第 40 卷 第 2 期
2025 年 4 月

天津科技大学学报
Journal of Tianjin University of Science and Technology

Vol. 40 No. 2
Apr. 2025

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240009
网络首发日期：2024–07–15；网络首发地址：http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240710.2135.011

产 *L*–异亮氨酸谷氨酸棒杆菌的代谢工程构建

张佳蓉，李彦臻，芦 楠，张成林
（天津科技大学生物工程学院，天津 300457）

摘 要：*L*–异亮氨酸作为必需氨基酸具有重要的生理功能，被广泛应用于食品、医药、农业等领域。针对目前发酵工业中 *L*–异亮氨酸生产菌株谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）存在营养缺陷、发酵周期长等不足，利用代谢工程策略从头构建 *L*–异亮氨酸合成菌株。首先，过表达解除反馈抑制的天冬氨酸激酶、苏氨酸脱水酶以及乙酰乳酸合酶编码基因 $lysC^{A279T}$、$ilvA^{G418A/T1147G}$ 和 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 以强化 *L*–异亮氨酸合成通路，所获菌株 ILE-3 的 *L*–异亮氨酸产量达到 3.5 g/L。然后，过表达丙酮酸羧化酶编码基因 *pyc* 以增强前体物 *L*–天冬氨酸的供应。在此基础上过表达 *L*–异亮氨酸输出蛋白编码基因 *brnFE* 以促进其外排，获得菌株 ILE-6。该菌株在 5 L 发酵罐经发酵 48 h 后，ILE-6 的 *L*–异亮氨酸产量和转化率分别达到 21.3 g/L 和 14.1%。该菌株遗传背景清晰、无营养缺陷、发酵周期短，其所用策略可为分支链氨基酸生产菌株的代谢工程构建提供参考。

关键词：*L*–异亮氨酸；*L*–苏氨酸；代谢工程；谷氨酸棒杆菌；代谢流
中图分类号：Q815 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-6510（2025）02-0013-09

Construction of Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Producing *L*-Isoleucine

ZHANG Jiarong，LI Yanzhen，LU Nan，ZHANG Chenglin
（College of Biotechnology，Tianjin University of Science and Technology，Tianjin 300457，China）

Abstract：*L*-isoleucine，as an essential amino acid，possesses distinctive physiological functions and has been widely used in food，pharmaceutical and agricultural industry. However，the current *Corynebacterium glutamicum* strains used for scaled-up production of *L*-isoleucine exhibit auxotrophy and the fermentation period is relatively long. In this study，an *L*-isoleucine producing strain was developed with the use of metabolic engineering strategies. Initially，the feedback resistant aspartate kinase，threonine dehydratase and acetolactate synthase encoding genes $lysC^{A279T}$，$ilvA^{G418A/T1147G}$ and $ilvBN^{A139T/T140A}$ were overexpressed to enhance the *L*-isoleucine synthetic pathway. As a result，3.5 g/L of *L*–isoleucine was produced by the generated strain ILE-3. Then，the pyruvate carboxylase encoding gene *pyc* was overexpressed to improve *L*-aspartate supply. Finally，*brnFE* was overexpressed to promote the efflux of *L*-isoleucine. After fermentation for 48 h in a 5 L fermentor，the *L*-isoleucine production titer and yield achieved 21.3 g/L and 14.1% by the final strain ILE-6. The strain ILE-6 possesses clear genetic background，non-auxotroph and short fermentation period. The strategies applied in the study thus could provide reference for metabolic engineering strains for producing branched chain amino acids.

Key words：*L*-isoleucine；*L*-threonine；metabolic engineering；*Corynebacterium glutamicum*；metabolic flux

引文格式：
张佳蓉，李彦臻，芦楠，等. 产 *L*–异亮氨酸谷氨酸棒杆菌的代谢工程构建[J]. 天津科技大学学报，2025，40（2）：13–21.
ZHANG J R，LI Y Z，LU N，et al. Construction of metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing *L*-isoleucine[J]. Journal of Tianjin university of science and technology，2025，40（2）：13–21.

收稿日期：2024–01–24；**修回日期**：2024–03–05
基金项目：国家自然科学基金项目（31770053）；天津市研究生科研创新项目（2022BKYZ006，2022BKYZ018）
作者简介：张佳蓉（1998—），女，河北省石家庄人，硕士研究生；**通信作者**：张成林，教授，zcl@tust.edu.cn

L–异亮氨酸属于必需氨基酸，与 *L*–缬氨酸和 *L*–亮氨酸合称为分支链氨基酸[1-2]。研究[3-4]表明，*L*–异亮氨酸具有修复肌细胞、调节肝功能和免疫系统等功效，被广泛应用于食品、医药、农业等领域。据统计，2020 年全球 *L*–异亮氨酸市场份额约为 4 200 万美元，预计 2026 年将达到 5 500 万美元[5]。

目前工业上采用发酵法合成 *L*–异亮氨酸，生产菌株以谷氨酸棒杆菌（*Corynebacterium glutamicum*）为主[6]，其代谢途径如图 1 所示。选育高效合成 *L*–异亮氨酸的细胞工厂是提升其产能的重要途径[7]。现有用于生产 *L*–异亮氨酸的谷氨酸棒杆菌多来源于传统的诱变育种[8]。尽管该方法在菌种选育中发挥了重要的作用，但是菌株经多轮诱变后，出现营养缺陷（如 *L*–亮氨酸、*L*–缬氨酸缺陷）、生长缓慢（发酵周期近 60 h）等不良性状。此外，由于未知突变引起遗传稳定性下降，诸多优良性状（如关键酶解除反馈抑制作用等）在传代过程中容易丢失，所以出现菌种退化等现象[5, 9-10]。然而，基因组学和比较基因组学技术也难以鉴别造成上述问题的确切突变点[5]。

近年来随着代谢工程的飞速发展，国内外学者开展了一系列利用谷氨酸棒杆菌合成 *L*–异亮氨酸的代谢工程研究[11-21]（表 1）。Vogt 等[14]在诱变菌株 MH20-22B 中过表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶编码基因 *ilvA* 和高丝氨酸脱氢酶编码基因 *hom*，获得菌株 MH20-22B-$ilvA^{fbr}$-hom^{fbr}，经 50 h 发酵 *L*–异亮氨酸产量达到 14.3 g/L。Li 等[21]通过敲除分支酸代谢相关基因 *treS*、*treY*、*otsA* 及 *mytB* 调节细胞壁成分并过表达 *ilvA* 等基因，菌株 P_{brnFE}7.WL001 的 *L*–异亮氨酸产量提高了 36.1%。总体而言，菌株发酵周期偏长，有的菌株还存在营养缺陷或需要诱导剂诱导的问题，不利于工业化应用。

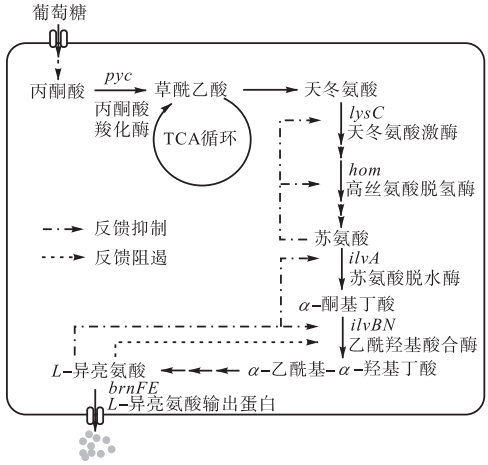


图 1　谷氨酸棒杆菌中 *L*–异亮氨酸生物合成途径及其代谢调控

Fig. 1　*L*-isoleucine biosynthesis pathway and metabolic regulation in *Corynebacterium glutamicum*

针对上述问题，本研究以野生型谷氨酸棒杆菌为出发菌株，开展代谢工程研究，以期获得具有无营养缺陷、发酵周期短等优良性状的 *L*–异亮氨酸生产菌株，为适用于工业生产的细胞工厂构建提供参考。

表 1　谷氨酸棒杆菌 *L*–异亮氨酸代谢途径改造策略

Tab. 1　Strategies for modifying the pathway of *L*-isoleucine in *C. glutamicum*

策略	产量/(g·L^{-1})	转化率/%	周期/h	营养缺陷或诱导	参考文献
Δ*brnQ*，过表达 *brnFE*	29.0	24.0	60	需诱导	[11]
过表达 *zwf*、*ppnk*	4.1	7.2	60	需诱导	[12]
质粒过表达 *ilvBN*1、*ilvA* 和 *ppnK*1	32.4	—	72	需诱导	[13]
质粒过表达 $ilvA^{V323A}$ 和 hom^{G378E}	14.3	14.0	78	Leu^-	[14]
质粒过表达 $ilvA^{V140M-F383A}$	0.73	—	72	需诱导	[15]
质粒过表达 *lysC*1、*hom*1、*ilvBN*1 和 *ilvA*1	3.5	—	72	—	[16]
质粒过表达 *gnd*、*fbp* 和 *pgl*	29.0	13.8	96	—	[17]
质粒过表达 *phaCAB*	29.8	12.9	96	需诱导	[18]
质粒过表达 *cysK*	25.3	—	72	需诱导	[19]
Δ*alaT*Δ*brnQ*Δ*alr*，过质粒表达 *ilvBN*1 和 *ppnK*	32.1	18.1	72	无	[20]
Δ*treS*Δ*treY*Δ*otsA*Δ*mytB*P_{ilvA}::P_{brnFE}	25.0	—	72	无	[21]

注：—表示未报道。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、质粒与引物

菌株、质粒与引物分别见表 2—表 4。

1.1.2　培养基

Brain-Heart Infusion（BHI）培养基：BHI 37.5 g/L，自然 pH，固体培养基添加终质量浓度为 20 g/L 的琼脂粉，115 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。配制 BHI-supplemented（BHIS）培养基时添加终质量浓度为

5 g/L 的葡萄糖。

斜面培养基[22]：葡萄糖 1 g/L，酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 5 g/L，琼脂粉 20 g/L，pH 7.0 ~ 7.2，115 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

种子培养基[22]：葡萄糖 30 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 3 g/L，玉米浆 20 mL/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.6 g/L，$KH_2PO_4·3H_2O$ 1.5 g/L，$FeSO_4·7H_2O$ 0.001 g/L，$MnSO_4·H_2O$ 0.001 g/L，豆粕水解液 15 mL/L，121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min，pH 7.0。

发酵培养基[22]：葡萄糖 80 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 5 g/L，玉米浆 10 mL/L，$FeSO_4·7H_2O$ 0.015 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L，$MnSO_4·H_2O$ 0.015 g/L，$KH_2PO_4·3H_2O$ 1.5 g/L，豆粕水解液 35 mL/L，121 ℃高压蒸汽灭菌 20 min，pH 7.0。

1.1.3　试剂与仪器

一步法克隆试剂盒，南京诺唯赞生物科技有限公司；其余分子生物学试剂或试剂盒，宝日医生物技术(北京)有限公司。

BIOTECH–5BG 型 5 L 发酵罐，上海保兴生物设备工程有限公司；U3000 型高效液相色谱仪，美国赛默飞世尔科技公司；SBA–40D 型生物传感器分析仪，山东省科学院生物研究所；752 型分光光度计，上海分析仪器厂。

表 2　菌株

Tab. 2　Strains

菌株	特性	来源
Escherichia coli DH5α	F-, Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*	实验室保藏
C. glutamicum SMR	*C. glutamicum* ATCC 13032*rpsL*^{A128G}, Strp^R	实验室保藏
ILE-1	*C. glutamicum* SMR cg1945::P_{tuf}-*lysC*^{A279T}	本研究
ILE-2	ILE-1/pXPTS-*ilvA*	本研究
ILE-3	ILE-1/pXPTS-*ilvA-ilvBN*	本研究
ILE-4	ILE-3 P_{pyc}::P_{tuf}	本研究
ILE-5	ILE-4/pEC-1	本研究
ILE-6	ILE-4/pEC-2	本研究

表 3　质粒

Tab. 3　Plasmids

质粒	特性	来源
pK18*mobrpsL*	pK18*mob*Δ*sacB*-P_{tuf}-*rpsL*, Km^R	实验室保藏
pXPTS	pXMJ19Δ*lacI*-$P_{trc}P_{sod}$, Cm^R	实验室保藏
pEC	pEC-XK99EΔ*lacI*Δ*trc*	实验室保藏
pK-*lysC*	pK18*mobrpsL*-cg1945::P_{tuf}-*lysC*^{A279T}	本研究
pK-*pyc*	pK18*mobrpsL*-P_{pyc}::P_{tuf}	本研究
pXPTS-*ilvA*	pXPTS-*ilvA*$^{G418A/T1147G}$	本研究
pXPTS-*ilvA-ilvBN*	pXPTS-*ilvA*$^{G418A/T1147G}$-*ilvBN*$^{A139T/T140A}$	本研究
pEC-1	pECP$_{brnFE}$-*brnFE*	本研究
pEC-2	pECP$_{tuf}$-*brnFE*	本研究

表 4　引物

Tab. 4　Primers

引物名称	引物序列(5′-3′)	用途
lysC-1	ATGGCCCTGGTCGTACAGAA	构建 *lysC*^{A279T} 突变体
lysC-2	CACGGAAAACCTTCGCAGTCTCGCCTGGCTTATCGGAA	
lysC-3	TTCCGATAAGCCAGGCGAGACTGCGAAGGTTTTCCGTG	
lysC-4	TTAGCGTCCGGTGCCTG	
cg1945-1	tgcctgcaggtcgactctagaCTGACGTTCAATATCTAGCAGCTGT	扩增 cg1945 上游同源臂
cg1945-2	GTTTTCCTTCGGATCTAAACGATCTTAGAACCGCCGTATGTTAATAAGG	
cg1945-3	CCTTATTAACATACGGCGGTTCTAAGATCGTTTAGATCCGAAGGAAAAC	扩增 P_{tuf}以过表达 *lysC*^{A279T}
cg1945-4	TTCTGTACGACCAGGGCCATGGGTGAAACACACCTTTCTGGACTTCGTGGTGGCTACGACTTTC	
cg1945-5	ATGGCCCTGGTCGTACAGAA	扩增 *lysC*^{A279T}
cg1945-6	TTAGCGTCCGGTGCCTG	
cg1945-7	CAGGCACCGGACGCTAATGAGGCTGAGGTCATGACTTCA	扩增 cg1945 下游同源臂
cg1945-8	tatgaccatgattacgaattcAAGTCGGTACCCAATCACCTTAAT	
JD-cg1945-1	CAGAAGATGGATCAGGGATAAGAA	鉴定 ILE-1
JD-cg1945-2	ATCAGCAAAGTGCGGTTAATACC	
ilvA-1	ttcacacaggaaacagaattATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAA	构建 *ilvA*$^{G418A/T1147G}$ 突变体
ilvA-2	CGAAGTTATTGCCAGTGACCATCAAGGAGACAAACTCTCCGCC	
ilvA-3	GGCGGAGAGTTTGTCTCCTTGATGGTCACTGGCAATAACTTCG	
ilvA-4	GTTGTTGCGCTTGAGGTACTCTACCAGCGTGATGTCATCATCCG	
ilvA-5	CGGATGATGACATCACGCTGGTtGAGTACCTCAAGCGCAACAAC	
ilvA-6	ggtacccggggatcctctagaTTAGGTCAAGTATTCGTACTCAGGG	

续表

引物名称	引物序列(5′-3′)	用途
ilvBN-1	TTTTTACCCGGTACCGAGCTCATGAATGTGGCAGCTTCTCAACA	构建 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 突变体
ilvBN-2	AATATCCACCAGAACAGGGCCGGAGCGACCAGTAATCGCG	
ilvBN-3	GGCCCTGTTCTGGTGGATATT	
ilvBN-4	CAGGTGCGTGGCTTTTCAAATTCAACGAACTGAGCTGCCC	
ilvBN-5	TTTGAAAAGCCACGCACCTG	
ilvBN-6	CAAAACAGCCAAGCTGAATTCTTAGATCTTGGCCGGAGCC	
pXMJ19-1	CTGCCAGCTCATAGACCGTATC	鉴定 ILE-2 和 ILE-3
pXMJ19-2	GAATAAGGGCGACACGGAAAT	
pyc-1	tgcctgcaggtcgactctagaGCACAAGTTGATTCCGGCG	扩增 P_{pyc} 上游同源臂
pyc-2	GTTTTCCTTCGGATCTAAACGATCTAGTATCGTAACCCCCGATTCCC	
pyc-3	GGGAATCGGGGGTTACGATACTAGATCGTTTAGATCCGAAGGAAAAC	扩增 P_{tuf} 以过表达 *pyc*
pyc-4	CGTTGAAGATGTGTGAGTCGACATGGGTGAAACACACCTTTCTGGACTTCGTGGTGGCTACGACTTTC	
pyc-5	GAAAGTCGTAGCCACCACGAAGTCCAGAAAGGTGTGTTTCACCCATGTCGACTCACACATCTTCAACG	扩增 P_{pyc} 下游同源臂
pyc-6	tatgaccatgattacgaattcAATGTTGGTTGCAACACCAGAC	
JD-*pyc*-1	TGTACGCAGCAGGTGACTGTACT	鉴定 ILE-4
JD-*pyc*-2	GGTATCAGTAACTGCCAGTGCGT	
T-1	aggaaacagaccatggaattcAGCGTGTCAGTAGGCGCGT	扩增 P_{brnFE}-*brnFE* 和 P_{tuf}-*brnFE*
T-2	TGTATGTCCTCCTGGACTTCGTG	
T-3	CACGAAGTCCAGGAGGACATACAATGCAAAAAACGCAAGAGATTCA	
T-4	tctagaggatccccgggtaccTTAGAAAAGATTCACCAGTCCAACA	
T-5	aggaaacagaccatggaattcATATTGCACAATAGCCTAGTTGAGGTGCGCAAACTGGCAAC AAAACTACCCGGCAATTGTGTGATGATTGTAGTATGCAAAAAACGCAAGAGATTCA	
JD-1	CTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGC	鉴定 ILE-5 和 ILE-6
JD-2	TAGAAACGCTTGTGGCCGA	

1.2　方法

1.2.1　基因突变体及其表达质粒和菌株的构建

通过重叠 PCR 获得基因突变体。以 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 为例。以谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板，分别利用引物 *ilvA*-1/*ilvA*-2、*ilvA*-3/*ilvA*-4 以及 *ilvA*-5/*ilvA*-6 PCR 扩增获得相应产物。经回收后再以其为模板，利用引物 *ilvA*-1/*ilvA*-6 PCR 扩增获得 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 突变体。

利用一步法克隆试剂盒构建重组质粒，以构建 pXPTS-*ilvA* 为例。$ilvA^{G418A/T1147G}$ PCR 扩增产物经回收后，连接至经 *Hin*d Ⅲ酶切后的 pXPTS 质粒，37 ℃反应 30 min 后，化学法转化至大肠杆菌(*E. coli*) DH5*α* 感受态细胞。连接体系：$ilvA^{G418A/T1147G}$ 100 ng，pXPTS 50 ng，Exnase^{TM} Ⅱ 2 μL，5 × CE Buffer 4 μL，去离子水补足至 20 μL。

提取重组质粒 pXPTS-*ilvA*，电转化(2 500 V，1 mm 电转杯)至谷氨酸棒杆菌 ILE-1 感受态细胞[23]，加入 900 μL BHIS 培养基并全部转移至无菌离心管，46 ℃热击 6 min；32 ℃振荡培养 2 h，取 100 μL 涂布至含氯霉素(12 mg/L)的 BHI 固体培养基上，32 ℃倒置培养 24 h。

1.2.2　基因组编辑

以基因组整合方式过表达 $lysC^{A279T}$ 为例。以 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板，利用引物 cg1945-1/cg1945-2 、cg1945-3/cg1945-4 、cg1945-5/cg1945-6 和 cg1945-7/cg1945-8 分别扩增 cg1945 上游同源臂(U_{cg1945})、P_{tuf}、$lysC^{A279T}$ 和 cg1945 下游同源臂。PCR 产物经回收后，以其为模板，利用引物 cg1945-1/cg1945-8，采用重叠 PCR 获得融合片段 U_{cg1945}-P_{tuf}-$lysC^{A279T}$-D_{cg1945}，将其转接至经 *Hin*d Ⅲ酶切后的 pK18*mobrpsl* 质粒，获得重组质粒 pK-*lysC*(方法与 1.2.1 节相同)。将其电转化至谷氨酸棒杆菌感受态细胞，经活化后涂布于含卡那霉素(10 mg/L)的 BHI 固体培养基上，32 ℃倒置培养 24 h，完成第 1 次重组，然后进行菌落 PCR 鉴定。将验证正确的转化子涂布于含链霉素(50 mg/L)的 BHI 固体培养基上，32 ℃倒置培养 24 h，完成第 2 次重组，并再次进行菌落 PCR 鉴定，获得重组菌株 ILE-1[23]。

1.2.3　摇瓶发酵

将活化后的培养物接种于含 30 mL 种子培养基的 500 mL 圆底摇瓶中，32 ℃、220 r/min 振荡培养至 600 nm 处吸光度(A_{600})为 10 ~ 12。以 10% 的接种量

接种至含 30 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板摇瓶，35 ℃、220 r/min 振荡培养 48 h[23]。

1.2.4　5 L 发酵罐发酵

将活化后的培养物接种于含 2 L 种子培养基的 5 L 发酵罐中，32 ℃培养；适时流加氨水，控制 pH 6.5 ~ 7.5；调节通风量、搅拌转数及罐压，控制溶氧 30% ~ 50%。当 A_{600} = 10 ~ 12 时，转移 500 mL 至另一个含 3 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中；35 ℃发酵培养，控制 pH 6.5 ~ 7.5 和溶氧 30% ~ 50%。待发酵培养基中的葡萄糖耗尽时，开始流加质量分数为 80% 的无菌葡萄糖溶液，此后保持发酵液中残糖质量浓度不小于 10 g/L。

1.2.5　底物、代谢物及生物量检测

对于摇瓶发酵，发酵结束后取发酵液；对于发酵罐发酵，每 2 h 取发酵液，13 000 r/min 离心 3 min。上清液经适当稀释后，利用生物传感分析仪测定葡萄糖浓度。发酵液经 2，4–二硝基氟苯衍生后，利用高效液相色谱仪测定氨基酸浓度[24]。菌体沉淀经洗涤后，用 10 mL 容量瓶定容，利用分光光度计测定 A_{600}。

1.3　数据分析

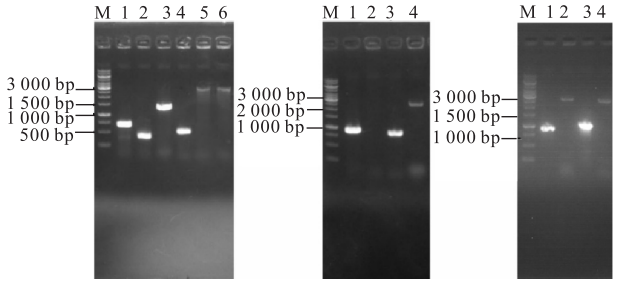
每组摇瓶发酵实验设置 3 个平行，至少重复 3 次。数据经 SPSS 26 进行单因素方差分析，*表示组间差异显著（$P \leqslant 0.05$）。

2　结果与分析

2.1　过表达天冬氨酸激酶编码基因 *lysC*^{A279T} 增强 *L*–苏氨酸供应

L–苏氨酸是 *L*–异亮氨酸生物合成的前体物。天冬氨酸激酶是 *L*–苏氨酸合成的关键酶，且受其反馈抑制。由此推测，过表达解除反馈抑制的天冬氨酸激酶编码基因可以增强 *L*–苏氨酸供应。研究[25]表明，由谷氨酸棒杆菌 *lysC*^{A279T} 编码的天冬氨酸激酶解除了 *L*–苏氨酸反馈抑制作用。

以谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板，分别利用引物 *lysC*-1/*lysC*-2 和 *lysC*-3/*lysC*-4 扩增获得相应产物。经回收后再以其为模板，利用引物 *lysC*-1/*lysC*-4 经重叠 PCR 扩增获得 *lysC*^{A279T} 突变体，DNA 测序结果表明，*lysC* 基因突变成功。采用同源重组的方式将 *tuf* 启动子（谷氨酸棒杆菌中最强的启动子 P_{tuf}）驱动的 *lysC*^{A279T} 基因整合至出发菌株 *C. glutamicum* SMR 假基因 cg1945 位点。分别扩增 P_{tuf}、*lysC*^{A279T} 及 cg1945 上下游同源臂 U_{cg1945} 和 D_{cg1945}，获得碱基数为 368 bp、1 266 bp、654 bp 和 509 bp 的片段；再通过重叠 PCR 获得用于同源重组的 U_{cg1945}-P_{tuf}-*lysC*^{A279T}-D_{cg1945} 片段，其碱基数为 2 797 bp，如图 2（a）所示。然后将其连接至自杀质粒 pK18*mobrpsL* 获得重组质粒 pK-*lysC*。经电转化、筛选及菌落 PCR 鉴定，第一次重组的转化子经鉴定引物 JD-cg1945-1/cg1945-6 及 JD-cg1945-2/cg1945-3 扩增，分别为无条带和碱基数为 2 435 bp 的条带，而出发菌株获得 895 bp 和 801 bp 的条带，如图 2（b）所示。第二次重组的转化子经菌落 PCR 验证，分别获得碱基数为 2 529 bp 和 2 435 bp 的条带如图 2（c）所示，与预期一致。结合 DNA 测序结果，证明 P_{tuf}-*lysC*^{A279T} 成功整合至 *C. glutamicum* SMR 基因组的 cg1945 位点，将其命名为 ILE-1。



（a）为重组片段及重组质粒 pK-*lysC* 鉴定图谱。M. GeneRuler 1 kbp；1. U_{cg1945}；2. P_{tuf}；3. *lysC*^{A279T}；4. D_{cg1945}；5. U_{cg1945}-P_{tuf}-*lysC*^{A279T}-D_{cg1945}；6. 转化有重组质粒 pK-*lysC* 的 *E. coli* DH5α。

（b）为转化子单交换鉴定图谱。M. GeneRuler 1 kbp；1 和 3. 以 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板；2 和 4. 以一次重组菌株基因组 DNA 为模板。

（c）为 ILE-1 鉴定图谱。M. GeneRuler 1 kbp；1 和 3. 以 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板；2 和 4. 以二次重组菌株基因组 DNA 为模板。

图 2　重组菌株 ILE-1 的 PCR 鉴定图谱

Fig. 2　Map for PCR identification of strain ILE-1

为考察过表达 *lysC*^{A279T} 对菌株发酵性能的影响，进行摇瓶发酵实验，结果如图 3 所示。

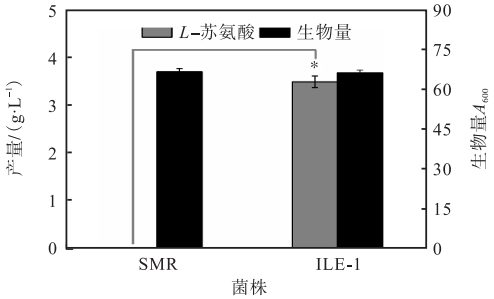


图 3　菌株 *C. glutamicum* SMR 和 ILE-1 的发酵特性

Fig. 3　Fermentation characteristics of strains *C. glutamicum* SMR and ILE-1

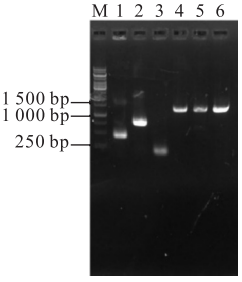
菌株 ILE-1 的生物量与出发菌株 *C. glutamicum* SMR 无显著差异。未发现菌株 ILE-1 合成 *L*–异亮氨酸，但该菌株积累了 3.5 g/L *L*–苏氨酸。该结果表明，过表达 $lysC^{A279T}$ 有效提高了 *L*–异亮氨酸合成前体物 *L*–苏氨酸的供应，需强化 *L*–苏氨酸至 *L*–异亮氨酸的代谢途径。

2.2　强化 *L*–异亮氨酸合成代谢流

L–苏氨酸经苏氨酸脱水酶代谢为 α–酮丁酸，后者经乙酰乳酸合酶进一步代谢为 *L*–异亮氨酸。苏氨酸脱水酶和乙酰乳酸合酶是 *L*–异亮氨酸合成的关键酶，且受其反馈抑制调控[7]。

2.2.1　过表达关键基因 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 对 *L*–异亮氨酸合成的影响

研究[15]发现，谷氨酸棒杆菌 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 编码的苏氨酸脱水酶突变体反馈抑制作用被解除。以 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板，制备突变体 $ilvA^{G418A/T1147G}$。重组菌株 ILE-2 的 PCR 鉴定图谱如图 4 所示，获得碱基数约为 1 300 bp 的片段，与实际值 1 311 bp 接近。DNA 测序结果表明 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 序列与预期一致。将 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 连接至表达载体 pXPTS，获得质粒 pXPTS-*ilvA*。经电转化、筛选及菌落 PCR 鉴定，获得 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 过表达菌株 ILE-2。



M. GeneRuler 1 kbp；1—3. 用于点突变的 *ilvA* 片段；4. $ilvA^{G418A/T1147G}$ 重叠片段；5. 重组质粒 pXPTS-*ilvA*；6. ILE-2 菌落 PCR。

图 4　重组菌株 ILE-2 的 PCR 鉴定图谱

Fig. 4　Map for PCR identification of recombinant strain ILE-2

菌株 ILE-1、ILE-2 和 ILE-3 的发酵特性如图 5 所示，菌株 ILE-2 经摇瓶发酵 48 h 后，其生物量与 ILE-1 无显著差异。ILE-2 可以合成 1.6 g/L *L*–异亮氨酸，且其 *L*–苏氨酸积累量下降至 2.1 g/L。该结果表明，过表达 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 使部分代谢流由 *L*–苏氨酸流向 *L*–异亮氨酸；同时表明，*L*–异亮氨酸的合成代谢流需进一步强化。

2.2.2　共表达 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 和 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 对 *L*–异亮氨酸合成的影响

在谷氨酸棒杆菌中，乙酰乳酸合酶编码基因 *ilvBN* 与二羟酸还原异构酶编码基因 *ilvC* 组成操纵子 *ilvBNC*，该操纵子受分支链氨基酸的弱化作用，且乙酰乳酸合酶还受其反馈抑制作用[6,26]。研究[20]发现，$ilvBN^{A139T/T140A}$ 编码的乙酰乳酸合酶突变体解除了分支链氨基酸的反馈抑制作用。将 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 克隆至质粒 pXPTS-*ilvA*，获得重组质粒 pXPTS-*ilvA*-*ilvBN*。经电转化、筛选及菌落 PCR 鉴定，获得 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 和 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 共表达菌株 ILE-3。摇瓶发酵实验结果表明，菌株 ILE-3 的 *L*–异亮氨酸产量达到 3.5 g/L，较菌株 ILE-2 提高 118.8%，且无 *L*–苏氨酸积累（图 5）。该结果说明，共表达 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 和 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 进一步将代谢流从 *L*–苏氨酸拉动至 *L*–异亮氨酸，从而强化了 *L*–异亮氨酸的合成。

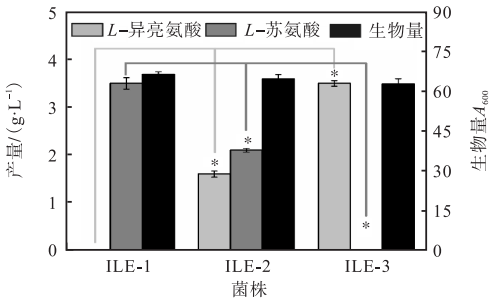


图 5　菌株 ILE-1、ILE-2 和 ILE-3 的发酵特性

Fig. 5　Fermentation characteristics of strains ILE-1, ILE-2 and ILE-3

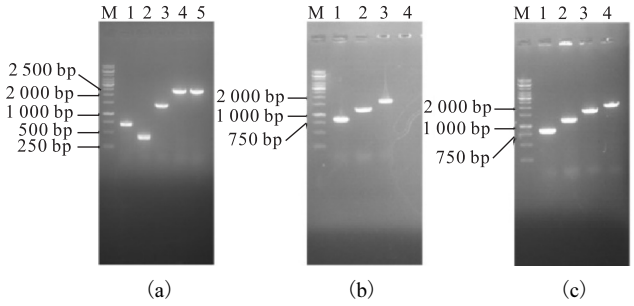
2.3　强化羧化途径对 *L*–异亮氨酸合成的影响

草酰乙酸是合成 *L*–苏氨酸的前体物，进而合成 *L*–异亮氨酸。草酰乙酸可由 TCA 循环合成，亦可由磷酸烯醇式丙酮酸或丙酮酸经羧化途径合成（分别由磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶催化）。在谷氨酸棒杆菌中，草酰乙酸主要由丙酮酸羧化酶催化合成[20]。为进一步强化草酰乙酸供应，采用同源重组方式将 ILE-3 的 *pyc* 基因启动子替换为强启动子 P_{tuf}。

分别扩增 P_{tuf} 及 *pyc* 启动子上下游同源臂（分别命名为 U_{pyc} 和 D_{pyc}），获得碱基数为 368 bp、654 bp 和 1 266 bp 的片段，再通过重叠 PCR 获得用于同源重组的 U_{pyc}-P_{tuf}-D_{pyc} 的片段，其碱基数为 2 310 bp，如图 6(a) 所示，然后将其连接至质粒 pK18*mobrpsL* 获得重组质粒 pK-*pyc*。第一次重组的转化子经鉴定引物 JD-pyc-1/pyc-4 和 JD-pyc-2/pyc-3 进行菌落 PCR 验证，获得碱基数为 1 185 bp 的条带及无条带，而出发菌株分别获得 811 bp 和 1 617 bp 的条带如图 6(b) 所示。第二次重组的转化子经菌落 PCR 验证，分别获得碱基数为 1 185 bp 和 1 965 bp 的条带如图 6(c) 所

示。结合 DNA 测序结果，证明 P_{tuf} 替换成功，将其命名为 ILE-4。

摇瓶发酵实验结果表明，过表达 *pyc* 基因对菌株 ILE-4 生长无明显影响，但使其 *L*–异亮氨酸产量达到 4.9 g/L，较菌株 ILE-3 的提高 40%（图 7）。丙酮酸为 TCA 循环的前体物乙酰–CoA 的合成底物，而 TCA 循环与 *L*–异亮氨酸合成竞争草酰乙酸[27]。过表达 *pyc* 后，更多的丙酮酸用于草酰乙酸合成，故乙酰–CoA 的合成量减少，从而减弱 TCA 循环代谢流，促使草酰乙酸流向 *L*–异亮氨酸合成。



(a) 为重组片段及重组质粒 pK-*pyc* 鉴定图谱。M. GeneRuler 1 kbp；1. U_{pyc}；2. P_{tuf}；3. D_{pyc}；4. U_{pyc}-P_{tuf}-D_{pyc}；5. 转化有重组质粒 pK-*pyc* 的 *E. coli* DH5α。

(b) 为转化子单交换鉴定图谱。M. GeneRuler 1 kbp；1 和 3. 以 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板；2 和 4. 以一次重组菌株基因组 DNA 为模板。

(c) 为菌株 ILE-4 鉴定图谱。M. GeneRuler 1 kbp；1 和 3. 以 *C. glutamicum* SMR 基因组 DNA 为模板；2 和 4. 以二次重组菌株基因组 DNA 为模板。

图 6　重组菌株 ILE-4 的 PCR 鉴定图谱

Fig. 6　Map for PCR identification of recombinant strain ILE-4

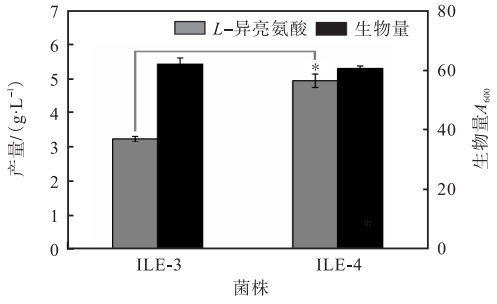


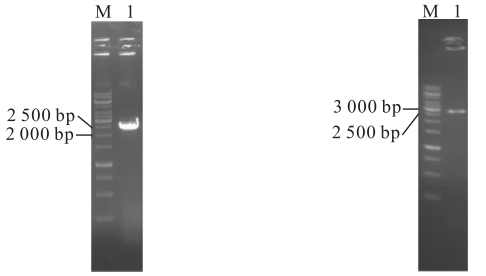
图 7　菌株 ILE-3 和 ILE-4 的发酵特性

Fig. 7　Fermentation characteristics of strains ILE-3 and ILE-4

2.4　增强 *L*–异亮氨酸输出对其合成的影响

强化代谢产物输出是提高其合成效率的重要代谢工程策略。在谷氨酸棒杆菌中，转运蛋白 BrnFE 能够输出所有分支链氨基酸[28-29]，编码基因 *brnFE* 的转录受调控因子 Lrp 的正向调节作用[5]。当胞内积累一定量的分支链氨基酸时，其促进 Lrp 与 *brnFE* 启动子 P_{brnFE} 的结合，从而激活后者转录[27]。

ILE-4 过表达 *brnFE* 基因，进一步提高其 *L*–异亮氨酸合成性能。为了考察 *brnFE* 的表达方式对 *L*–异亮氨酸合成的影响，分别采用 P_{brnFE} 和 P_{tuf} 启动子控制 *brnFE* 的转录。前者为受 *L*–异亮氨酸激活的诱导式表达，后者为组成型强表达。PCR 扩增 P_{brnFE}-*brnFE* 基因，连接至表达载体 pEC，获得重组质粒 pEC-1。分别扩增 P_{tuf} 和 *brnFE* 基因，经重叠 PCR 获得 P_{tuf}-*brnFE*，将其连接至表达载体 pEC，获得重组质粒 pEC-2。将质粒 pEC-1 和 pEC-2 分别转化至菌株 ILE-4。经菌落 PCR 鉴定，分别获得碱基数为 2 435 bp 和 2 654 bp 的条带（图 8），表明菌株构建成功，将其命名为 ILE-5 和 ILE-6。



M. GeneRuler 1 kbp；1. 菌落 PCR 验证。

图 8　重组菌株 ILE-5 和 ILE-6 的 PCR 鉴定图谱

Fig. 8　Map for PCR identification of recombinant strains ILE-5 and ILE-6

菌株 ILE-5 和 ILE-6 摇瓶发酵 48 h 后，生物量与对照菌株无显著差异，其 *L*–异亮氨酸产量分别达到 6.3 g/L 和 7.6 g/L（图 9），较菌株 ILE-4 提高 28.6% 和 55.1%，说明 P_{tuf} 效果优于 P_{brnFE}。推测原因可能是：一方面由于 P_{tuf} 的转录强度高于 P_{brnFE}，菌株 ILE-6 中 *brnFE* 表达量高于菌株 ILE-5，故而提高了 *L*–异亮氨酸的输出效率[30]；另一方面，由于 P_{tuf} 为组成型启动子，即菌株 ILE-6 中 *brnFE* 的转录无时间维度的

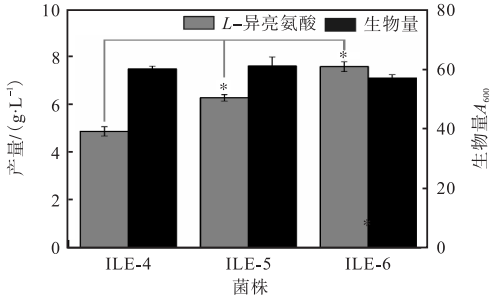


图 9　菌株 ILE-4、ILE-5 和 ILE-6 的发酵特性

Fig. 9　Fermentation characteristics of strains ILE-4, ILE-5 and ILE-6

限制，而 P_{brnFE} 为诱导型启动子，仅当 *L*–异亮氨酸高于阈值时方可激活 *brnFE* 转录，故存在表达时间局限性。

2.5　发酵罐发酵

由于菌株 ILE-6 的发酵性能优于菌株 ILE-5，故利用该菌种在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵，进一步考察其性能，结果如图 10 所示。菌株生长与 *L*–异亮氨酸合成呈非偶联型。0 ~ 4 h 为延滞期，8 ~ 32 h 为对数期，32 h 时生物量最高，其 A_{600} 达到 81.4，之后进入稳定期。8 h 时，发酵液中可检测到 *L*–异亮氨酸；进入对数期后产酸速率逐渐升高，24 ~ 40 h 时最高，之后逐渐降低。48 h 时 *L*–异亮氨酸的产量达到最高，为 21.3 g/L，此时糖酸转化率为 14.1%。

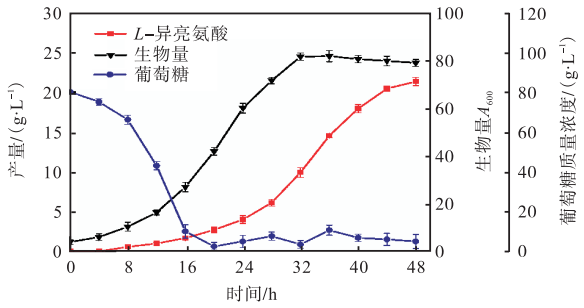


图 10　菌株 ILE-6 分批补料发酵过程曲线

Fig. 10　Fed-batch fermentation of strain ILE-6

3　结　语

以谷氨酸棒杆菌为出发菌株，利用代谢工程策略获得 *L*–异亮氨酸合成菌株 ILE-6，主要策略包括过表达丙酮酸羧化酶编码基因 *pyc* 和解除反馈抑制作用的天冬氨酸激酶编码基因 $lysC^{A279T}$ 增强前体物 *L*–苏氨酸合成，过表达解除反馈抑制作用的苏氨酸脱水酶和乙酰乳酸合酶编码基因 $ilvA^{G418A/T1147G}$ 及 $ilvBN^{A139T/T140A}$ 强化 *L*–异亮氨酸合成，过表达 *L*–异亮氨酸输出蛋白编码基因 *brnFE* 促进其输出。在 5 L 发酵罐中经 48 h 发酵，菌株 ILE-6 的 *L*–异亮氨酸产量和转化率分别达到 21.3 g/L 和 14.1%。菌株 ILE-6 的发酵周期显著短于已报道的菌株，且无营养缺陷亦无需诱导，所用策略可为分支链氨基酸菌株的代谢工程选育提供参考。

与现有报道采用质粒过表达不同，本研究在进行代谢工程改造时，主要采用基因组整合的方式过表达关键基因 *pyc* 和 $lysC^{A279T}$，该方式不会对菌株代谢造成过大负担，这可能是菌株发酵周期短的主要原因。菌株 ILE-6 的 *L*–异亮氨酸发酵产量低于部分已报道菌株，后续研究将着眼于提高还原力供应（如过表达 6–磷酸葡萄糖脱氢酶编码基因 *zwf*、转氢酶编码基因 *pntAB*、NAD 激酶编码基因 *ppnk*），强化 EMP 途径（如过表达葡萄糖转运蛋白编码基因 *iolT*1 或 *iolT*2、3–磷酸甘油醛脱氢酶编码基因 *gap* 等），弱化 TCA 循环（如干扰柠檬酸合酶编码基因 *gltA*、异柠檬酸脱氢酶编码基因 *icd* 转录），基因组整合过表达 $ilvA^{G418A/T1147G}$、$ilvBN^{A139T/T140A}$ 及 *brnFE* 等。

参考文献：

[1] HOLEČEK M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements[J]. Nutrition & metabolism, 2018, 15: 33.

[2] 陈宁. 氨基酸工艺学[M]. 2 版. 北京：中国轻工业出版社，2020.

[3] GU C, MAO X, CHEN D, et al. Isoleucine plays an important role for maintaining immune function[J]. Current protein & peptide science, 2019, 20(7): 644–651.

[4] O'RIELLY R, LI H, LIM S M, et al. The effect of *L*-isoleucine supplementation on body weight gain and blood glucose response in lean and obese mice[J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2446.

[5] YU S, ZHENG B, CHEN Z, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids[J]. Microbial cell factories, 2021, 20(1): 230.

[6] 芦楠，李宇虹，陈宁，等. *L*–异亮氨酸及其衍生物代谢工程研究进展[J]. 食品与发酵工业，2021，47(9)：307–313.

[7] WANG Y, BAI Y, ZENG Q, et al. Recent advances in the metabolic engineering and physiological opportunities for microbial synthesis of *L*-aspartic acid family amino acids: a review[J]. International journal of biological macromolecules, 2023, 253(3): 126916.

[8] EFSA Panel on Additive and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), BAMPIDIS V, AZIMONTI G, et al. Scientific opinion on the presence of DNA in the feed additive consisting of *L*-isoleucine produced by *Coryne-bacterium glutamicum* KCCM 80185 for all animal species (CJ Europe GmbH)[J]. EFSA Journal, 2023, 21(4): e07957.

[9] FEIERABEND M, RENZ A, ZELLE E, et al. High-quality genome-scale reconstruction of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. Frontiers in microbiology, 2021, 12: 750206.

[10] ZHANG Y, WEI M, ZHAO G, et al. High-level produc-

tion of *L*-homoserine using a non-induced , non-auxotrophic *Escherichia coli* chassis through metabolic engineering[J]. Bioresource technology , 2021 , 327 : 124814.

[11] XIE X, XU L, SHI J, et al. Effect of transport proteins on *L*-isoleucine production with the *L*-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW[J]. Journal of industrial microbiology and biotechnology , 2012 , 39(10) : 1549–1556.

[12] SHI F, LI K, HUAN X, et al. Expression of NAD(H) kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase improve NADPH supply and *L*-isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum*[J]. Applied biochemistry and biotechnology , 2013 , 171(2) : 504–521.

[13] YIN L, ZHAO J, CHEN C, et al. Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase *L*-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology and bioprocess engineering, 2014, 19: 132–142.

[14] VOGT M, KRUMBACH K, BANG W G, et al. The contest for precursors: channelling *L*-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* without byproduct formation[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(2) : 791–800.

[15] GUO Y, XU J, HAN M, et al. Generation of mutant threonine dehydratase and its effects on isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. World journal of microbiology & biotechnology, 2015, 31(9) : 1369–1377.

[16] DONG X, ZHAO Y, ZHAO J, et al. Characterization of aspartate kinase and homoserine dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* IWJ001 and systematic investigation of *L*-isoleucine biosynthesis[J]. Journal of industrial microbiology and biotechnology , 2016 , 43(6) : 873–885.

[17] MA W, WANG J, LI Y, et al. Enhancing pentose phosphate pathway in *Corynebacterium glutamicum* to improve *L*-isoleucine production[J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2016, 63(6) : 877–885.

[18] MA W, WANG J, LI Y, et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-produced with *L*-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* WM001[J]. Microbial cell factories, 2018, 17(1) : 93.

[19] MA W, WANG J, LI Y, et al. Cysteine synthase A overexpression in *Corynebacterium glutamicum* enhances *L*-isoleucine production[J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2019, 66(1) : 74–81.

[20] ZHANG Y, LIU Y, ZHANG S, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve *L*-isoleucine production[J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2021, 68(3) : 568–584.

[21] LI H, XU D, ZHANG D, et al. Improve *L*-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* WM001 by destructing the biosynthesis of trehalose dicorynomycolate[J]. Microbiological research, 2023, 272: 127390.

[22] 芦楠. 谷氨酸棒杆菌 *L*–异亮氨酸生物合成途径的代谢工程重构[D]. 天津: 天津科技大学, 2023.

[23] 魏敏华, 李宇虹, 张佳蓉, 等. 代谢工程构建谷氨酸棒杆菌合成 5–氨基乙酰丙酸[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14) : 9–15.

[24] DING X, YANG W, DU X, et al. High-level and -yield production of *L*-leucine in engineered *Escherichia coli* by multistep metabolic engineering[J]. Metabolic engineering, 2023, 78: 128–136.

[25] SHIMIZU K, MATSUOKA Y. Feedback regulation and coordination of the main metabolism for bacterial growth and metabolic engineering for amino acid fermentation[J]. Biotechnology advances, 2022, 55: 107887.

[26] WANG Y, ZHANG F, XU J, et al. Improvement of *L*-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by altering the redox flux[J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(8) : 14.

[27] ZHANG C, LI Y, MA J, et al. High production of 4-hydroxyisoleucine in *Corynebacterium glutamicum* by multistep metabolic engineering[J]. Metabolic engineering, 2018, 49: 287–298.

[28] 谭海, 顾阳, 卢南巡, 等. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌促进 *L*–异亮氨酸发酵合成的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(9) : 1–6.

[29] KENNERKNECHT N, SAHM H, YEN M R, et al. Export of *L*-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two gene-encoded member of a new translocator family[J]. Journal of bacteriology, 2002, 184: 3947–3956.

[30] BECKER J, KLOPPROGGE C, ZELDER O, et al. Amplified expression of fructose 1 , 6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(12) : 8587–8596.

责任编辑：郎婧