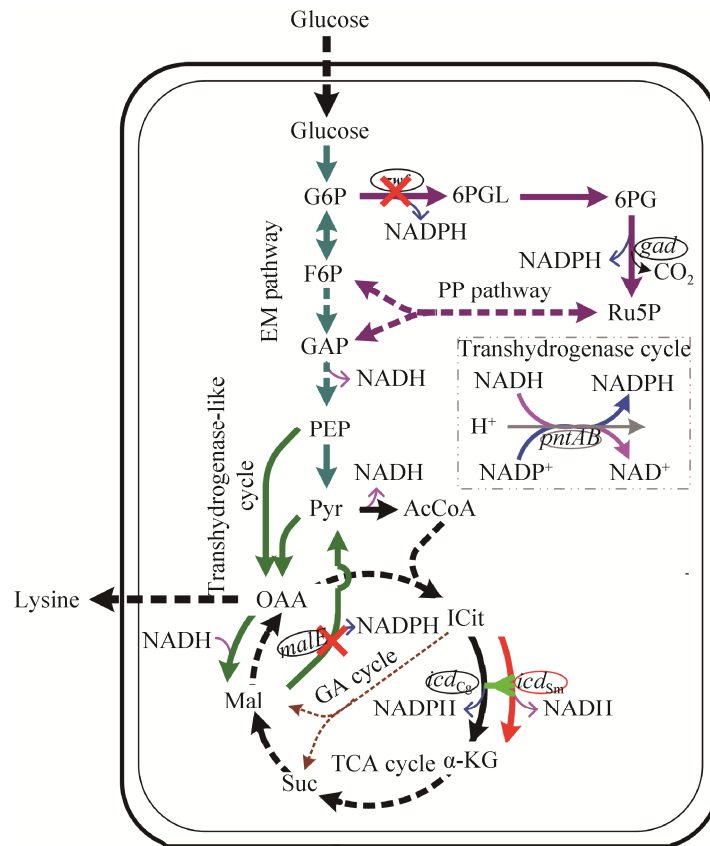


图 1. NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* 重组菌株的构建策略

Figure 1. Schematic representation of the NADPH auxotrophic *C. glutamicum*. NADPH and NADH metabolic pathway are shown in blue arrows and pink arrows, respectively. The red arrow and grey arrow represent the extrinsic routes. \times : the deletion; \leftarrow : the replacement. G6P: glucose-6-phosphate; 6PGL: 6-phosphogluconolactone; 6PG: 6-phosphogluconate; Ru5P: ribulose-5-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; Pyr: pyruvate; AcCoA: acetyl-CoA; ICit: isocitrate; α -KG: α -ketoglutarate; Suc: succinate; Mal: malate; OAA: oxaloacetate.

1.2 菌株、质粒与引物

实验过程中涉及的菌株、质粒和引物如表 1 所示，其中引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.3 培养条件与培养基

37 °C、100 r/min 培养 *Escherichia coli*, 30 °C、100 r/min 培养 *C. glutamicum*。在特定条件下，添加 50 μ g/mL 或加 25 μ g/mL 卡那霉素(Kan)用于筛选 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 重组菌株。

Luria-Bertani (LB)培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0。LBG 培养基: LB 培养基添加 5 g/L 葡萄糖。Epo 培养基: LBG 培养基添加 30 g/L 甘氨酸, 4 g/L 异烟肼和 1 g/L 吐温-80。LBHIS 培养基: LB 培养基添加 91 g/L 山梨醇和 18.5 g/L 脑心浸出液。CgXII 培养基(g/L): 3-(N-吗啡啉)-丙磺酸 42, (NH₄)₂SO₄ 20, 尿素 5, KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄·3H₂O 1, MgSO₄·7H₂O 0.25, CaCl₂ 0.01, FeSO₄·7H₂O 0.01, MnSO₄·H₂O 0.01, ZnSO₄·7H₂O 0.01, NiCl₂·6H₂O 0.0002, 生物素

0.0002, 原儿茶酸 0.00003。所有培养基利用 20% (M/V) NaOH 调节至 pH 7.0, 并于 121 °C 灭菌 20 min。

1.4 质粒和菌株方法

1.4.1 基因敲除质粒 pK18mobsacB-Δzwf、pK18mobsacB-ΔmalE、pK18mobsacB-Δicd_{Cg} 和

pK18mobsacB-Δicd_{Cg}::icd_{Sm} 的构建: 基因敲除质粒 pK18mobsacB-Δzwf、pK18mobsacB-ΔmalE、pK18mobsacB-Δicd_{Cg} 和 pK18mobsacB-Δicd_{Cg}::icd_{Sm} 构建流程如图 2 所示, 具体构建方法参照杨汉昆等建立的方法进行^[18]。

表 1. 本研究所用到的主要菌种、质粒和引物

Table 1. The main strains, plasmids and primer pairs used in this study

<i>C. glutamicum</i> strains and plasmids	Characters	References
Strains		
Lys- χ	L-lysine high-producing strain derived from <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 by multiple rounds of random mutagenesis	Our Lab
Lys- χ ΔZ	Deletion of genes <i>zwf</i> in strain Lys- χ chromosome	This study
Lys- χ ΔZM	Deletion of genes <i>zwf</i> and <i>malE</i> in strain Lys- χ chromosome	This study
Lys- χ ΔZMI_{Cg}	Deletion of genes <i>zwf</i> , <i>malE</i> and <i>icd_{Cg}</i> in strain Lys- χ chromosome	This study
Lys- χ ΔZMI_{Cg} :: <i>I</i> _{Sm} , <i>i.e.</i> , Lys- χ 1	Replacement of the natural <i>icd_{Cg}</i> gene with the <i>P_{tac}-icd_{Sm}-rrnBT1T2</i> cassette in strain Lys- χ ΔZM chromosome	This study
Lys- χ 1/ <i>P_X-pntAB</i>	Overexpression of <i>E. coli pntAB</i> under the promoter <i>P_X</i> in strain Lys- χ 1 (<i>P_X</i> represents a series of promoters with different transcriptional activity, and the promoters used in this study are listed in Table 2)	This study
Plasmids		
pK18mobsacB	Integration vector	Stratagene
pEC-XK99E	Overexpression plasmid with Kan resistance and promoter <i>P_{trc}</i>	Stratagene
pK18mobsacB/ Δzwf	Integration vector for deletion of <i>zwf</i>	[18]
pK18mobsacB/ $\Delta malE$	Integration vector for deletion of <i>malE</i>	[18]
pK18mobsacB/ Δicd_{Cg}	Integration vector for deletion of <i>icd_{Cg}</i>	[18]
pK18mobsacB/ Δicd_{Cg} :: <i>icd_{Sm}</i>	Integration vector for replacement of the <i>icd_{Cg}</i> gene by the <i>P_{tac}-icd_{Sm}-rrnBT1T2</i> cassette	[18]
pEC ^M	Deletion of <i>lacI^d</i> in plasmid pEC-XK99E	This study
<i>P_{trc}-pntAB-gfp</i>	Overexpression plasmid derived from pEC ^M	This study
<i>P_X-pntAB-gfp</i>	Overexpression plasmid derived from pEC ^M , the promoter <i>P_{trc}</i> was replaced by promoter <i>P_X</i>	This study
Primer pairs		
<i>Zwf-F</i>	GTGAGCACAACACGAC	PCR verification of genes <i>zwf</i> , <i>malE</i> , <i>icd_{Cg}</i> and <i>icd_{Sm}</i>
<i>Zwf-R</i>	TTATGGCCTGCGCCAGGTGTG	
<i>MalE-F</i>	GCGTTCCACCCAAAACCT	
<i>MalE-R</i>	TGGACAGCTGCCTTGACT	
<i>Icd_{Cg}-F</i>	TTACTTCTTCAGTGCG	
<i>Icd_{Cg}-R</i>	ATGGCTAAGATCATCTG	
<i>Icd_{Sm}-F</i>	TGCCTGATAAGCCCGTT	
<i>Icd_{Sm}-R</i>	CAGAAAACCTGACGGGTT	

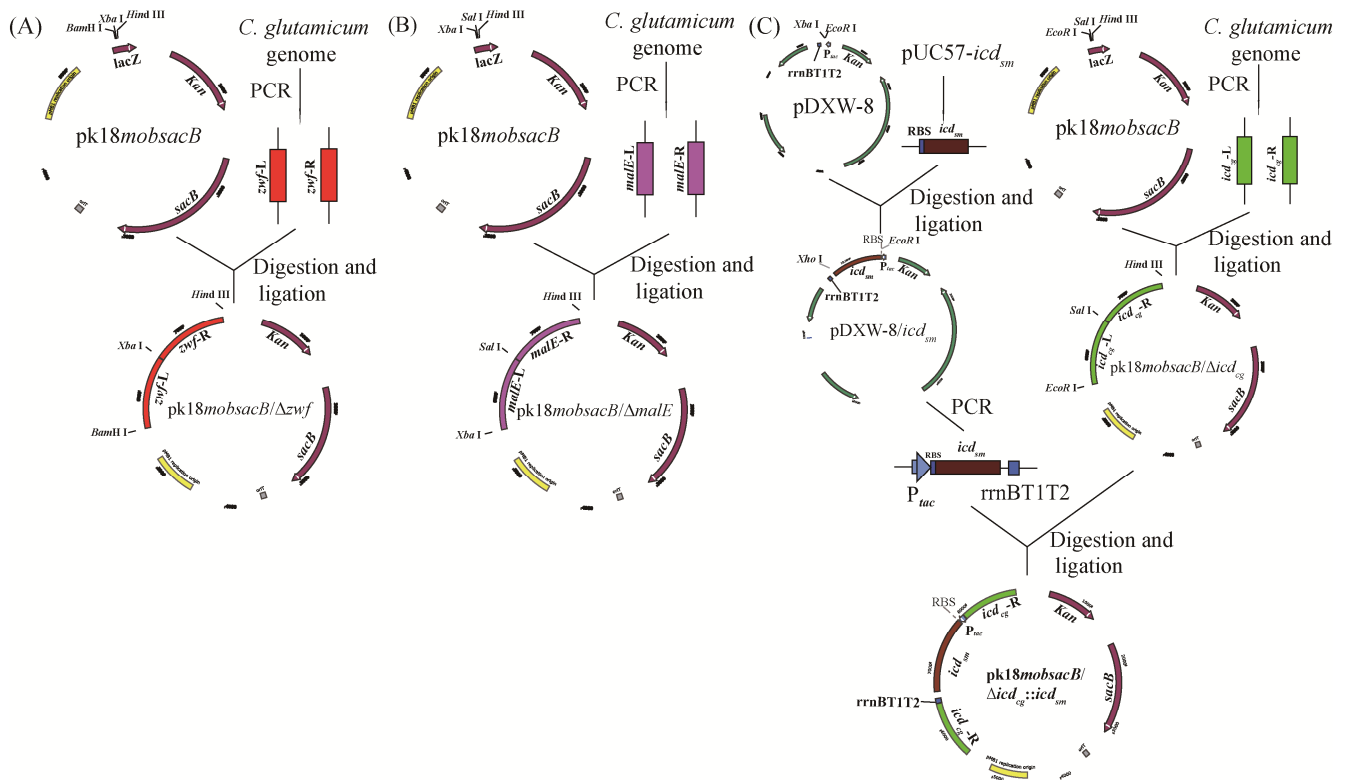


图2. 构建 pK18mobsacB- Δ zwf (A)、pK18mobsacB- Δ malE (B)、pK18mobsacB- Δ icd_{Cg} 和 pK18mobsacB- Δ icd_{Cg}::icd_{Sm} (C)
 Figure 2. The process of construction of pK18mobsacB- Δ zwf (A), pK18mobsacB- Δ malE (B), pK18mobsacB- Δ icd_{Cg} and pK18mobsacB- Δ icd_{Cg}::icd_{Sm} (C).

1.4.2 基因表达质粒 P_X-pntAB-gfp 的构建: 根据 National Center for Biotechnology Information 中 *E. coli* MG1655 全基因组序列的 PntAB 基因序列设计引物(即 pntAB-F: 5'-CCGGAATTCGAAAGGAGATATACCATGCGAATTGGCATAACCAA-3'; pntAB-R: 5'-CGTGAGCTCTTACAGAGCTTTCAG-3')。以 *E. coli* MG1655 基因组为模板, pntAB-F/pntAB-R 为引物进行 PCR 获得 pntAB 基因片段。随后, 采用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sac* I 酶切质粒 pEC^M 和 pntAB 基因片段, 胶回收后于 22 °C 过夜酶连, 经 Kan 抗性平板筛选和基因测序验证获得重组表达质

粒 pEC^M-pntAB (即 P_{trc}-pntAB)。随后, 根据来源于 *Aequorea victoria* 的绿色荧光蛋白(GFP, 编码基因 *gfp*)氨基酸序列经密码子优化后, 在其编码基因上游加入 *C. glutamicum* SD 识别序列并通过基因合成的方法连接到重组表达质粒 P_{trc}-pntAB 中, 从而获得目的重组质粒 P_{trc}-pntAB-gfp。为了获得不同 pntAB 基因表达强度的重组质粒, 本实验选择将质粒 pEC^M 中的 *trc* 启动子通过融合 PCR 的方式替换成不同强度的启动子, 从而获得重组表达质粒 P_X-pntAB-gfp。本实验所选用的启动子序列如表 2 所示, 其核苷酸序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 2. 本研究所用到的启动子
Table 2. The promoters used in this study

Promoters	Sequences (5'→3')	References
P _{lac}	TTTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG	[19]
P _{trp}	TGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTAACTAGTACGCA	
P _{lac}	TGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT	
P _{lacM}	TGAGCTGTTGACAATTAATCATCGTGTGGTACCATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT	
P _{kan}	CCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAA	
P _{PF104}	CAGCGTATTTGACCGATCCGGACACCTGGGATAATGTGTGGATTTGTCGG	
P _{lacM}	TGAGCTGTTTACAATTAATCATCGTGTGGTACCATGTGTGGAATTG	[20]
P _{trc}	TTGACAATTAATCATCCGGCTCGTAATG	
P _{sod}	AGCGGTAACCATCACGGTTCGGGTGCGAAAAACCATGCCATAACAGGAATGTTTCCTTTCGAAA ATTGAGGAAGCCTTATGCCCTACAACCCTACTTAGCTGCCAATTATTCGGGGCTTGTGACCCGCT ACCAATAAATAGGTGGGCTGAAAAATTCGTTGCAATATCAACAAAAAGGCCTATCATTGGGAA GTGTGCGACCAAGTACTTTTTCGAAGCGCCATCTGACGGATTTTCAAAGATGTATATGCTCGGT GCGGAAACCTACGAAAGGATTTTTTACCC	
P _{tuf}	TGGCCGTTACCTGCGAATGTCCACAGGGTAGCTGGTAGTTGAAAATCAACGCCGTTGCCCTTAG GATTCAGTAACTGGCACATTTGTAATGCGCTAGATCTGTGTGCTCAGTCTTCCAGGCTGCTTATCA CAGTGAAAGCAAACCAATTCGTGGCTGCGAAAGTCGTAGCCACCACGAAGTCCAGGAGGACAT ACA	
P _{gro}	AGTTTGGCTGCCATGTGAATTTTTAGCACCCCTCAACAGTTGAGTGCTGGCACTCTCGGGGGTAG AGTGCCAAATAGGTTGTTTGACACACAGTTGTTACCCGCGACGACGGCTGTGCTGGAAACCC ACAACCGGCACACAAAAATTTTTCTCAT	[21]
P _{pfk}	TGGGTGATTGTTCCGGCGCGGGTGTGTGATGGGTTTAATATGGAAGACA	[22]
P _{gapB}	GCAGATACTGGAATCATTAAACACCTTCCGCTTTGGGCTAATGTTGGGGGG	[22]
P _{gapA}	GAATCCGCTGCAAAATCTTTGTTTCCCCGCTAAAGTTGGGGAC	
P _{pgk}	ACCCCGGGCTATTTTGTGTCTTTAATCAATACAATTGAATACCG	
P _{gpm}	TTTGCCGATCTCGTGCGCAGAATTGCTTTTGAGGGAAAGATGGAGGAGA	
P _{eno}	TTTCAACTGATTGCCTCATCGAAACAAGATTCGTGCAACAATTGGGTGTA	
P _{pck}	ACCTAAAGTTTTAACTAGTTCTGTATCTGAAAGCTACGCTAGGGGGCG	
P _{malE}	CATTGCGAAATTTTTGTTGAGCTACATATTTAGCTAGTGTTTTTGTTCCA	
P _{dapA}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGTAACCTTGAACCTCTA	[23]
P _{dapA-P4}	TAGGTTATTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGTAACCTTGAACCTCTA	
P _{dapA-R2}	TAGGTTCCCTCCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGTAACCTTGAACCTCTA	
P _{dapA-A16}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGTAATAATTGAACCTCTA	
P _{dapA-A45}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGTAATAATTGAACCTCTA	
P _{dapA-B6}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGCAACCATGAACCTCTA	
P _{dapA-B27}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGAAACCATGAACCTCTA	
P _{dapA-B31}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGAAACCGTGAACCTCTA	
P _{dapA-C2}	TAGGTTTTTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGATCGTAACCTTGAACCTCTA	
P _{dapA-C13}	TAGGTTATTTGCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGAAGGTAACCTTGAACCTCTA	
P _{dapA-C20}	TAGGTTCCCTCCGGGGTTGTTAACCCCAAATGAGGGAAGATGGTAACCTTGAACCTCTA	
P _{H30}	CAAAAGCTGGGTACCAAAGTAACCTTTTCGGTTAAGGTAGCGCATTCTGGTGCCCGTGGCCCG GTTGGTTGGGCAGGAGTATATTGGGATCCA	[24]
P _{H36}	CAAAAGCTGGGTACCTCTATCTGGTGCCCTAAACGGGGGAATATTAACGGGCCAGGGTGGTC GCACCTTGGTTGGTAGGAGTAGCATGGGATCCA	

1.4.3 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* 重组菌株的构建：依次将上述重组质粒 pK18*mobsacB*- Δ *zwf*、pK18*mobsacB*- Δ *malE*、pK18*mobsacB*- Δ *icd*_{Cg} 和 pK18*mobsacB*- Δ *icd*_{Cg}::*icd*_{Sm} 电转至 *C. glutamicum* Lys- γ 感受态细胞中，并筛选出目标重组菌株 *C. glutamicum* Lys- γ Δ *zwf* (即 Lys- γ Δ Z)、*C. glutamicum* Lys- γ Δ *zwf* Δ *malE* (即 Lys- γ Δ ZM)、*C. glutamicum* Lys- γ Δ *zwf* Δ *malE* Δ *icd*_{Cg} (即 Lys- γ Δ ZMI_{Cg}) 和 *C. glutamicum* Lys- γ Δ *zwf* Δ *malE* Δ *icd*_{Cg}::*icd*_{Sm} (即 Lys- γ Δ ZMI_{Cg}::I_{Sm} 或 Lys- γ 1)。目标重组菌株的具体筛选方法参照 Wang 等提出的方法进行^[25]。

1.4.4 NADPH 回补型 *C. glutamicum* 重组菌株的构建：依次将上述重组基因表达质粒 P_X-*pntAB-gfp* 电转至 *C. glutamicum* Lys- γ 1 感受态细胞中，并筛选出目标重组菌株 *C. glutamicum* Lys- γ 1/P_X-*pntAB-gfp* (即 Lys- γ 1/P_X-*pntAB-gfp*)。目标重组菌株的具体筛选方法参照 Xu 等提出的方法进行^[6]。

1.5 分析方法

1.5.1 NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 的检测和 NAD(P)H/NAD(P)⁺ 的计算：采用超声破碎法破碎细胞后，以酸性抽提液(0.5 mol/L HCl)提取氧化型吡啶核苷酸(NAD⁺和 NADP⁺)，以碱性抽提液(0.5 mol/L NaOH)提取还原型吡啶核苷酸(NADH和 NADPH)。随后，借助从 BioVision 公司购置的定量分析试剂盒，利用酶循环法测定 NAD(P)⁺和 NAD(P)H 的浓度并计算 NADH/NAD⁺和 NADPH/NADP⁺，其中以 NAD/NADH Quantification Colorimetric Kit 特异性检测 NAD⁺和 NADH，以 NADP/NADPH Quantification Colorimetric Kit 特异性检测 NADP⁺和 NADPH，具体步骤参照试剂盒说明书和我们前期建立的方

法进行^[6]。

1.5.2 绿色荧光蛋白(GFP)表达强度检测：将活化好的种子转接到 10 mL LBG 液体培养基中培养 10–12 h，吸取一定量的培养液 4 °C 离心收集菌体。然后用磷酸盐(PBS)缓冲液(pH 7.4)清洗 3 遍收集菌体，并利用一定量的 PBS 缓冲液(pH 7.4)重悬菌体。最后，采用荧光激活细胞分选仪(Beckman Coulter, Inc., CA, USA)分析菌体绿色荧光强度，具体分析方法参考 Yim 等建立的方法进行^[24]。

1.5.3 菌体生长情况的分析：将发酵液离心 10 min (12000 r/min)，然后用 dd H₂O 洗涤离心菌体 3 次，将菌体置于 105 °C 烘干至恒重，最后计算并得到在本实验条件下 *C. glutamicum* OD₅₆₂ 与 DCW (g/L) 的关系。将定时取样的发酵液用 0.25 mol/L 的稀盐酸溶液稀释 26 倍后，用紫外分光光度计测定 OD₅₆₂，具体测定方法参照杨汉昆等建立的方法进行^[18]。

1.5.4 葡萄糖含量及 L-赖氨酸浓度的测定：发酵液离心 5 min (4 °C, 12000 r/min)后取上清并将其稀释 100 倍，通过生物传感分析仪 SBA-40C 测定发酵液中残留的葡萄糖含量(进样量 25 μ L)和 L-赖氨酸浓度，具体测定方法参照杨汉昆等建立的方法^[18]。

2 结果和分析

2.1 目的重组菌株的筛选与鉴定

参照“材料和方法”中的方法，依次将目的重组质粒 pK18*mobsacB*- Δ *zwf*、pK18*mobsacB*- Δ *malE*、pK18*mobsacB*- Δ *icd*_{Cg} 和 pK18*mobsacB*- Δ *icd*_{Cg}::*icd*_{Sm} 电转至 *C. glutamicum* Lys- γ 感受态细胞中，通过二次同源重组筛选出目标重组菌株。经过 PCR 验证，确定目标重组菌株(图 3)。从图 3 可知，重组

菌 $Lys-\chi \Delta Z$ 、 $Lys-\chi \Delta ZM$ 和 $Lys-\chi \Delta ZMI_{Cg}$ 中编码基因 zwf 、 $malE$ 和 icd_{Cg} 都有缺失, 而在重组菌 $Lys-\chi \Delta ZMI_{Cg}::I_{Sm}$ 中也存在来源于 *S. mutans* 的 icd_{Sm} 基因。这些结果表明, 本研究所筛选的重组菌株为目的重组菌株。目的重组菌株的筛选与鉴定方法参照杨汉昆等建立的方法进行^[18]。

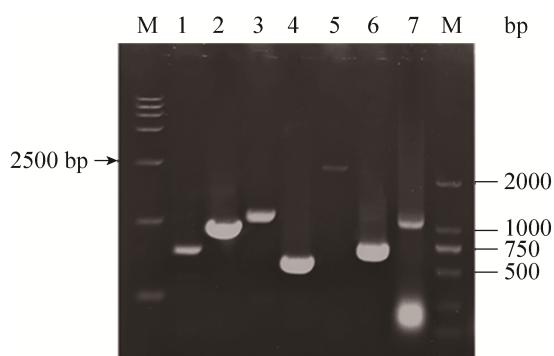


图 3. 目标重组菌株 PCR 验证

Figure 3. PCR analysis of the target recombinant strains. Lane 1, lane 2: the comparison between original and knock-out of gene zwf . Lane 3, lane 4: the comparison between original and knock-out of gene $malE$. Lane 5, lane 6: the comparison between original and knock-out of gene icd_{Cg} . Lane 7: the gene icd_{Sm} .

2.2 改造 Zwf 影响菌体生长且显著影响 L-赖氨酸合成

Zwf 是 PP 途径中第一个限速酶, 以 $NADP^+$ 为辅因子催化葡萄糖-6-磷酸形成 6-磷酸葡萄糖酸内酯和 $NADPH$ (图 1)。为了构建 $NADPH$ 营养缺陷型菌株, 本研究首先选择失活 Zwf , 获得重组菌株 *C. glutamicum* $Lys-\chi \Delta Z$ 。摇瓶发酵出发菌株 $Lys-\chi$ 和重组菌株 $Lys-\chi \Delta Z$, 发酵期间定时取样测定发酵液中菌体量。结果表明, 重组菌株 $Lys-\chi \Delta Z$ 表现出与出发菌株 $Lys-\chi$ 较差的菌体生长性能(图 4-A, B)。然而, 与出发菌株 $Lys-\chi$ 相比, 重组菌株 $Lys-\chi \Delta Z$ 中 L-赖氨酸产量显著下降(即 1.8 ± 0.4 g/L), 仅为出发菌株 $Lys-\chi$ 的 9.1%, 且单位菌体量下 L-赖氨酸产量也显著降低[2.05 vs. 0.23 (g L-赖氨酸/g 菌体)](图 4-C)。有趣的是, 当以葡萄糖酸为底物时, 重组菌株 $Lys-\chi \Delta Z$ 中 L-赖氨酸产量能够显著提高, 达到 15.4 ± 1.3 g/L, 为出发菌株 $Lys-\chi$ 的 78.2%。然而, 当以其他有机酸(如丙酮酸、 α -酮戊二酸或草酰乙酸)为底物时(添加量与葡萄糖中“C”含量相当), L-赖氨酸产量并没有增加, 甚至会降低 L-赖氨酸产量(图 4-C)。

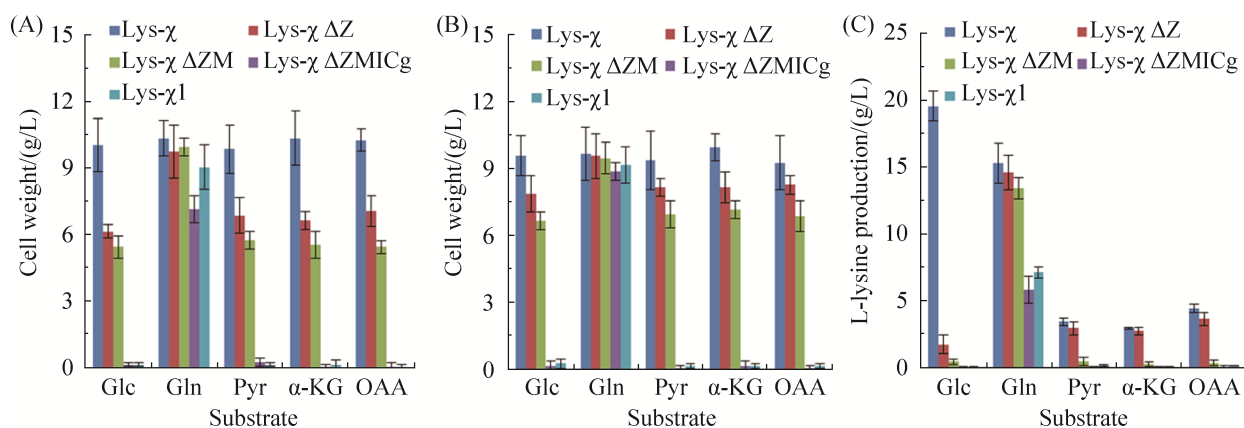


图 4. 不同重组菌株在不同碳源下菌体生长和 L-赖氨酸发酵情况

Figure 4. The cell growth at 24 h (A) and at 48 h (B) as well as the L-lysine production at 48 h (C) of different recombinant strains under the different carbone source. Glc: glucose; Gln: gluconate; Pyr: pyruvate; α -KG: α -ketoglutarate; OAA: oxaloacetate.

为了确定出发菌株 Lys- χ 经过改造后是否改变了胞内 NADPH 水平, 本文对出发菌株和重组菌株摇瓶发酵中期(即 24 h 后)胞内吡啶核苷酸进行了含量测定, 具体数据如表 3 所示。从表 3 可以看出, 重组菌株 Lys- χ Δ Z 胞内 NADPH 水平从出发菌株 Lys- χ 的 4.18×10^{-4} nmol/(10^4 细胞)下降到 1.03×10^{-4} nmol/(10^4 细胞), 胞内 NADPH/NADP⁺降低了 32.1%。值得指出的是, 重组菌株 Lys- χ Δ Z 胞内另一种吡啶核苷酸(即 NADH)相比出发菌株 Lys- χ 有显著的提高, 从 1.75×10^{-4} nmol/(10^4 细胞)提高到 2.34×10^{-4} nmol/(10^4 细胞), 胞内 NADH/NAD⁺升高了 33.7% (表 3)。

2.3 协同改造 Zwf、MalE 和异柠檬酸脱氢酶(Icd)显著影响菌体生长和 L-赖氨酸合成

C. glutamicum 中除 PP 途径中 Zwf 和 Gnd 参与 NADPH 合成外, 还有类似转氢酶循环途径中 MalE 和 TCA 循环中的 Icd 也参与 NADPH 的合成(图 1)^[17]。为了进一步控制胞内 NADPH 的合成, 本实验继续失活 MalE 和 Icd。以葡萄糖为碳源时, 在失活 Zwf 基础上继续失活 MalE (即获得重组菌株 Lys- χ Δ ZM)对菌体生长影响不显著, 但是在失活 Zwf 和 MalE 基础上继续失活 Icd (即获得重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg})菌体生长抑制明显(图 4-A, B)。需要指出的是, 当以葡萄糖酸为碳源时, 协同改造 Zwf、MalE 和 Icd 对菌体生长影响较小, 而以其

他有机酸(如丙酮酸、 α -酮戊二酸和草酰乙酸)为碳源时, 菌体生长受到显著影响(图 4-A)。此外, 本研究发现将来源于变形链球菌(*S. mutans*)中的 NAD⁺-Icd 基因(*icd_{sm}*)替换 *C. glutamicum* 自身 NADP⁺-Icd 基因(*icd_{Cg}*)获得重组菌株 Lys- χ 1, 该重组菌株 Lys- χ 1 在所有测试碳源中菌体生长都要优于重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg}(图 4-A, B)。在 L-赖氨酸合成方面, 以葡萄糖或其他有机酸(如丙酮酸、 α -酮戊二酸和草酰乙酸)为碳源时, 重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg} 和 Lys- χ 1 发酵液中检测不到 L-赖氨酸的积累(图 4-C)。以葡萄糖酸为碳源时, 重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg} [(5.9 \pm 1.0) g/L]和 Lys- χ 1 [(7.2 \pm 0.4) g/L]中 L-赖氨酸产量有明显提高, 但仍低于出发菌株 Lys- χ [(15.4 \pm 1.4) g/L] (图 4-C)。进一步分析重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg} 和 Lys- χ 1 胞内吡啶核苷酸含量时发现, 在重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg} 和 Lys- χ 1 胞内检测不到 NADPH (表 3)。值得指出的是, 当失活 NADP⁺-Icd 时胞内 NADH 水平和 NADH/NAD⁺比例显著下降, 而将 NADP⁺-Icd 替换成 NAD⁺-Icd 可显著提高胞内 NADH 水平和 NADH/NAD⁺比例(表 3)。

综上所述, 重组菌株 Lys- χ Δ ZMI_{Cg} 和 Lys- χ 1 胞内都不积累 NADPH, 都是 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* 重组菌株。考虑到重组菌株 Lys- χ 1 在菌体生长性能和 L-赖氨酸发酵水平都要优于

表 3. 重组菌和出发菌胞内吡啶核苷酸(NAD⁺、NADH、NADP⁺和 NADPH)含量

Table 3. Contents of intracellular NAD⁺, NADH, NADP⁺ and NADPH in recombinant and original bacteria

<i>C. glutamicum</i>	NADPH ^a	NADP ⁺ ^a	NADPH/NADP ⁺	NADH ^a	NAD ⁺ ^a	NADH/NAD ⁺
Lys- χ	4.18	3.72	1.12	1.75	7.03	0.25
Lys- χ Δ Z	1.03	1.45	0.71	2.34	6.12	0.38
Lys- χ Δ ZM	0.82	1.47	0.56	2.37	6.05	0.39
Lys- χ Δ ZMI _{Cg}	ND	1.22	–	1.62	7.04	0.23
Lys- χ 1	ND	1.25	–	2.93	5.66	0.52

^a: the unit is 10^{-4} nmol/(10^4 cell); ND: not detected; –: no computed data.

Lys- χ Δ ZMI_{Cg}, 故本实验选择重组菌株 Lys- χ 1 作为本研究的 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* 重组菌株并进行下一步研究。

2.4 不同强度启动子控制 PntAB 调节 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* Lys- χ 1 中胞内 NADPH 的补给

从图 4 可知, NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* Lys- χ 1 的菌株生长和 L-赖氨酸合成都显著受到抑制, 本研究推测可能是因为重组菌 Lys- χ 1 胞内无法合成 NADPH 而破坏了菌体的正常代谢功能。为了证实上述推测, 本实验通过采用不同强度启动子来控制来源于 *E. coli* 的 PntAB 在重组菌 Lys- χ 1 胞内的表达水平, 并分析不同重组菌株中胞内 NADP(H⁺) 和 NAD(H⁺) 水平。根据文献报道, 本实验选择了 32 种不同强度的启动子(表 2)。为了进一步考查所选择的 32 种启动子在 *C. glutamicum* 中的表达强度, 本实验将构建好的重组表达质粒 P_X-pntAB-gfp 电转

至重组菌 Lys- χ 1 中, 通过分析不同重组菌株中绿色荧光强度来比较不同启动子的活力。根据相对荧光强度, 32 种启动子分成 5 类, 即超弱启动子(5 种)、弱启动子(5 种)、中等启动子(7 种)、强启动子(9 种)和超强启动子(6 种)(图 5)。

由于 PntAB 和 GFP 都是在同一启动子下控制表达, 因此理论上 PntAB 在不同启动子下也具有不同的转录水平, 从而调控胞内不同的 NADPH 水平。为此, 本实验分析了不同重组菌株中胞内 NADP(H⁺) 和 NAD(H⁺) 水平。从表 4 可知, 除了携带有启动子 P_{dapA-B6} 和 P_{dapA-C2} 控制的表达质粒外, 携带有其余 30 种启动子控制的表达质粒的重组菌株都能恢复胞内 NADPH 的积累, 同时改变胞内 NAD(H⁺) 水平。此外, 启动子的强弱、荧光强度和胞内 NADPH 水平三者呈线性关系, 即不同强度的启动子控制的表达质粒因 PntAB 表

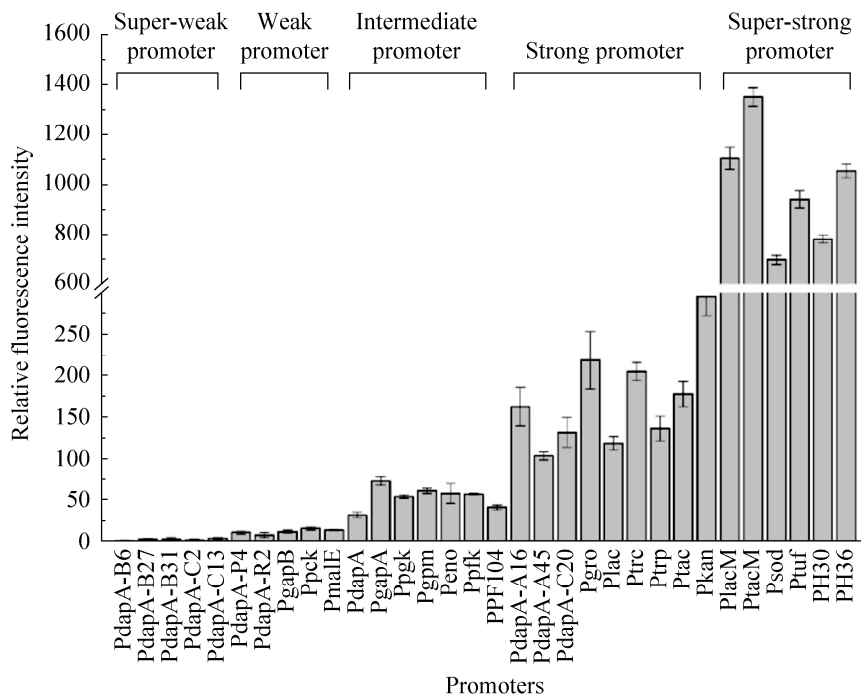


图 5. 不同启动子的转录强度分析

Figure 5. Promoter strength analysis of different promoters by flow cytometry.

达水平不同, 重组菌株中胞内 NADPH 积累水平也不同, 具体表现为携带有超强启动子控制的表达质粒的重组菌株胞内 NADPH 水平最高[如重组菌 *Lys- χ 1/P_{tacM}-pntAB-gfp* 胞内 NADPH 水平为 19.34×10^{-4} nmol/(10^4 细胞)], 而携带有超弱启动

子控制的表达质粒的重组菌株胞内 NADPH 水平最低[如重组菌 *Lys- χ 1/P_{dapA-B27}-pntAB-gfp* 胞内 NADPH 水平为 0.28×10^{-4} nmol/(10^4 细胞)](表 4)。需要指出的是, 伴随着重组菌胞内 NADPH 水平的升高, 胞内 NADH 水平则逐渐降低(表 4)。

表 4. 重组菌胞内 NADP(H⁺)和 NAD(H⁺)含量、菌体量和 L-赖氨酸产量^a

Table 4. Contents of the intracellular NADP(H⁺) and NAD(H⁺), cell weight as well as L-lysine production in recombinants^a

<i>C. glutamicum</i>	NADPH ^b	NADP ⁺ ^b	NADH ^b	NAD ⁺ ^b	Cell weight ^c	L-lysine ^c
<i>Lys-χ1</i>	ND	1.25	2.93	5.66	0.3±0.1	ND
<i>Lys-χ1/P_{dapA-B6}-pntAB-gfp</i>	ND	1.32	2.92	5.62	0.5±0.2	ND
<i>Lys-χ1/P_{dapA-B27}-pntAB-gfp</i>	0.28	1.41	2.84	5.68	4±0.2	ND
<i>Lys-χ1/P_{dapA-B31}-pntAB-gfp</i>	0.32	1.54	2.81	5.68	4.5±0.1	ND
<i>Lys-χ1/P_{dapA-C2}-pntAB-gfp</i>	ND	1.28	2.93	5.77	0.6±0.2	ND
<i>Lys-χ1/P_{dapA-C13}-pntAB-gfp</i>	0.35	1.56	2.79	5.69	4.7±0.5	ND
<i>Lys-χ1/P_{dapA-P4}-pntAB-gfp</i>	0.75	1.70	2.69	6.03	7.4±0.4	0.3±0.3
<i>Lys-χ1/P_{dapAR2}-pntAB-gfp</i>	0.58	1.63	2.74	5.82	7.3±0.5	ND
<i>Lys-χ1/P_{gapB}-pntAB-gfp</i>	0.83	1.49	2.66	6.05	6.7±0.8	0.5±0.2
<i>Lys-χ1/P_{pck}-pntAB-gfp</i>	1.02	1.45	2.53	6.3	7.9±0.5	1.8±0.1
<i>Lys-χ1/P_{malE}-pntAB-gfp</i>	0.93	1.55	2.6	6.16	7.7±0.3	1±0.3
<i>Lys-χ1/P_{dapA}-pntAB-gfp</i>	1.88	2.35	2.43	6.45	9.9±1.0	8.5±0.5
<i>Lys-χ1/P_{gapA}-pntAB-gfp</i>	4.34	3.81	1.98	7.26	9.8±0.7	20.4±1.7
<i>Lys-χ1/P_{pgk}-pntAB-gfp</i>	3.22	3.32	2.29	6.86	10.2±0.6	18.8±0.9
<i>Lys-χ1/P_{gpm}-pntAB-gfp</i>	3.61	3.28	2.08	7.07	9.8±1.1	19.8±1.5
<i>Lys-χ1/P_{eno}-pntAB-gfp</i>	3.46	3.26	2.17	6.93	10.0±0.8	19.2±1.4
<i>Lys-χ1/P_{pfk}-pntAB-gfp</i>	3.29	3.27	2.22	6.62	9.9±0.3	19.0±2.3
<i>Lys-χ1/P_{PF104}-pntAB-gfp</i>	2.45	2.72	2.34	6.58	9.5±1.2	13.2±1.5
<i>Lys-χ1/P_{dapA-A16}-pntAB-gfp</i>	5.81	4.61	1.65	7.51	9.3±0.9	19.7±1.8
<i>Lys-χ1/P_{dapA-A45}-pntAB-gfp</i>	4.93	4.04	1.91	7.32	9.8±1.6	20.7±0.3
<i>Lys-χ1/P_{dapA-C20}-pntAB-gfp</i>	5.29	4.23	1.68	7.43	10.2±1.3	20.0±1.4
<i>Lys-χ1/P_{gro}-pntAB-gfp</i>	6.35	4.93	1.54	7.8	9.1±0.4	17.9±2.0
<i>Lys-χ1/P_{lac}-pntAB-gfp</i>	5.16	4.20	1.78	7.52	9.8±1.3	20.4±2.1
<i>Lys-χ1/P_{trc}-pntAB-gfp</i>	6.09	4.80	1.49	7.47	9.3±0.6	19.0±1.4
<i>Lys-χ1/P_{trp}-pntAB-gfp</i>	5.30	4.23	1.66	7.43	9.8±0.4	20.2±1.7
<i>Lys-χ1/P_{tac}-pntAB-gfp</i>	5.87	4.59	1.59	7.48	9.9±1.0	19.7±1.3
<i>Lys-χ1/P_{kan}-pntAB-gfp</i>	7.68	5.73	1.39	7.98	9.1±0.7	15.6±1.2
<i>Lys-χ1/P_{lacM}-pntAB-gfp</i>	15.68	7.16	0.83	8.27	7.5±0.8	5.9±0.6
<i>Lys-χ1/P_{tacM}-pntAB-gfp</i>	19.34	7.61	0.57	8.43	5.4±0.4	2.4±0.7
<i>Lys-χ1/P_{sod}-pntAB-gfp</i>	10.03	6.01	1.21	9.31	8.7±0.5	13.7±0.9
<i>Lys-χ1/P_{tuf}-pntAB-gfp</i>	13.42	6.74	1.03	8.76	8.4±0.8	9.3±0.6
<i>Lys-χ1/P_{H30}-pntAB-gfp</i>	11.17	6.38	1.19	9.89	8.5±0.3	12±1.6
<i>Lys-χ1/P_{H36}-pntAB-gfp</i>	15.10	6.93	0.89	8.22	7.8±0.9	6.2±0.7

^a: the strains list in this table were not ranked according to the level of promoters; ^b: the unit is 10^{-4} nmol/(10^4 cell); ^c: the unit is g/L; ND: not detected.

2.5 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* Lys- χ 1 中异源表达 PntAB 可恢复胞内 L-赖氨酸积累

由表 4 可知, NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* Lys- χ 1 胞内 NADP(H⁺)和 NAD(H⁺)水平可通过不同强度启动子控制 PntAB 的表达来调节。前面研究发现, 当失活胞内 Zwf、MalE 和 Icd 时, 因胞内 NADPH 水平显著降低, 从而会显著影响菌体生长和 L-赖氨酸合成(图 4)。为此, 本实验分析了通过不同强度启动子控制 PntAB 在 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* Lys- χ 1 中的表达, 考察胞内 NADPH 水平的变化对菌体生长和 L-赖氨酸合成的影响。需要指出的是, 尽管重组菌 Lys- χ 1/*P*_{tacM}-*pntAB-gfp* 的细胞内 NADPH 水平最高, 但最终菌体量和 L-赖氨酸产量并不是最高(表 4)。通过分析不同胞内 NADPH 浓度下重组菌株 L-赖氨酸生产强度发现, 菌体量和 L-赖氨酸产量在胞内 NADPH 水平一定范围内会随着 NADPH 浓度的增加而增加, 但是当超过 NADPH 阈值时, 会随着胞内 NADPH 浓度的增加而降低(图 6)。从图 6 中可以得知, 当胞内 NADPH 浓度在 $(3-7) \times 10^{-4}$ nmol/(10⁴ cell) 时, 细胞处于最大 L-赖氨酸生产强度。结合表 4 和图 5 的结果可以发现, 当以强启动子控制 PntAB 在 NADPH 营养缺陷型 *C. glutamicum* Lys- χ 1 中的表达时, L-赖氨酸生产强度最大, 其中以启动子 *P*_{dapA-A16} 控制 PntAB 表达时 L-赖氨酸生产强度最高(即重组菌 Lys- χ 1/*P*_{dapA-A16}-*pntAB-gfp*), 达到 0.044 g/(h·g cell)。然而, 当以弱启动子或超强启动子控制 PntAB 在重组菌 Lys- χ 1 中的表达时, L-赖氨酸生产强度为最大值的 1%–75%。例如, 以弱启动子 *P*_{dapA-R2} 控制 PntAB 表达的重组菌 Lys- χ 1/*P*_{dapA-R2}-*pntAB-gfp* 的 L-赖氨酸生产强度为最大值的~1.3%, 而超强启动子 *P*_{sod} 控制 PntAB 表达的重组菌 Lys- χ 1/*P*_{sod}-*pntAB-gfp* 的 L-赖氨酸生产强度为最大值的~74.3%。

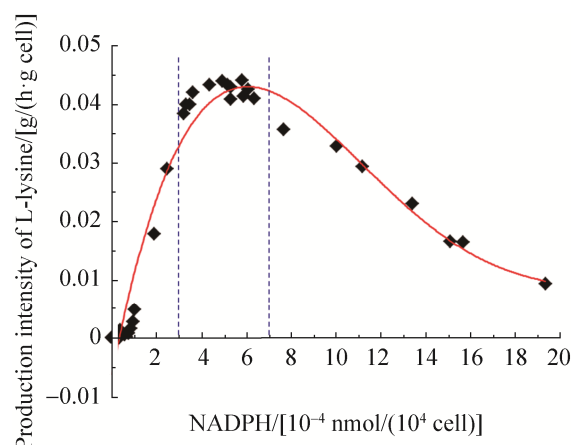


图 6. 不同强度启动子控制 NADPH 水平对 L-赖氨酸生产强度的影响

Figure 6. The effect of intracellular NADPH level controlled by promoters with different transcriptional activity on production intensity of L-lysine.

3 讨论

本研究首次以 L-赖氨酸高产菌株 *C. glutamicum* Lys- χ 为出发菌株构建了 1 株 NADPH 营养缺陷型重组菌株 *C. glutamicum* Lys- χ 1。重组菌 Lys- χ 1 可作为底盘细胞, 用于比较不同的 NADPH 再生策略, 获得不同胞内 NADPH 水平的重组菌株, 进而实现精确调控胞内 NADPH 水平, 为进一步阐明 NADPH 调控微生物细胞生理代谢功能的机制提供研究基础。

在 *C. glutamicum* 中, PP 途径是 NADPH 的主要合成途径, 其中 Zwf 和 Gnd 参与催化 NADPH 的合成^[1,13]。为了构建 NADPH 营养缺陷型菌株, 本研究首先选择失活 Zwf, 获得重组菌株 *C. glutamicum* Lys- χ Δ Z。研究发现, 失活 Zwf 会显著降低 L-赖氨酸的合成(图 4)。众多研究指出, 合成 1 mol 的 L-赖氨酸需要消耗 4 mol NADPH^[1,5,13-14]。由于 PP 途径被阻断, 胞内 NADPH 水平不能满足 L-赖氨酸的需求, 因此重组菌 Lys- χ Δ Z 合成 L-赖

氨酸的能力显著降低。需要指出的是, Zwf 的失活也会影响菌体的生长, 这结果与 Lindner 等报道的不一致。Lindner 等发现, 失活 *E. coli* 中 Zwf 不影响菌体生长^[26]。在 *E. coli* 中存在 PntAB 或 UdhA 组成的转氢酶循环途径, 该途径可以调控 NAD(H⁺)与 NADP(H⁺)的相互转化水平, 从而实现调节胞内 NADPH 水平^[16]。然而, *C. glutamicum* 中没有转氢酶循环途径, 不能将胞内富余的 NADH 转化成 NADPH, 从而导致胞内 NADPH 匮乏, 进而影响菌体生长^[17]。当同时失活 *C. glutamicum* 中 Zwf、MalE 和 Icd_{Cg} 时, 胞内检测不到 NADPH 的积累, 同时菌体生长和 L-赖氨酸合成都受到显著抑制(表 3)。另外, 将重组菌 Lys- χ ΔZM 中自身的 NADP-Icd_{Cg} 替换成 NAD-Icd_{Sm} 时(即重组菌 Lys- χ 1), 重组菌株中也检测不到胞内 NADPH 的积累(表 3)。这些结果表明, *C. glutamicum* 中参与 NADPH 合成的酶为 Zwf、MalE 和 Icd_{Cg}, 改造这些酶会阻断胞内 NADPH 的积累。值得指出的是, 当以葡萄糖酸为底物时, 重组菌株中菌体生长和 L-赖氨酸合成性能都有明显的改善, 而以其他有机酸(如丙酮酸、 α -酮戊二酸或草酰乙酸)为底物时则没有明显影响(图 4)。其原因可能是, 葡萄糖酸在磷酸化酶的作用下形成 6-磷酸葡萄糖酸, 进而通过 Gnd 催化形成核酮糖-5-磷酸和 NADPH, 从而满足菌体生长和 L-赖氨酸合成对 NADPH 的需求^[26]。

PntAB 催化 NADH 形成 NADPH 而不直接涉及碳代谢途径, 从而调节胞内 NADP(H⁺)和 NAD(H⁺)水平^[16]。研究发现, 在 NADPH 营养缺陷型重组菌 Lys- χ 1 中异源表达 PntAB 可以恢复重组菌中胞内 NADPH 的积累, 并在一定程度上恢复菌体生长和 L-赖氨酸合成(表 4)。此外, 本研究发现, 在 *C. glutamicum* 中具有不同强度的启动子控

制 PntAB 表达水平不同, 使得重组菌株中胞内 NADPH 积累水平也不同。当携带有超强启动子控制的表达质粒的重组菌株胞内 NADPH 水平最高[如重组菌 Lys- χ 1/P_{tacM}-*pntAB-gfp* 胞内 NADPH 水平为 19.34×10^{-4} nmol/(10^4 细胞)], 而携带有超弱启动子控制的表达质粒的重组菌株胞内 NADPH 水平最低[如重组菌 Lys- χ 1/P_{dapA-B27}-*pntAB-gfp* 胞内 NADPH 水平为 0.28×10^{-4} nmol/(10^4 细胞)](表 4)。然而, 高胞内 NADPH 水平, 并不代表高菌体量和 L-赖氨酸产量。在一定范围内胞内 NADPH 水平下, 菌体量和 L-赖氨酸产量会随着 NADPH 浓度的增加而增加, 但是当超过 NADPH 阈值时, 会随着胞内 NADPH 浓度的增加而降低(图 6)。这一结果表明, 胞内过量的 NADPH 会抑制菌体生长和 L-赖氨酸的合成, 其原因可能是胞内过量的 NADPH 打破了细胞内氧化还原平衡^[4,27]。综上所述, 本研究最终获得的 NADPH 营养缺陷型重组菌 Lys- χ 1 可以作为底盘细胞, 通过不同强度的启动子控制外源 PntAB 的表达水平来控制重组菌胞内 NADPH 水平, 从而获得不同胞内 NADPH 水平的重组菌株, 为进一步阐明 NADPH 调控微生物细胞生理代谢功能的机制提供研究基础。此外, 有研究报道, 利用 *E. coli* 的 NADPH 营养缺陷型菌株可以筛选具有高效且专一性的 NADPH 合成酶^[28]。因此, NADPH 营养缺陷型重组菌株 *C. glutamicum* Lys- χ 1 在研究 NADPH 再生策略和对微生物细胞生理代谢功能的影响中具有很大优势。

参 考 文 献

- [1] Xu JZ, Yang HK, Zhang WG. NADPH metabolism: a survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(7): 1061–1076.

- [2] Qi HS, Li SS, Zhao SM, Huang D, Xia ML, Wen JP. Model-driven redox pathway manipulation for improved isobutanol production in *Bacillus subtilis* complemented with experimental validation and metabolic profiling analysis. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93815.
- [3] Bastian S, Liu X, Meyerowitz JT, Snow CD, Chen MMY, Arnold FH. Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(3): 345–352.
- [4] Bartek T, Blombach B, Zönnchen E, Makus P, Lang S, Eikmanns BJ, Oldiges M. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Progress*, 2010, 26(2): 361–371.
- [5] Xu JZ, Han M, Zhang JL, Guo YF, Zhang WG. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for the L-lysine production by increasing the flux into L-lysine biosynthetic pathway. *Amino Acids*, 2014, 46(9): 2165–2175.
- [6] Xu JZ, Ruan HZ, Yu HB, Liu LM, Zhang WG. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 39.
- [7] Xu Q, Xu X, Huang H, Li S. Efficient synthesis of (R)-2-chloro-1-phenylethol using a yeast carbonyl reductase with broad substrate spectrum and 2-propanol as cosubstrate. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 103: 277–285.
- [8] Chen Y, Liu QG, Chen XC, Wu JL, Guo T, Zhu CJ, Ying HJ. Redirecting metabolic flux in *Saccharomyces cerevisiae* through regulation of cofactors in UMP production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(4): 577–583.
- [9] Soga N, Kinoshita K Jr, Yoshida M Jr, Suzuki T Jr. Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(12): 9633–9639.
- [10] Kang SW, Lee S, Lee EK. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. *Archives of Pharmacal Research*, 2015, 38(3): 338–345.
- [11] Li N, Zhang YY, Ye Q, Zhang YZ, Chen Y, Chen XC, Wu JL, Bai JX, Xie JJ, Ying HJ. Effect of ribose, xylose, aspartic acid, glutamine and nicotinic acid on ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 572–575.
- [12] Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S, Appanna VD. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6665–6675.
- [13] Becker J, Klopprogge C, Herold A, Zelder O, Bolten CJ, Wittmann C. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*—over expression and modification of G6P dehydrogenase. *Journal of Biotechnology*, 2007, 132(2): 99–109.
- [14] Martínez I, Zhu JF, Lin H, Bennett GN, San KY. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 352–359.
- [15] Kind S, Becker J, Wittmann C. Increased lysine production by flux coupling of the tricarboxylic acid cycle and the lysine biosynthetic pathway—metabolic engineering of the availability of succinyl-CoA in *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 184–195.
- [16] Chou HH, Marx CJ, Sauer U. Transhydrogenase promotes the robustness and evolvability of *E. coli* deficient in NADPH production. *PLoS Genetics*, 2015, 11(2): e1005007.
- [17] Blombach B, Riestert T, Wieschalka S, Ziert C, Youn JW, Wendisch VF, Eikmanns BJ. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3300–3310.
- [18] Yang HK, Xu JZ, Zhang WG. Blocking NADPH biosynthesis affected growth and metabolites formation of *Corynebacterium glutamicum*. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(10): 1–9. (in Chinese)
杨汉昆, 徐建中, 张伟国. 阻断辅因子 NADPH 合成对谷氨酸棒杆菌生长及产物合成的影响. *食品与发酵工业*, 2019, 45(10): 1–9.
- [19] 徐大庆. 黄色短杆菌载体系统的构建及其产 L-缬氨酸代谢工程育种的初步研究. 江南大学博士学位论文, 2010.
- [20] 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*. *Nature Communications*, 2017, 8: 15179.
- [21] 叶菁. 木糖异构酶基因 xylA 在谷氨酸棒杆菌中的克隆与表达研究. 华中科技大学博士学位论文, 2013.
- [22] Pátek M, Nešvera J. Promoters and plasmid vectors of *Corynebacterium glutamicum*.//Yukawa H, Inui M (eds). *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013: 51–88.
- [23] Vašicová P, Pátek M, Nešvera J, Sahn H, Eikmanns B. Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* dapA promoter. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(19): 6188–6191.
- [24] Yim SS, An SJ, Kang M, Lee J, Jeong KJ. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(11): 2959–2969.
- [25] Wang LP, Yu HB, Xu JZ, Ruan HZ, Zhang WG. Deciphering the crucial roles of AraC-type transcriptional regulator Cgl2680 on NADPH metabolism and L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(6): 1–15.
- [26] Lindner SN, Ramirez LC, Krüsemann JL, Yishai O,

- Belkhefā S, He H, Bouzon M, Döring V, Bar-Even A. NADPH-auxotrophic *E. coli*: a sensor strain for testing *in vivo* regeneration of NADPH. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2742–2749.
- [27] Xu JZ, Ruan HZ, Chen XL, Zhang F, Zhang WG. Equilibrium of the intracellular redox state for improving cell growth and L-lysine yield of *Corynebacterium glutamicum* by optimal cofactor swapping. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 65.
- [28] Calzadiaz-Ramirez L, Calvó-Tusell C, Stoffel GMM, Lindner SN, Osuna S, Erb TJ, Garcia-Borràs M, Bar-Even A, Acevedo-Rocha CG. *In vivo* selection for formate dehydrogenases with high efficiency and specificity toward NADP⁺. *ACS Catalysis*, 2020, 10(14): 7512–7525.

Construction and performance analysis of NADPH-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* recombinant

Haozhe Ruan¹, Liming Liu^{1,2*}, Weiguo Zhang¹, Jianzhong Xu^{1*}

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The biosynthetic pathway of NADPH in *Corynebacterium glutamicum* was modified to block NADPH production, thus constructing an NADPH-auxotrophic *C. glutamicum* recombinant. [Methods] To block NADPH production in cell, we firstly inactivated the glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwf) and malic enzyme (MalE) in an L-lysine high-producing strain *C. glutamicum* Lys- χ , and replaced the native NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-Icd_{Cg}) with NAD⁺-Icd_{Sm} from *Streptococcus mutans*. Then, we introduced the proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase (PntAB) from *Escherichia coli* with different expression level controlled by different strength promoters into NADPH-auxotrophic *C. glutamicum* recombinant. Lastly, we analyzed the changes of intracellular redox level and production intensity of L-lysine in the recombinant strains with different PntAB expression levels. [Results] There was no detectable NADPH in the recombinant strain *C. glutamicum* Lys- χ Δ ZMI_{Cg}::Icd_{Sm} (i.e., Lys- χ 1), indicating that strain Lys- χ 1 was an NADPH-auxotrophic *C. glutamicum*. Strain Lys- χ 1 grew well and accumulated L-lysine in the basic medium with gluconolactone as carbon source, whereas it could not grow with glucose, pyruvate, α -ketoglutaric acid and oxalacetic acid as carbon source. In addition, overexpression of PntAB in strain Lys- χ 1 replenished the intracellular NADPH level, but the NADPH level in different recombinant strains was different because there was the different expression level of PntAB under the different intensity of promoters. And these affected the cell growth and L-lysine production. [Conclusion] The strain Lys- χ 1 could be used as a chassis cell for the capacity of strategies to regenerate NADPH *in vivo*, thus obtaining recombinant strains with different intracellular NADPH levels. Therefore, this study provided a basis for investigating the regulatory mechanism of NADPH on physiology and metabolism of microbial cells.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, NADPH auxotroph, NADPH regeneration, L-lysine production, intracellular REDOX state, promoter engineering

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31601459) and by the National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-08)

*Corresponding authors. Liming Liu, Tel/Fax: +86-510-85197875, E-mail: mingLL@jiangnan.edu.cn; Jianzhong Xu, Tel/Fax: +86-510-85329312, E-mail: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

Received: 18 September 2020; Revised: 7 November 2020; Published online: 22 March 2021