

敲除 *pknG* 提高谷氨酸棒杆菌 L-谷氨酸和 GABA 产量

王楠楠^{1,2,3}, 倪亚兰^{1,2,3}, 史 锋^{*1,2,3}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: γ -氨基丁酸(GABA)具有多种生理功能,被广泛应用于食品、医药等行业。在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中表达来自短乳杆菌的两个谷氨酸脱羧酶(GAD)编码基因 *gadB1*、*gadB2*,可将其自身积累的 L-谷氨酸有效转变成 GABA。为了进一步提高 GABA 产量,首先在 ATCC13032 中敲除了丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknG 的编码基因 *pknG*,以提高 GABA 的前体物质 L-谷氨酸的供应,然后将 GAD 表达质粒 pJYW-4-*gadB1*-*gadB2* 转入 *pknG* 敲除菌株和 ATCC13032 中,构建出重组菌 SNW203 和 SNW200,最后对两个重组菌进行上罐发酵。结果表明:相对于 SNW200,菌株 SNW203 的 L-谷氨酸和 GABA 产量都有所提高。发酵 72 h 后,GABA 产量为(30.2±0.3) g/L,相对于 SNW200 提高了 55.4%,L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度为 0.3 mol/L,提高了 36.4%。这说明敲除 *pknG* 能够促进重组谷氨酸棒杆菌的 L-谷氨酸和 GABA 生物合成。

关键词: γ -氨基丁酸;谷氨酸棒杆菌;*pknG* 基因

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)02—0187—07

Deletion of *pknG* Improves the Production of L-Glutamate and GABA in Recombinant *Corynebacterium glutamicum*

WANG Nannan^{1,2,3}, NI Yalan^{1,2,3}, SHI Feng^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: GABA (γ -aminobutyric acid (GABA)), which has a variety of physiological functions, is widely used in food, pharmaceutical and other industries. Two L-glutamate decarboxylase (GAD) genes (*gadB1* and *gadB2*) were co-expressed previously in an L-glutamate producing strain *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, making the own accumulated L-glutamate be effectively transformed into GABA. To further enhance GABA production, the *pknG* gene encoding serine/threonine protein kinase PknG was deleted to improve the supply of GABA precursor L-glutamate. Then the co-expression plasmid pJYW-4-*gadB1*-*gadB2* was transformed into *pknG* deletion strain and ATCC13032, generating the recombinant *C. glutamicum* strains SNW203 and

收稿日期: 2015-04-16

基金项目: 食品科学与技术国家重点实验室自主科研课题项目(SKLF-ZZB-201405)。

* 通信作者: 史 锋(1970—),女,江苏丹阳人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物代谢工程与基因工程研究。

E-mail: shifeng@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王楠楠,倪亚兰,史 锋. 敲除 *pknG* 提高谷氨酸棒杆菌 L-谷氨酸和 GABA 产量[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(02):187-193.

SNW200. After the strains were fermented in fermenters, the production of both L-glutamate and GABA in SNW203 increased greatly when compared with SNW200. At 72 h of fermentation, GABA production in SNW203 increased to (30.2 ± 0.3) g/L, 55.4% higher than that in SNW200 and the total concentration of L-glutamate and GABA reached up to 0.3 mol/L, 36.4% higher than that in SNW200. This result indicates that the deletion of *pknG* improves the biosynthesis of L-glutamate and GABA in recombinant *C. glutamicum*.

Keywords: γ -aminobutyric acid, *Corynebacterium glutamicum*, *pknG* gene

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质氨基酸,是哺乳动物中枢神经系统一种重要的抑制性神经递质,具有降血压、镇静安神^[1]、健肝利肾、调节激素分泌^[2]、抑制癌症等功能。因此, GABA 作为一种功能性因子被广泛应用于食品、医药等行业。GABA 是由谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD)催化 L-谷氨酸发生 α -脱羧反应生成的。几种细菌 GAD 基因已被确定,比如大肠杆菌(*Escherichia coli*)和乳酸菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)。LAB 是对人类和动物有益的益生菌群,因此是最适合生产 GABA 的微生物^[3]。然而,通过 LAB 生产 GABA 需要添加 L-谷氨酸作为前体物质,并且 LAB 的培养需要昂贵的氮源。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*),是一种好氧型的、非致病革兰氏阳性菌,它是一种重要的工业微生物,用来发酵生产 L-谷氨酸和其它氨基酸^[4],及其它各种有机酸^[5]。*C. glutamicum* 中不存在 GAD 基因,在简单的培养基中就能生长,相对于 LAB 的培养,成本很低。本课题组前期在 *C. glutamicum* ATCC13032 共表达了两个 GAD 基因(*gadB1* 和 *gadB2*),摇瓶发酵 84 h 时, GABA 产量达到了 (18.7 ± 2.1) g/L^[6]。L-谷氨酸转化为 GABA 的转化率达到 0.60 mol/mol。为了进一步提高 GABA 的产量,作为 GABA 的唯一的、前体物质 L-谷氨酸的合成必须加强。

C. glutamicum 中, L-谷氨酸是由谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH)催化 α -酮戊二酸(α -Ketoglutarate, α -KG)直接合成的,但是 α -酮戊二酸脱氢酶复合体(α -Ketoglutarate dehydrogenase complex, ODHC)也会催化 α -KG 生成琥珀酰辅酶 A, 因此减少了 L-谷氨酸合成的代谢流。而 *pknG* 会影响 ODHC 的活性,具体作用机制如图 1。

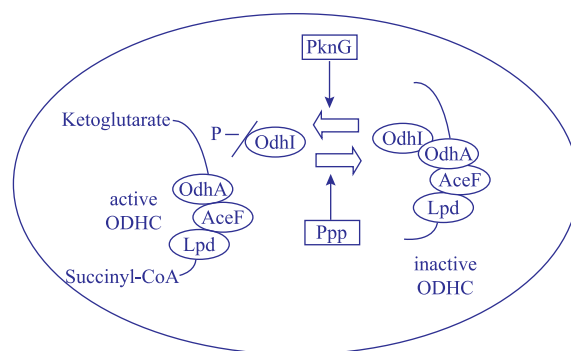


图 1 ODHC 的亚基组成和 OdhI、PknG 对 ODHC 活性的调控

Fig. 1 ODHC subunits and the regulation of ODHC activity by OdhI and PknG

ODHC 由三个亚基(图 1)组成: α -酮戊二酸脱氢酶(E1 亚基, OdhA)、二氢硫辛酰琥珀酰转移酶(E2 亚基, AceF)、二氢硫辛酰脱氢酶(E3 亚基, Lpd)^[7]。OdhI(α -酮戊二酸脱氢酶抑制剂)是 E1 亚基 OdhA 的一个抑制蛋白质,非磷酸化的 OdhI 可以与 OdhA 相互作用,从而抑制 ODHC 的活性。而丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknG 催化 OdhI 磷酸化而使 OdhI 失活^[8],所以敲除 PknG 的编码基因 *pknG* 会降低 ODHC 的活性,从而有利于 L-谷氨酸的合成。为此对 *pknG* 基因进行敲除,研究它对重组菌 GABA 及其前体物质 L-谷氨酸合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物 本研究中用到的菌株和质粒见表 1,引物见表 2。

1.1.2 培养基和培养条件

1)培养 *E. coli* 时均用 LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,氯化钠 10;筛选转化子需加入 30 mg/L 卡那霉素。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids in this research

菌株和质粒	特征描述	来源
菌株		
JM109	Wild type <i>E. coli</i>	Novagen
ATCC13032	Wild type <i>C. glutamicum</i>	ATCC
SNW103	<i>pknG</i> deletion mutant of <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	作者研究课题
SNW200	ATCC 13032 harbouring pJYW-4- <i>gadB1-gadB2</i>	作者研究课题
SNW203	SNW103 harbouring pJYW-4- <i>gadB1-gadB2</i>	作者研究课题
质粒		作者研究课题
pBluescript II SK	Cloning vector, ColE1, lacZ, Amp ^r	Stratagene
pDTW202	Derived from pBluescript II SK by inserting the segment <i>loxL-kan-loxR</i>	[9]
pSNW3	Derived from pBluescript II SK by inserting the segment <i>pknGU-loxL-kan-loxR-pknGD</i>	作者研究课题
pDTW109	Derived from pDTW109 by inserting a <i>cre</i> gene	[9]
pJYW-4- <i>gadB1-gadB2</i>	<i>gadB1-gadB2</i> expression plasmid, Kan 研究课题	[11]

表 2 本研究用到的引物

Table 2 Primers in this research

引物	核苷酸序列 (5'-3')	酶切位点
<i>kanL</i> -F	CTACTCGAGAATACGACTCACTATAGG GCG	<i>Xho</i> I
<i>kanL</i> -R	ACCTCTAGAGCGCAATTAACCCTCACT AAAG	<i>Xba</i> I
<i>pknGU</i> -F	CGGAAGCTTGAAGTAATAGAGAATTGG CC	<i>Hind</i> III
<i>pknGU</i> -R	CCGCTCGAGTTCCACCACCATTGACCT	<i>Xho</i> I
<i>pknGD</i> -F	TGCTCTAGACCTTCGAATCACTCAGC	<i>Xba</i> I
<i>pknGD</i> -R	CCCGGTACCACAGATCCCACTTTTCCTT T	<i>Kpn</i> I
GU	CATCGCAGCACAGGATCCCTACAC	
GD	AACAAAGGGTTCGCGGAGG	

2) *C. glutamicum* 用 LBG 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 5。

3) *C. glutamicum* 感受态培养基 (g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, 吐温 80 1, 甘氨酸 30。

4) *C. glutamicum* 电转化恢复培养基 LBHIS (g/L): 酵母膏 2.5, 蛋白胨 5, 氯化钠 5, 脑心浸液 18.5, 山梨醇 91; 筛选转化子需加入 30 mg/L 卡那霉素或者 15 mg/L 氯霉素。

5) *C. glutamicum* 工程菌发酵种子培养基 (g/L): 葡萄糖 25, 玉米浆 30, 尿素 8, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1, $MgSO_4$ 0.2; 卡那霉素 30 mg/L; pH 7.2。

6) *C. glutamicum* 工程菌发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 玉米浆 2, 尿素 4, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2, $MgSO_4$ 0.4, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.29; 卡那霉素 30 mg/L, pH 7.2。

1.1.3 工具酶和主要试剂 各种限制性内切酶, *rTaq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, DNA Ladder Marker, 购自 Fermentas 公司; 核酸染料 GoldView, 购于上海赛百盛基因技术有限公司; OPA, GABA 标样, 购于 Sigma 公司; 蛋白胨, 酵母膏, 脑心浸液, 购于英国 OXOID 公司; 色谱纯乙腈, 甲醇, 0.22 μm 有机相和水相滤膜, 购于上海安普科学仪器有限公司; 其它试剂均购于国药集团上海化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *pknG* 敲除菌株的构建 基因的敲除采用谭延振^[12]和 Hu 等^[9]报道的方法, 原理是基于同源重组和位点特异性重组。首先, 在 *E. coli* JM109 中构建 *pknG* 基因的敲除质粒, 再转入 *C. glutamicum* ATCC13032 中, 使其发生同源重组从而敲除目的基因, 然后转入携带 *cre* 基因的质粒使位于 *kan* 片段两端的 *lox* 位点发生位点特异性重组, 从而去除 *kan* 片段, 最后去除携带 *cre* 的质粒, 进而得到 *pknG* 敲除菌株。 *E. coli* JM109 和 *C. glutamicum* 感受态细胞制备方法和转化方法参照 Xu 等^[13]报道的方法。

1) *pknG* 敲除质粒的构建过程: *pknG* 敲除质粒的构建过程如图 2 所示: 首先, 以 *C. glutamicum* ATCC13032 的基因组为模板, *pknGU*-F/*pknGU*-R (5'-3' 端引入的酶切位点是: *Hind* III 和 *Xho* I) 和 *pknGD*-F/*pknGD*-R (酶切位点是: *Xba* I 和 *Kpn* I) 这两对引物, 分别 PCR 扩增出 *pknG* 基因的上游同源臂片段 *pknGU* 和下游同源臂片段 *pknGD*。其次, 以质粒 pDTW-202 为模板, *kanL*-F/*kanL*-R (酶切位点是: *Xho* I 和 *Xba* I) 为引物, 扩增出 *kan* 基因片段, 片段两端含有被 Cre 酶识别的 *lox* 位点。最后将 *pknG* 基因的上下游片段、*kan* 片段和相应酶切过的 pBluescript II SK 的质粒连接, 得到的新质粒即是 *pknG* 基因敲除质粒, 命名为 pSNW3。

2) *pknG* 敲除菌株的构建过程:

① 将敲除质粒 pSNW3 电转入 *C. glutamicum*

ATCC13032, 涂布于含有卡那霉素的恢复培养基

LBHIS 平板上, 30 °C 培养 3 d 左右。

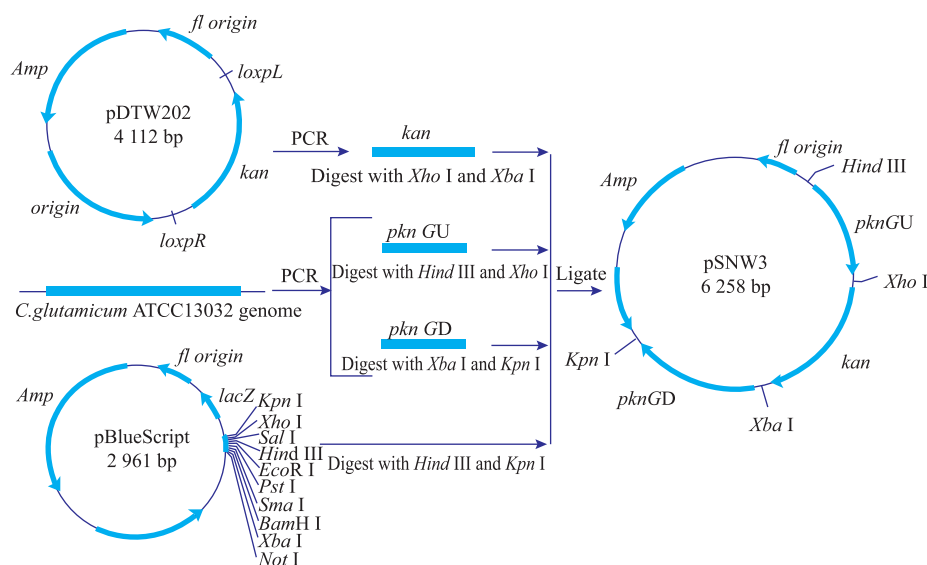


图 2 *pknG* 基因敲除质粒 pSNW3 的构建过程

Fig. 2 Construction of *pknG* gene deletion plasmid pSNW3

②挑取平板上的转化子培养并进行 PCR 验证, 选取验证正确的转化子, 即同源重组后基因组带有 *kan* 基因片段的菌株, *kan* 两端带有可以被 Cre 酶识别的 *lox* 位点。对此菌株进行感受态细胞的制备。

③为了去除基因组上的 *kan* 基因, 把质粒 pDTW109 电转入上述感受态细胞中, 此质粒是带有 Cre 酶的温敏型质粒, 在 37 °C 会丢失。然后涂布于含有氯霉素的恢复培养基 LBHIS 平板上, 25 °C 培养一段时间至转化子长出, 使基因组上的 *kan* 两端发生位点特异性重组。

④选取平板上的转化子进行 PCR 验证, 挑取转化子验证 *kan* 基因片段是否去除, 如果 *kan* 已经去除, 将其接种于液体 LBG 培养基, 37 °C 过夜培养, 去除质粒 pDTW109。

⑤挑取过夜培养的菌液于 LBG 固体划线, 30 °C 培养 24 h 后挑取单菌落进行 PCR 验证和抗性验证。PCR 验证正确并且在含有卡那霉素或者氯霉素的平板上均不生长的即为 *pknG* 敲除菌株, 命名为 SNW103。

1.2.2 GAD 表达菌株的构建 *gadB1* 和 *gadB2* 是编码 GAD 的两个基因, 研究表明^[10], 基因 *gadB1-gadB2* 的共表达比两个基因的单表达更有利于 GABA 的积累。

对 *pknG* 敲除菌 SNW103 和野生型 ATCC13032 进行感受态细胞制备, 将携带卡那霉素抗性基因的

GAD 表达质粒 pJYW-4-*gadB1-gadB2*^[11] 分别转入两个菌株。构建 GAD 表达菌 SNW103/pJYW-4-*gadB1-gadB2*, 命名为 SNW203; ATCC13032/pJYW-4-*gadB1-gadB2*, 命名为 SNW200。

1.2.3 *C. glutamicum* 工程菌株的上罐发酵

C. glutamicum 工程菌株的上罐发酵方法参照 Wang 等^[11]报道的方法。发酵周期为 72 h, 每隔 12 h 取样一次, 待发酵结束后, 用高压液相色谱 (HPLC) 测定各个时间点的 L-谷氨酸和 GABA 的产量。

1.2.4 发酵过程中残糖和氨基酸含量测定 残糖: 发酵过程中取出的发酵液离心取上清液, 用 ddH₂O 稀释 100 倍后直接用生物传感分析仪测定葡萄糖的质量浓度。

氨基酸含量测定: 氨基酸含量测定方法是邻苯二甲醛 (OPA) 自动柱前衍生法^[10]。

2 结果与讨论

2.1 敲除 *pknG* 的 GAD 菌的构建

首先, 构建 *pknG* 敲除质粒 pSNW3, 构建过程如 1.2.1 所述。随后将 *pknG* 敲除质粒 pSNW3 转入 *C. glutamicum* ATCC13032 进行同源重组, 使抗性标记基因 *kan* 与 *pknG* 基因进行替换。然后通过 Cre 酶识别的 *lox* 位点进行位点特异性重组, 去除抗性标记基因 *kan*, 得到 *pknG* 敲除菌株 SNW103。构建过程如 1.2.1 所述。对构建得到的敲除菌株基因组

进行 PCR 验证,以 GU/GD(上游同源臂和下游同源臂中间位置设计的引物)为引物,产物大小为 1 000 bp 左右,如图 3 的 1 泳道。图 3 的 2 泳道是对野生型 ATCC13032 基因组 PCR 得到的产物,大小为 2 581 bp,是 *pknG* 基因未敲除的大小。对比可以得出,*pknG* 基因敲除成功。

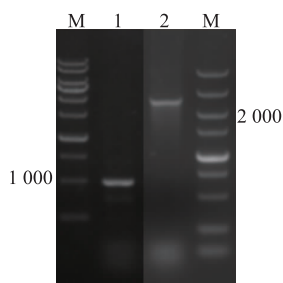


图 3 敲除菌株 SNW103 和野生型 ATCC13032 基因组 PCR 验证电泳图

Fig. 3 Verification of the deletion strain SNW103 and wild type ATCC13032 by PCR

最后将 GAD 共表达质粒转入 *pknG* 敲除菌株 SNW103 和 ATCC13032 中,得到 *pknG* 敲除 GAD 菌 SNW203 和野生型 GAD 菌 SNW200。

2.2 *pknG* 敲除 GAD 菌 SNW203 和野生型 GAD 菌 SNW200 的上罐发酵

分别对菌株 SNW203 和 SNW200 进行上罐发酵。

2.2.1 发酵过程的控制 在 L-谷氨酸和 GABA 合成过程中,GDH(最适 pH 为 7.5)和 GAD(最适 pH 为 4.5)是非常重要的两个酶。为了使这两个酶发挥活性,必须将发酵过程控制为两个不同 pH 阶段。0~36 h,L-谷氨酸发酵阶段;36~72 h,GABA 合成阶段。

在发酵前期 0~36 h,发挥作用的主要是 GDH,L-谷氨酸大量合成。在发酵起始时,添加 4 g/L 的尿素作为氮源来维持菌体的生长,这时,pH 会上升,所以流加 2 mol/L HCl 来控制 pH 值在 7.0~7.5 之间;当 pH 开始下降时,流加质量浓度 10 g/dL 尿素控制 pH 值在 7.0~7.5 之间,同时提供了 L-谷氨酸合成时所需要的氮源。

在发酵后期 36~72 h,发挥作用的主要是 GAD,GABA 大量合成。36 h 之后,停止添加尿素,L-谷氨酸的积累量达到了很高,这时,pH 会下降。当 pH 降到适合 GAD 发挥活性的值时,GAD 开始发挥作用,L-谷氨酸开始转化成 GABA,这时 pH 又会升高。要

使 GAD 充分发挥活性,pH 要维持在 5.0~5.5 之间,所以流加 2 mol/L HCl 来控制 pH 值。

发酵周期 72 h,种子转接体积分数是 8%,发酵在装有 1.2 L 发酵培养基的 3 L NBS 罐中进行,温度 30 ℃,溶氧控在体积分数 30%,转速和溶氧偶联。每隔 12 h 取样,分别测定 OD₅₆₂、残糖、L-谷氨酸和 GABA 产量。

2.2.2 发酵过程中 OD₅₆₂、残糖以及耗糖的变化 发酵过程中,菌株 SNW203 和 SNW200 的 OD₅₆₂ 变化情况如图 4 所示。0~12 h 是菌体快速生长的时期,24 h 之后缓慢增长,36~72 h 基本平稳,但稍有下降。发酵 72 h 结束时,SNW203 的 OD₅₆₂ 稍高于菌株 SNW200,说明 *pknG* 基因敲除后没有影响菌体的生长。

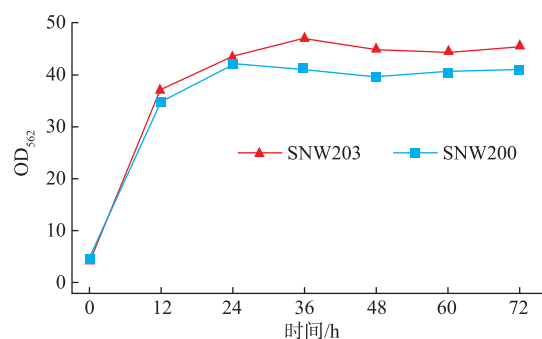


图 4 SNW203 和 SNW200 的生长

Fig. 4 Growth of SNW203 and SNW200 cells

菌株 SNW203 和 SNW200 发酵过程中的残糖和耗糖情况见图 5。

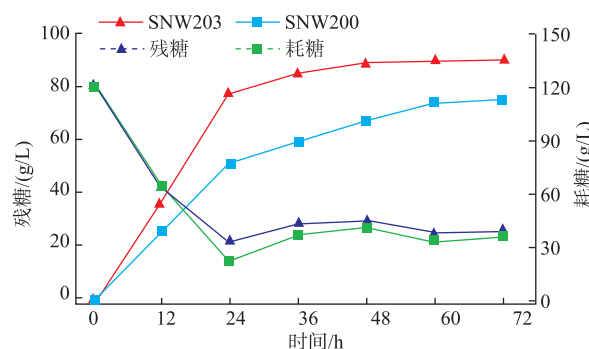


图 5 菌株 SNW203 和 SNW200 的残糖和耗糖变化

Fig. 5 Residual glucose and glucose consumption of SNW203 and SNW200

从残糖变化来看,0~24 h,葡萄糖被快速消耗,此过程是菌体快速生长和 L-谷氨酸快速合成时期,

所以葡萄糖消耗很快。24 h 之后,如果残糖小于 20 g/L,则需要补加葡萄糖使其维持在 20 g/L 以上。24~36 h,葡萄糖消耗比较缓慢,主要用于 L-谷氨酸的合成。36~72 h 之间,葡萄糖消耗得很少,这个过程主要是 L-谷氨酸转化成 GABA 的过程,所以耗糖比较少。发酵 72 h 结束时,菌株 SNW200 的总耗糖为 (112.7 ± 7.5) g/L,菌株 SNW203 的总耗糖为 (135.1 ± 10.2) g/L,比菌株 SNW200 高出 19.9%。

2.2.3 发酵过程 L-谷氨酸和 GABA 的产量以及总浓度的变化 发酵过程中,菌株 SNW203 和 SNW200 的 L-谷氨酸和 GABA 的产量变化如图 6 所示。两个菌株 L-谷氨酸和 GABA 的积累趋势是相似的,但是产量相差很大。在对照菌株 SNW200 中,0~36 h,L-谷氨酸大量积累,36 h 到达最高值 (34.7 ± 5.8) g/L,随后缓慢下降。36 h 之后,L-谷氨酸开始转化成 GABA,GABA 开始积累,到 72 h 发酵结束时,GABA 的最终产量为 (19.4 ± 2.6) g/L。最终 L-谷氨酸转化成 GABA 的摩尔转化率达到 88%。在 *pknG* 敲除 GAD 菌 SNW203 中,0~36 h,L-谷氨酸大量积累,36 h 到达最高值 (44.8 ± 5.3) g/L,随后迅速下降,L-谷氨酸的最高产量比菌株 SNW200 的最高产量高了 29.2%。36 h 之后,L-谷氨酸开始转化成 GABA,GABA 开始积累,72 h 发酵结束后,GABA 的最终产量为 (30.2 ± 0.3) g/L,比 SNW200 高出 55.4%。最终 L-谷氨酸的摩尔转化率为 96%。

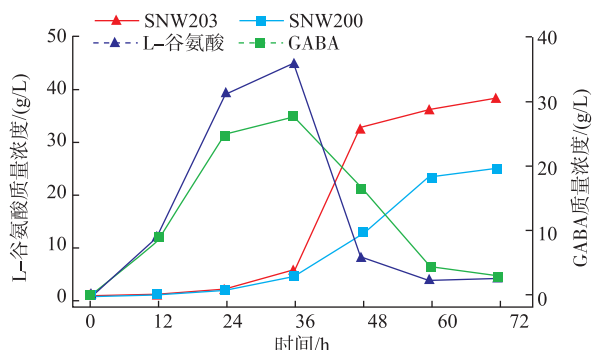


图 6 菌株 SNW203 和 SNW200 的 L-谷氨酸和 GABA 浓度变化

Fig. 6 L-glutamate and GABA concentrations of SNW203 and SNW200

菌株 SNW203 和 SNW200 的 L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度的变化如图 7 所示。

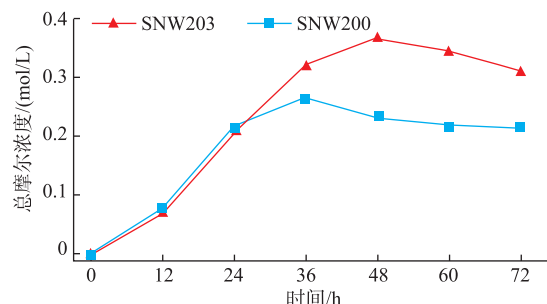


图 7 SNW203 和 SNW200 的 L-谷氨酸和 GABA 总浓度变化

Fig. 7 Total concentration of L-glutamate and GABA of SNW203 and SNW200

在对照菌株 SNW200 中,0~36 h,L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度在不断升高,36 h 达到最高值 0.26 mol/L,随后有所降低,72 h 发酵结束后,L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度是 0.22 mol/L,GABA 的糖酸转化率达到 0.33 mol/mol。

在 *pknG* 敲除 GAD 菌 SNW203 中,0~36 h,L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度在不断升高,48 h 达到最高值 0.32 mol/L,随后有所降低,发酵 72 h 结束时,L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度是 0.30 mol/L,相对于 SNW200 提高了 36.7%,发酵过程中的总摩尔浓度始终比 SNW200 高。GABA 的糖酸转化率达到 0.39 mol/mol。

综上所述,敲除 *pknG* 基因后,有利于 L-谷氨酸和 GABA 的积累。

另外,从图 6 中可以看出,36~48 h,菌株 SNW203 的 L-谷氨酸是迅速下降,而 GABA 是迅速升高,上升和下降的速度高于对照菌株 SNW200。并且在 48 h,绝大部分的 L-谷氨酸已经转化成了 GABA,转化速度非常快。因此在发酵过程中,可以进一步考虑缩短菌株 SNW203 的发酵周期,这样更有利于 GABA 的工业化生产。

3 结 语

在 *C. glutamicum* ATCC13032 中共表达了两个 GAD 基因(*gadB1* 和 *gadB2*),可以有效地将其自身合成的 L-谷氨酸转化为 GABA。为了进一步提高 GABA 的产量,作为 GABA 的唯一的的前体物质 L-谷氨酸的合成必须加强。因此本研究中敲除 *pknG* 基因,来提高 L-谷氨酸的供应,进而提高 GABA 的产量。首先,构建了 *pknG* 敲除菌株 SNW103,然后将

共表达 GAD 质粒转入 SNW103 和 ATCC13032,得到 *pknG* 敲除 GAD 菌 SNW203 和对照 GAD 菌 SNW200。

两个 GAD 菌株的上罐结果表明,*pknG* 敲除后,GABA 的产量从 (19.4 ± 2.6) g/L 提高到 (30.2 ± 0.3) g/L,提高了 55.4%。L-谷氨酸的最高产量从 (34.7 ± 5.8) g/L 提高到 (44.8 ± 5.3) g/L,提高了 29.2%。发酵结束后,L-谷氨酸和 GABA 的总摩尔浓度从 0.22 mol/L

提高到 0.30 mol/L,提高了 36.4%。可以看出,敲除 *pknG* 基因后,GABA 和 L-谷氨酸的产量都有所提高,*pknG* 基因的敲除起到了很好的效果。

72 h 发酵结束后,*pknG* 敲除 GAD 菌 SNW203 的 GABA 产量有大幅度提高,L-谷氨酸摩尔转化率为 96%,更有利于后期 GABA 的分离和纯化,为其工业化应用奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] WANG Jiaojiao, BAI Weidong, LIANG Binxia. The physiological functions and enrichment research progress of the γ -aminobutyric acid[J]. **Academic Periodical of Farm Products Processing**, 2012(1): 40-45. (in Chinese)
- [2] LIN Qian. Outline of physiologic function of γ -aminobutyric acid[J]. **Journal of Yulin Normal University**, 2010, 31(2): 62-65. (in Chinese)
- [3] LI H X, CAO Y S. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid[J]. **Amino Acid**, 2010, 39: 1107-1116.
- [4] TSUCHIDA T, YOSHINAGA F, KUBOTA K. Production of L-valine by 2-thiazolealanine resistant mutants derived from glutamic acid producing bacteria[J]. **Agric Biol Chem**, 1975, 39: 1319-1322.
- [5] WENDISCH V F, BOTT M, EIKMANN B J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids[J]. **Curr Opin Microbiol**, 2006(9): 268-274.
- [6] SHI F, JIANG J J, LI Y X, et al. Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by co-expressing two glutamate decarboxylase genes from *Lactobacillus brevis*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2013, 40: 1285-1296.
- [7] KRAWCZYK S, RAASCH K, SCHULTZ C, et al. The FHA domain of OdhI interacts with the carboxyterminal 2-oxoglutarate dehydrogenase domain of OdhA in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **FEBS Lett**, 2010, 584: 1463-1468.
- [8] NIEBISCH A, KABUS A, SCHULTZ C, et al. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein[J]. **J Biol Chem**, 2006, 281: 12300-12307.
- [9] HU J Y, TAN Y Z, LI Y Y, et al. Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Plasmid**, 2013, 70: 303-313.
- [10] 江君君. 谷氨酸棒杆菌中共表达短乳杆菌来源的谷氨酸脱羧酶生产 γ -氨基丁酸[D]. 无锡: 江南大学 生物工程学院, 2013.
- [11] WANG N N, NI Y L, SHI F. Deletion of *odhA* or *pyc* induce efficient γ -aminobutyric acid and its precursor L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Biotechnol Lett**, 2015.
- [12] 谭延振. 谷氨酸棒状杆菌基因敲除系统的构建[D]. 无锡: 江南大学 生物工程学院, 2012.
- [13] XU D Q, TAN Y Z, HUAN X J, et al. Construction of novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer[J]. **J Microbiol Methods**, 2010, 80: 86-92.