



张晓霞,陈胜玲,朱枝群,等. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌促进 L-赖氨酸高效合成研究[J]. 轻工学报,2022, 37(5):1-11.
ZHANG X X, CHEN S L, ZHU Z Q, et al. Metabolic engineering for improving the L-lysine production by *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(5):1-11. DOI:10.12187/2022.05.001

代谢工程改造枯草芽孢杆菌促进 L-赖氨酸高效合成研究

张晓霞¹, 陈胜玲², 朱枝群¹, 康春涛¹, 徐建中²

1. 江苏星海生物科技有限公司, 江苏 盐城 224233;
2. 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

摘要: 为了构建具有益生功能和 L-赖氨酸合成功能的“双功能”枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 重组菌株, 对饲料工业常用的益生菌 *B. subtilis* ATCC11025 进行系统的代谢工程改造。结果表明: 以来源于谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 的 *lysC*³¹¹、*zwf*²³⁴ 和 *gnd*³⁶¹ 替换 *B. subtilis* 中的 *thrD*、*zwf* 和 *gnd*, 即构建重组菌 *B. subtilis* XH4, 有利于 L-赖氨酸的合成, 其产量达到 (20.3±1.9) g/L; 将 *B. subtilis* 中 *hom* 替换成来源于 *C. glutamicum* 的 *hom*⁵⁹, 即构建重组菌 *B. subtilis* XH5, 可显著降低副产物积累量, 提高 L-赖氨酸产量至 (23.2±1.7) g/L, 且不影响菌体生长; 在重组菌 *B. subtilis* XH5 中引入 *C. glutamicum* 中的 DapDH 会改变二氨基庚二酸途径 (DAP) 碳分布进而促进 L-赖氨酸的合成, 目标重组菌 *B. subtilis* XH6 的 L-赖氨酸产量达到 (25.6±2.3) g/L。

关键词: 枯草芽孢杆菌; L-赖氨酸合成; CRISPR-Cas9; 反馈调节; 代谢工程

中图分类号: TS264 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2022)05-0001-11

0 引言

L-赖氨酸是八大必需氨基酸之一, 动物和人自身均无法合成。L-赖氨酸广泛应用于动物饲料中, 可平衡饲料中氨基酸的组成, 提高动物对氨基酸的摄取和代谢, 促进家畜、家禽、鱼类等的生长发育, 进而提高饲料蛋白质的利用率, 节约生产成本, 减少环境污染。谷类赖氨酸在加工过程中极易被破坏, 致使饲料中的 L-赖氨酸得率极低, 故 L-赖氨酸被称为第一限制性氨基酸^[1]。目前, 全球 L-赖氨酸年产量估计为 2.2×10^6 t, 并以每年 10% 左右的速度增

长, 在世界范围内是除 L-谷氨酸之外的第二大氨基酸^[2]。目前, 工业上用于发酵生产 L-赖氨酸的菌种主要有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。然而, 将 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 直接应用于动物饲料存在含内毒素、适口性差等缺陷。自 2013 年起, 国家规定的饲料添加剂目录里已明文规定饲料级 L-赖氨酸中不得含有 *E. coli*, 而市场上主要 L-赖氨酸产品中 L-赖氨酸的纯度一般为 65% 或 70%^[3]。因此, 亟需开发具有食品安全性的微生物底盘细胞用于发酵生产饲用 L-赖氨酸。

收稿日期: 2022-02-13

基金项目: 苏北科技专项-先导性项目 (SZ-YC202105)

作者简介: 张晓霞 (1980—), 女, 江苏省东台市人, 江苏星海生物科技有限公司工程师, 主要研究方向为发酵工程。E-mail: aixuexi_2016@163.com

通信作者: 徐建中 (1984—), 男, 江西省高安市人, 江南大学副教授, 博士, 主要研究方向为发酵工程。E-mail: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

益生菌因其绿色、无残留、无污染的特性成为替代抗生素的最佳选择之一,受到国内外学者和饲料生产企业的广泛关注^[4]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是芽孢杆菌属的一种,已被美国食品药品监督管理局(FDA)、美国饲料管制协会(AAFCO)和我国农业部认定为饲料安全性菌株,广泛应用于饲料生产中^[5]。*B. subtilis*产生的枯草菌素、多黏菌素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质对致病菌或易造成内源性感染的条件致病菌具有明显抑制作用^[6]。同时,*B. subtilis*合成的消化性酶类(蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、果胶酶等)可降解饲料中的复杂碳水化合物,提高饲料消化率,提升动物生长性能^[7]。此外,*B. subtilis*能刺激动物免疫器官的生长发育,激活T淋巴细胞和B淋巴细胞,提高免疫球蛋白和抗体水平,增强细胞免疫和体液免疫功能,提高群体免疫力^[8]。有研究^[9]表明,*B. subtilis*可使生猪日增重提高6%~7%,饲料转化率提高3%~4%,也能提高肉鸡的抗氧化能力,进而提高肉鸡生长性能。此外,为了有效提高饲料中营养物质的利用率,通过紫外诱变或其他代谢方法改造*B. subtilis*,选育具有高产消化性酶类的突变菌株已成为*B. subtilis*发酵饲料的发展趋势^[10]。虽然*B. subtilis*作为益生菌广泛用于饲料生产,但该菌株不能有效积累L-赖氨酸^[11],为了同时满足家畜或家禽对L-赖氨酸和*B. subtilis*的需求,需要在饲料中同时添加上述两种物质,这不仅造成饲料生产工艺复杂化,还在一定程度上增加了企业生产成本。因此,实现*B. subtilis*高效合成L-赖氨酸有利于简化饲料生产工艺,降低生产成本,提高企业的行业竞争力。

随着*B. subtilis*基因组注释的解析,*B. subtilis*发酵生产L-赖氨酸的生物合成途径和调节机制已较清晰。当以葡萄糖为原料时,*B. subtilis*有5个途径参与L-赖氨酸合成,分别是糖酵解途径、磷酸戊糖(PP)途径、三羧酸(TCA)循环、CO₂固定反应和L-赖氨酸终端合成途径。现阶段,针对*E. coli*和*C. glutamicum*的代谢工程改造合成L-赖氨酸已有较多报道^[12-14],主要集中在以下几个方面:1)解除合成途径中的反馈调节,提高L-赖氨酸合成途径的效率;2)阻断副产物的支路代谢途径,促进多代谢

流进入L-赖氨酸合成途径;3)强化合成途径关键酶的表达水平,提高L-赖氨酸前体物的供应;4)拓宽菌株代谢底物谱,降低L-赖氨酸的生产成本;5)提高胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的有效供应水平,促进L-赖氨酸高效合成。然而,针对*B. subtilis*的代谢工程改造合成L-赖氨酸却鲜有报道。

基于此,本研究拟以饲料工业中常用的益生菌*B. subtilis* ACCC11025为出发菌株,采用CRISPR-Cas9基因编辑技术对磷酸戊糖途径、L-赖氨酸终端合成途径和L-赖氨酸竞争支路代谢途径进行重构,以期获得具有益生功能和L-赖氨酸高效合成功能的“双功能”枯草芽孢杆菌重组菌株,为利用*B. subtilis*生产L-赖氨酸等饲用氨基酸提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

主要试剂:胰蛋白胨、酵母提取物,英国Oxoid公司产;质粒提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、DNA聚合酶、DL1000 DNA Marker、甘露糖、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan),南京诺唯赞生物科技有限公司产;限制性内切酶、DNA连接酶,日本TAKARA公司产;葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄等常规化学试剂,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产。

主要设备:DNA Engine型PCR仪、Biophotometer型核酸/蛋白电泳仪、Gel DOC GR⁺型凝胶成像仪、Micro Pulser型电穿孔仪,美国Bio-Rad公司产;BioPhotometer plus型核酸蛋白测定仪,德国Eppendorf公司产;Autotune超声波细胞破碎仪,美国Sonics公司产;Allegra X-15R型冷冻离心机,美国Beckman Coulter公司产;SBA40-E型生物传感分析仪,山东省科学院产。

1.2 菌株、质粒和引物序列

实验用主要菌株和质粒见表1,引物序列见表2。

1.3 培养条件与培养基

于37℃、100 r/min条件下培养*B. subtilis*及其重组菌株。在特定条件下,添加质量浓度为100 μg/mL的Amp或质量浓度为50 μg/mL的Kan,用于筛选

表1 实验用主要菌株和质粒
Table 1 The main strains and plasmids used in experiments

种类	编号	特征	来源
<i>B. subtilis</i> 菌株	XH0	饲料安全性菌株,由中国农业科学院土壤肥料研究所分离得到,即ACCC11025	ACCC
	XH1	XH0中 <i>thrD</i> 替换成来源于 <i>C. glutamicum</i> 中解除反馈调节的 <i>lysC</i> ³¹¹	本研究构建
	XH2	XH1中 <i>zwf</i> 替换成来源于 <i>C. glutamicum</i> 中解除反馈调节的 <i>zwf</i> ²³⁴	本研究构建
	XH3	XH1中 <i>gnd</i> 替换成来源于 <i>C. glutamicum</i> 中解除反馈调节的 <i>gnd</i> ³⁶¹	本研究构建
	XH4	XH2中 <i>gnd</i> 替换成来源于 <i>C. glutamicum</i> 中解除反馈调节的 <i>gnd</i> ³⁶¹	本研究构建
	XH5	XH4中 <i>hom</i> 替换成来源于 <i>C. glutamicum</i> 中解除反馈调节的 <i>hom</i> ⁵⁹	本研究构建
	XH6	在XH5基因组中引入来源于 <i>C. glutamicum</i> 中的 <i>ddh</i>	本研究构建
质粒	pHT01	枯草芽孢杆菌内源表达质粒, Amp ^R	实验室保存
	pBE980b	芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭表达质粒, Kan ^R	实验室保存
	pHT01-Cas9	用于在 <i>B. subtilis</i> 中过表达 <i>Cas9</i> 的重组质粒	本研究构建
	pBE980b- <i>hom</i> ⁵⁹	携带基因 <i>hom</i> 的sgRNA及同源臂	本研究构建
	pBE980b- <i>lysC</i> ³¹¹	携带基因 <i>lysC</i> 的sgRNA及同源臂	本研究构建
	pBE980b- <i>zwf</i> ²³⁴	携带基因 <i>zwf</i> 的sgRNA及同源臂	本研究构建
	pBE980b- <i>gnd</i> ³⁶¹	携带基因 <i>gnd</i> 的sgRNA及同源臂	本研究构建
pBE980b- <i>ddh</i>	携带基因 <i>pksD</i> 的sgRNA及同源臂	本研究构建	

E. coli 和 *B. subtilis* 重组菌株。

LB培养基:蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.0。

SP I 培养基(20 mL): 9.8 mL SP I -A 盐溶液(即 Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 4 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 28 g/L, KH₂PO₄ 12 g/L, 0.1 MPa 灭菌 20 min); 9.8 mL SP I -B 溶液(即 MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/L, 0.1 MPa 灭菌 20 min); 200 μL 100×CAYE 溶液(即酪蛋白水解物 20 g/L, 酵母提取物 100 g/L, 0.1 MPa 灭菌 20 min); 200 μL 葡萄糖溶液(500 g/L)。

SP II 培养基(6 mL): 5.88 mL SP I 培养基, 60 μL CaCl₂ 溶液(50 mmol/L), 60 μL MgCl₂ 溶液(250 mmol/L)。

发酵培养基: 葡萄糖 80 g/L, 玉米浆 35 g/L, 甜菜糖蜜 12 g/L, (NH₄)₂SO₄ 36 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, FeSO₄ 0.02 g/L, MnSO₄ 0.02 g/L, 甜菜碱 0.05 g/L, 烟酰胺 0.008 g/L, 硫胺素 0.000 45 g/L, 生物素 0.000 85 g/L, CaCO₃ 40 g/L。

所有培养基均用质量浓度为 0.2 g/mL 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0~7.2, 并于 121 °C 灭菌 20 min, 发酵培养基于 115 °C 灭菌 10 min。

1.4 质粒和菌株的构建方法

1.4.1 质粒 pHT01-Cas9 的构建

以酿酒链球菌的基因组作为模板, 使用引物 *Spcas9*-F 和 *Spcas9*-R 将基因 *Spcas9* 进行 PCR 扩增, 随后利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xam* I 对质粒 pHT01 和片段 *Spcas9* 进行双酶切并酶连, 获得目标重组质粒 pHT01-Cas9。

1.4.2 质粒 pBE980b-*hom*⁵⁹、pBE980b-*lysC*³¹¹、pBE980b-*zwf*²³⁴、pBE980b-*gnd*³⁶¹ 和 pBE980b-*ddh* 的构建 以质粒 pBE980b 为模板, 利用引物 *hom*-F、*hom*-R、*lysC*-F、*lysC*-R、*zwf*-F、*zwf*-R、*gnd*-F、*gnd*-R、*pksD*-F 和 *pksD*-R 通过反向 PCR 扩增将 20 bp 的 sgRNA 无缝连接到质粒 pBE980b, 获得 5 个带有靶向位点的质粒。

以 *B. subtilis* ACCC11025 基因组为模板, 利用引物 *hom*-L-F、*hom*-L-R、*hom*-R-F、*hom*-R-R、*lysC*-L-F、*lysC*-L-R、*lysC*-R-F、*lysC*-R-R、*zwf*-L-F、*zwf*-L-R、*zwf*-R-F、*zwf*-R-R、*gnd*-L-F、*gnd*-L-R、*gnd*-R-F、*gnd*-R-R、*pksD*-L-F、*pksD*-L-R、*pksD*-R-F 和 *pksD*-R-R 分别对基因 *hom*、*lysC*、*zwf*、*gnd* 和 *pksD* 的上下同源臂进行扩增, 同时以 *C. glutamicum* 为基因组, 利用引物 *Cghom*-F、*Cghom*-R、*CglysC*-F、*CglysC*-R、*Cgzuf*-F、*Cgzuf*-R、*Cggnd*-F、*Cggnd*-R、*Cgddh*-F 和 *Cgddh*-R 分别扩增基因 *hom*、*lysC*、*zwf*、*gnd* 和 *ddh*。将回收后的同源臂片段和基因片段同时作为模板, 通过融合 PCR 进行基因融合, 利用限制性核酸内切酶对融合片段及带有靶向位点的质粒 pBE980b 进行酶切和酶连, 获得重组质粒 pBE980b-*hom*⁵⁹、pBE980b-*lysC*³¹¹、

表2 实验用引物序列

Table 2 The primer pairs used in experiments

引物	序列 (5'→3')	内切酶	特征
<i>Spcas9</i> -F	GCTCTAGAATGGATAAGAAATACTCAAT	<i>Xba</i> I	拷贝 <i>Cas9</i> 基因
<i>Spcas9</i> -R	CCCCCGGGTCAGTCACCTCCTAGCTGA	<i>Xma</i> I	
<i>hom</i> -F	GATAAGCTTATGCATCAGGTCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA	—	靶标 <i>hom</i> 基因
<i>hom</i> -R	CCGACCTGATGCATAAGCTTATCGGTACCGCTATCACTTTATATTTTACAT	—	
<i>lysC</i> -F	CCGTTATAAAGGCGTCAAAGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA	—	靶标 <i>lysC</i> 基因
<i>lysC</i> -R	CCGCTTTGACGCCCTTTATAACGGGGTACCGCTATCACTTTATATTTTACAT	—	
<i>zwf</i> -F	CCGTTCTGATGTAGAATGGAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA	—	靶标 <i>zwf</i> 基因
<i>zwf</i> -R	GTTCCATTCTACATCAGAACCAGGGGTACCGCTATCACTTTATATTTTACAT	—	
<i>gnd</i> -F	ATTACGACGGCTACCGCACAGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA	—	靶标 <i>gnd</i> 基因
<i>gnd</i> -R	CCCTGTCCGGTAGCCGTCGTAATGGTACCGCTATCACTTTATATTTTACAT	—	
<i>pksD</i> -F	GGTTCCCAATACTATCACATGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA	—	靶标 <i>pksD</i> 基因
<i>pksD</i> -R	CCCATGTGATAGTATTGGGAACCGGTACCGCTATCACTTTATATTTTACAT	—	
<i>hom</i> -L-F	CGGGGTACCCATTGATCAGGATTCGGCG	<i>Kpn</i> I	将 <i>B. subtilis</i> 中的 <i>hom</i> 替换成 <i>C. gluramicum</i> 中的 <i>hom</i> ⁵⁹
<i>hom</i> -L-R	AGATGCTGAGGTCATAAAAACTCCACC	—	
<i>Cghom</i> -F	ATGACCTCAGCATCTGCCCC	—	
<i>Cghom</i> -R	TTAGTCCCTTCGAGGCGG	—	
<i>hom</i> -R-F	CTCGAAAGGGACTAATGTGAAAGGACTTATC	—	
<i>hom</i> -R-R	CCGGTTCGACAAGCTTTTGGCCTTCAATGC	<i>Acc</i> I	
<i>thrD</i> -L-F	CGGGGTACCATCAATCGCGGCAAACGG	<i>Kpn</i> I	
<i>thrD</i> -L-R	TACCACCAGGGCCACGTTTACATCTCC	—	
<i>CglysC</i> -F	GTGGCCCTGGTCGTACAGAA	—	
<i>CglysC</i> -R	TTAGCGTCCGGTGCCTGCAT	—	
<i>thrD</i> -R-F	AGGCACCGGACGCTAATCGTACATAAAATAGC	—	将 <i>B. subtilis</i> 中的 <i>thrD</i> 替换成 <i>C. gluramicum</i> 中的 <i>lysC</i> ³¹¹
<i>thrD</i> -R-R	CCGGTTCGACCCGCAAGACATAGTCTTGC	<i>Acc</i> I	
<i>zwf</i> -L-F	CGGGGTACCCCTTTAGGTCCGTACAC	<i>Kpn</i> I	将 <i>B. subtilis</i> 中的 <i>zwf</i> 替换成 <i>C. gluramicum</i> 中的 <i>zwf</i> ²³⁴
<i>zwf</i> -L-R	CGTGTTTGTGCTCACTAAAAGTACCTCA	—	
<i>Cgzwf</i> -F	GTGAGCACAAACAGACC	—	
<i>Cgzwf</i> -R	TTATGGCCTGCGCCAGGTG	—	
<i>zwf</i> -R-F	TGGCGCAGGCCATAATAAGAAGAAAAAAGCC	—	
<i>zwf</i> -R-R	GGCATGCTGAAATATGGTCAAATC	<i>Sph</i> I	
<i>pksD</i> -L-F	CCGGAATTCGGCCATATGGAGTTTGAGGAG	<i>EcoR</i> I	将 <i>B. subtilis</i> 中的 <i>pksD</i> 替换成 <i>C. gluramicum</i> 中的 <i>ddh</i>
<i>pksD</i> -L-R	GCGGATGTTGGTCAATGTGTATAACCTTCTTT	—	
<i>Cgddh</i> -F	ATGACCAACATCCGCGTAGC	—	
<i>Cgddh</i> -R	TTAGACGTCGCGTCCGATCAGAT	—	
<i>pksD</i> -R-F	CACGCGACGTCTAATTACATATGTCTTTTC	—	
<i>pksD</i> -R-R	CGGGGTACCCCTGTTTGGCTTCATTCAT	<i>Kpn</i> I	
<i>gnd</i> -L-F	CCGGAATTCAGTCAAACCGTGATGGAT	<i>EcoR</i> I	将 <i>B. subtilis</i> 中的 <i>gnd</i> 替换成 <i>C. gluramicum</i> 中的 <i>gnd</i> ³⁶¹
<i>gnd</i> -L-R	CGTACTTGACGGCATGTGTTACAGCTCCT	—	
<i>Cgnd</i> -F	ATGCCGTCAAGTACGATCAAT	—	
<i>Cgnd</i> -R	TTAAGCTTCAACCTCGGAGC	—	
<i>gnd</i> -R-F	GAGGTTGAAGCTTAACTGTATTAATAA	—	
<i>gnd</i> -R-R	CGGGGTACCTGTCAAGCCATAACCTACTTT	<i>Kpn</i> I	

注:带下划线的碱基序列为限制性内切酶位点;—表示无内切酶。

pBE980b-*zwf*²³⁴、pBE980b-*gnd*³⁶¹ 和 pBE980b-*ddh*。

1.4.3 *B. subtilis* 重组菌株的构建 将重组质粒 pHT01-*Cas9* 电转化至 *B. subtilis* ACCC11025 感受态

细胞中,通过氨苄抗性筛选得到带有 *Cas9* 蛋白的转化子。将重组质粒 pBE980b-*hom*⁵⁹、pBE980b-*lysC*³¹¹、pBE980b-*zwf*²³⁴、pBE980b-*gnd*³⁶¹ 和 pBE980b-*ddh* 分别

电转化至带有 *Cas9* 蛋白的 *B. subtilis* ACCC11025 感受态细胞中。目标重组菌株的具体筛选和鉴定参照 A. J. Sachla 等^[15]的方法进行。

1.5 分析方法

1.5.1 酶活性测定 采用超声波细胞破碎法处理细胞,离心后取上清液,获得粗酶液^[16],将该粗酶液保存于-20℃备用或立即用于酶活性的测定。参照 J. Z. Xu 等^[17]的方法测定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)和二氨基庚二酸脱氢酶(DapDH)的酶活性;参照许金坤等^[18]的方法,采用吸光光度法测定高丝氨酸脱氢酶(HSD)的酶活性。

1.5.2 菌体生长情况测定 参照 J. Z. Xu 等^[17]的方法,每间隔 2 h 或 4 h 取 200 μL 发酵液,用 0.25 mol/L 的稀 HCl 溶液将其稀释到 5 mL,用紫外分光光度计于 562 nm 处测定吸光度(即 OD_{562})。

1.5.3 葡萄糖含量和 L-赖氨酸产量测定 参照 J. Z. Xu 等^[17]的方法,将发酵液于 4℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min,取上清液稀释 100 倍后,通过生物传感分析仪测定发酵液中葡萄糖含量和 L-赖氨酸产量。

1.6 数据处理

采用 3 次独立重复实验考查实验因素,数据表示为(平均值±标准差),统计学分析采用 T 检验。

2 结果与分析

2.1 目标重组菌株的筛选与鉴定结果分析

目标重组质粒和目标重组菌株的验证如图 1 所示,图 1a)中,泳道 1 为 pBE980b-*gnd*³⁶¹ 双酶切验证,泳道 2 为 pBE980b-*lysC*³¹¹ 双酶切验证,泳道 3 为 pBE980b-*zuf*²³⁴ 双酶切验证,泳道 4 为 pBE980b-

*hom*⁵⁹ 双酶切验证,泳道 5 为 pBE980b-*ddh* 双酶切验证,泳道 M 为 DL10000 DNA Marker;图 1b)中,泳道 1 为 *B. subtilis* ACCC11025 对照,泳道 2 为菌株 XH3 中基因 *gnd* PCR 验证,泳道 3 为菌株 XH4 中基因 *gnd* PCR 验证,泳道 4 为菌株 XH2 中基因 *zuf* PCR 验证,泳道 5 为菌株 XH6 中基因 *ddh* PCR 验证,泳道 6 为菌株 XH1 中基因 *lysC* PCR 验证,泳道 7 为菌株 XH5 中基因 *hom* PCR 验证,泳道 M 为 DL10000 DNA Marker。由图 1a)可知,所选择的质粒都带有目标片段,为目标重组质粒 pBE980b-*gnd*³⁶¹、pBE980b-*lysC*³¹¹、pBE980b-*zuf*²³⁴、pBE980b-*hom*⁵⁹ 和 pBE980b-*ddh*。由图 1b)可知,通过对候选目标菌株进行目标片段 PCR 验证,确定了目标重组菌株 XH1、XH2、XH3、XH4、XH5 和 XH6。

2.2 天冬氨酸激酶对 L-赖氨酸终端合成途径碳通量的影响分析

天冬氨酸激酶(Aspartokinase, AK)是催化 L-天冬氨酸形成天冬氨酸磷酸的酶,是天冬氨酸族氨基酸生物合成途径中的关键酶,也是 L-赖氨酸生物合成过程中的第一个限速酶^[3]。然而,在 *B. subtilis* 中,AK 只有一个同功酶天冬氨酸激酶(AK III),由基因 *thrD* 编码,其酶活力受 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的协同反馈抑制和阻遏作用^[19]。有研究^[17]表明,将来源于 *C. glutamicum* 的 AK III 氨基酸序列中的第 311 位氨基酸由苏氨酸定点突变成异亮氨酸,可以解除 L-赖氨酸的反馈抑制作用。为此,本研究首次将 *B. subtilis* 中的 AK III 替换成来源于 *C. glutamicum* 的已解除反馈调节作用的 AK III(编码基因 *lysC*³¹¹),以调节 L-赖氨酸终端合成途径的碳通量。*lysC* 基因替换及替换后重组菌株的生长情况如图 2 所示。由图 2a)可知,目标重组菌株 *B. subtilis* XH1 已成功

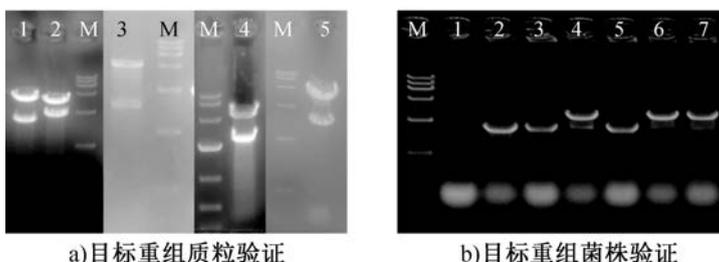


图 1 目标重组质粒和目标重组菌株的验证

Fig. 1 Confirmation of target plasmids and recombinant strains

将自身 AK III 编码基因 *thrD* 替换成 *C. glutamicum* 中的 *lysC*³¹¹。重组菌株 *B. subtilis* XH1 (*XH0 thrD::lysC*³¹¹) 可在添加有 L-赖氨酸结构类似物 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸 (AEC) 的 LB 固体培养基中正常生长, 而出发菌株 *B. subtilis* XH0 则不能生长 (图 2b))。这表明, 将 *B. subtilis* 中的 *thrD* 基因替换成 *lysC*³¹¹ 基因成功解除了 L-赖氨酸对 AK III 的反馈调节作用。

课题组前期研究^[17]发现, 解除 *C. glutamicum* 中 AK III 的反馈调节作用有利于强化 L-赖氨酸终端合成途径碳通量, 从而促进 L-赖氨酸合成。为了考查来源于 *C. glutamicum* 中解除反馈调节作用的 AK III 是否能在 *B. subtilis* 中表达, 本研究对出发菌株和重组菌株进行摇瓶发酵并测定胞外 L-赖氨酸产量。不同菌株 L-赖氨酸产量和菌体生长情况如图 3 所示。由图 3a) 可知, 重组菌株 *B. subtilis* XH1 在发酵 16 h 后开始逐渐向胞外分泌 L-赖氨酸, 发酵结束后 (发酵 40 h) 胞外 L-赖氨酸产量为 (11.7 ± 0.6) g/L。相反, 出发菌株 *B. subtilis* XH0 在整个发

酵周期内都没有明显积累 L-赖氨酸的现象。由图 3b) 可知, 与出发菌株 *B. subtilis* XH0 相比, 重组菌株 *B. subtilis* XH1 的菌体生长并未受到明显抑制, 最终菌体量 ($OD_{562} = 38.4 \pm 3.5$) 为出发菌株 ($OD_{562} = 37.5 \pm 4.1$) 的 97.6%。这表明, 将 *B. subtilis* 中的 AK III 替换成来源于 *C. glutamicum* 的解除反馈调节的 AK III 可以实现改造 *B. subtilis* 以促进 L-赖氨酸合成的目的。相似的结果也被魏佳等^[20]报道, 他们发现, 将来源于 *C. glutamicum* 的解除反馈调节作用的 AK III 替换 *E. coli* 中的 AK III, 有利于 L-苏氨酸的合成。

2.3 G6PD 和 6GPD 对 PP 途径碳通量的影响分析

以葡萄糖为碳源时 *B. subtilis* 中 L-赖氨酸的生物合成途径如图 4 所示, 其中, 每合成 1 分子的 L-赖氨酸需要消耗 4 分子的辅酶因子 NADPH; 不同颜色的线条表示不同的合成途径, 红色线条表示引入外源合成途径; 椭圆圈里是编码基因, 红色圈表示替代基因; ⇒ 表示基因替换; 基因 *zwf* 编码 G6PD, 基

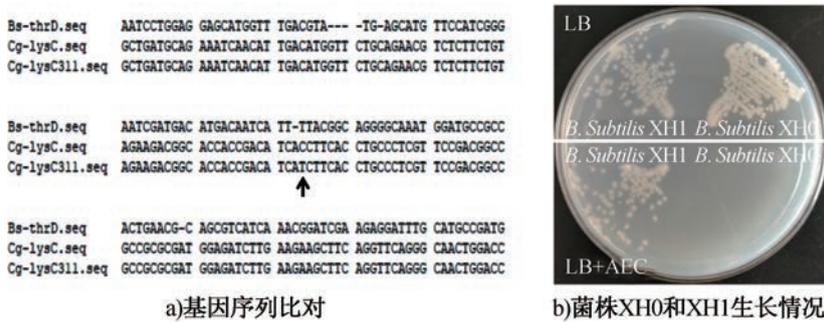


图 2 *lysC* 基因替换及替换后重组菌株生长情况

Fig. 2 Sequencing of *lysC* and the growth of different strains

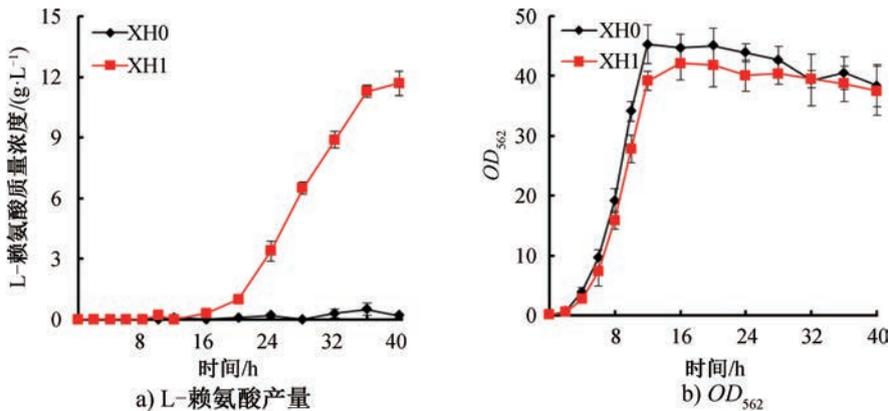


图 3 不同菌株 L-赖氨酸产量和菌体生长情况

Fig. 3 L-lysine production and cell growth of different strains

表3 不同重组菌株中 G6PD 和 6GPD 的酶学性质

Table 3 Kinetic characterization of G6PD and 6GPD in different strains

 $\mu\text{mol/L}$

菌株	$K_m(\text{G6PD})_{\text{G6P}}$	$K_m(\text{G6PD})_{\text{NADP}}$	$K_m(6\text{GPD})_{\text{G6P}}$	$K_m(6\text{GPD})_{\text{NADP}}$
XH0	332.6±36.3	78.4±5.8	343.6±23.2	84.9±2.7
XH1	327.2±21.6	77.1±7.5	336.5±31.7	83.4±6.1
XH2	214.8±17.4	54.3±3.6	ND ^a	ND ^a
XH3	ND ^a	ND ^a	225.2±13.2	56.4±3.4
XH4	225.0±27.5	43.8±5.2	213.7±29.3	59.2±3.8

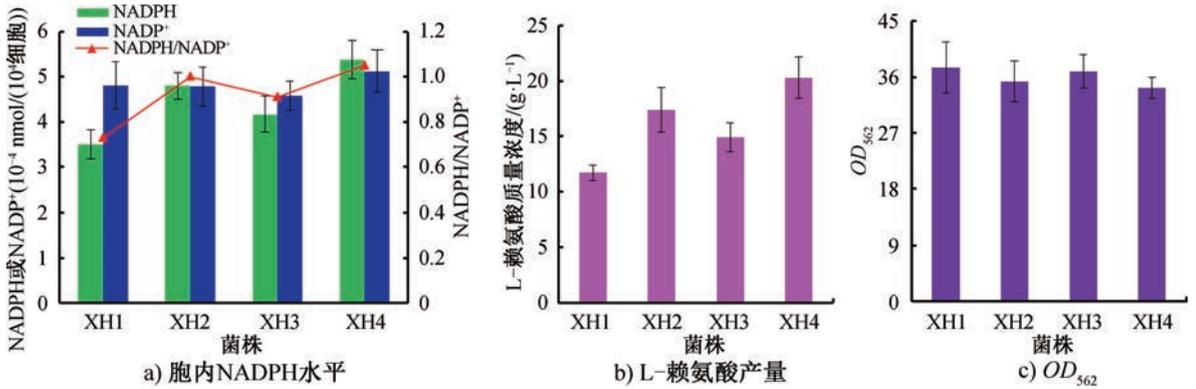
注:ND^a表示未检测到。

图5 不同菌株胞内 NADPH 水平、L-赖氨酸产量和菌体生长情况

Fig. 5 Intracellular NADPH level, L-lysine production and cell growth of different strains

活性不同,菌体胞内的 NADPH 水平也不同。胞内 G6PD 和 6GPD 酶活力越高,胞内 NADPH 水平也越高。由图 5a)可知,重组菌株 *B. subtilis* XH4 胞内 NADPH 水平最高,从出发菌株 *B. subtilis* XH1 的 (3.51×10^{-4}) nmol/(10^4 细胞)增加到 (5.38×10^{-4}) nmol/(10^4 细胞),胞内 NADPH/NADP⁺提高了 43.2%。由图 5b)可知,重组菌株 *B. subtilis* XH2、*B. subtilis* XH3 和 *B. subtilis* XH4 胞外 L-赖氨酸产量都显著提升。重组菌株 *B. subtilis* XH4 摇瓶发酵 40 h 后积累了 (20.3 ± 1.9) g/L L-赖氨酸,比出发菌株 *B. subtilis* XH1 提高了 73.5%。这些结果表明,引入外源的解除反馈调节的 G6PD 和 6GPD 可以强化 PP 途径碳通量,从而有效提高胞内 NADPH 供给水平,促进 L-赖氨酸的合成。诸多研究^[1,3,14,22]也指出,强化 *E. coli* 或 *C. glutamicum* 中 PP 途径碳通量,可以提高胞内 NADPH 水平,从而提高 NADPH 依赖型产物的合成效率。由图 5c)可知,与出发菌株 *B. subtilis* XH1 相比,重组菌株表现出较差的菌体生长性能,尤其是重组菌株 *B. subtilis* XH4。有研究^[22]报道,引入外源的 *zwf*²³⁴ 和 *gnd*³⁶¹ 不仅会显著改变目标产物合成量,还会显著影响葡萄糖利用速率和菌体生长。因此,造成重组菌株菌体生长差的

原因可能是由于更多的碳源用于 L-赖氨酸合成而不是菌体生长。

2.4 HSD 对胞内副产物积累的影响分析

天冬氨酸族氨基酸以草酰乙酸为前体物进行生物合成,包括 5 种氨基酸,即 L-天冬氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸。由图 4 可知,L-赖氨酸生物合成途径中的重要中间物质天冬氨酸半醛在 HSD 的催化作用下进入 L-赖氨酸生物合成的竞争途径,从而影响 L-赖氨酸生物合成。虽然通过失活 HSD 可以阻断竞争途径,但会使重组菌株成为营养缺陷型菌株,需要在发酵过程中额外添加高丝氨酸等物质,增加生产成本^[18]。为此,本研究通过在重组菌株 *B. subtilis* XH4 中调节 HSD 酶活力,尝试将 *B. subtilis* 中的 HSD(编码基因 *hom*) 替换为来自 *C. glutamicum* 的渗漏型 HSD(编码基因 *hom*⁵⁹)以有效降低竞争途径碳通量,获得目标重组菌株 *B. subtilis* XH5(XH4 *hom*:;*hom*⁵⁹)。不同菌株生长情况、L-赖氨酸产量和副产物积累量见表 4。由表 4 可知,重组菌株 *B. subtilis* XH5 菌体生长性能表现出与菌株 *B. subtilis* XH4 相似的水平。需要指出的是,尽管重组菌株 *B. subtilis* XH5 的菌体量低于出发菌株 *B. subtilis* XH0 和 *B. subtilis* XH1,但其 L-

赖氨酸产量远高于二者。重组菌株 *B. subtilis* XH5 中 L-赖氨酸产量达到 (23.2 ± 1.7) g/L, 比菌株 *B. subtilis* XH1 和 *B. subtilis* XH4 分别增加了 98.3% 和 14.3%。此外,随着重组菌株 HSD 酶活力的降低,仍可促进 L-赖氨酸的合成,同时减少其他 4 种天冬氨酸族氨基酸的积累量。重组菌株 *B. subtilis* XH5 发酵液中未检测到 L-蛋氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸,而菌株 *B. subtilis* XH1 和 *B. subtilis* XH4 在胞外都积累了一定量的副产物。这一结果表明,替换来源于 *C. glutamicum* 的渗漏型 HSD,可以调节 *B. subtilis* 的胞内 HSD 酶活力水平,从而有利于促进 L-赖氨酸合成、减少副产物积累。

2.5 外源 DapDH 对 L-赖氨酸合成效率的影响分析

在已知的具有 L-赖氨酸生物合成途径的微生物和植物中,可以将 L-赖氨酸生物合成划分为两个完全不同的途径,即氨基乙酸途径(AAA)和二氨基庚二酸途径(DAP)^[1]。DAP 是天冬氨酸族氨基酸合成途径中的一部分,存在 4 种不同的变化形式用于合成内消旋二氨基庚二酸,即脱氢酶途径、琥珀酰化酶途径、乙酰化酶途径和转氨酶途径^[23]。

B. subtilis 中只存在乙酰化酶途径,即以 L- Δ^1 -四氢吡啶二羧酸为底物经 5 步酶促反应合成 L-赖氨酸(图 4)。然而,一些革兰氏阳性菌(如 *C. glutamicum*) 存在更为简单的脱氢酶途径,该途径以 L- Δ^1 -四氢吡啶二羧酸为底物经 2 步酶促反应即可合成 L-赖氨酸^[23]。为了提高 *B. subtilis* 合成 L-赖氨酸的效率,本研究在菌株 *B. subtilis* XH5 中引入 *C. glutamicum* 中的 DapDH(编码基因 *ddh*),获得重组菌株 *B. subtilis* XH6(*XH5 pksD::ddh*)。菌株 XH5 和 XH6 的菌体生长和 L-赖氨酸合成情况如图 6 所示。由图 6a) 可知,与出发菌株 *B. subtilis* XH5 不同,重组菌株 *B. subtilis* XH6 表现出菌体生长延滞,但两者最终的菌体量基本一致。由图 6b) 可知,重组菌株 *B. subtilis* XH6 在发酵初期(10 h)就开始积累 L-赖氨酸,这可能是导致重组菌株 *B. subtilis* XH6 生长延滞的原因。重组菌株 *B. subtilis* XH6 中 L-赖氨酸产量最高达到 (25.6 ± 2.3) g/L,比菌株 *B. subtilis* XH5 增加了 10.3%。这一结果表明,来源于 *C. glutamicum* 的 DapDH 可以调节 *B. subtilis* 中的 DAP 碳通量,引导部分碳流进入脱氢酶途径,从而促进 L-赖氨酸的合成。

表 4 不同菌株生长情况、L-赖氨酸产量和副产物积累量

Table 4 The cell growth, the concentration of L-lysine and by-products in different strains

菌株	OD_{562}	L-赖氨酸/(g·L ⁻¹)	L-天冬氨酸/(g·L ⁻¹)	L-蛋氨酸/(g·L ⁻¹)	L-苏氨酸/(g·L ⁻¹)	L-异亮氨酸/(g·L ⁻¹)
XH0	38.4±3.5	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
XH1	37.5±4.1	11.7±0.6	0.4±0.03	0.5±0.02	0.9±0.03	0.3±0.05
XH4	34.2±1.6	20.3±1.9	0.7±0.10	0.8±0.07	1.4±0.12	0.9±0.04
XH5	34.9±2.4	23.2±1.7	0.5±0.04	<0.1	<0.1	<0.1

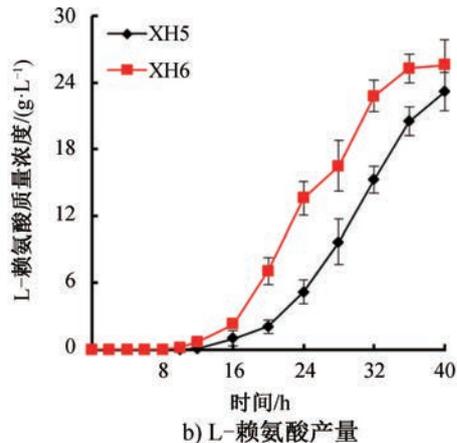
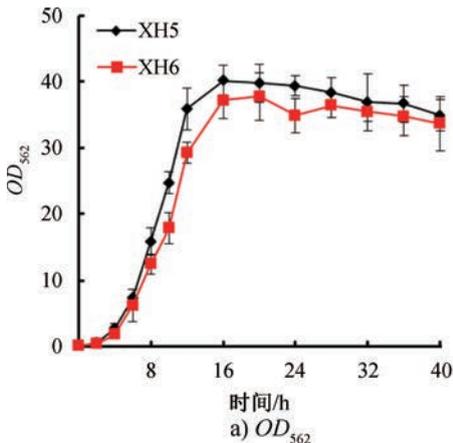


图 6 菌株 XH5 和 XH6 的菌体生长和 L-赖氨酸合成情况

Fig. 6 The cell growth and L-lysine production in XH5 and XH6 strains

3 结论

本研究首次以饲料工业中常用的益生菌 *B. subtilis* ACCC11025 为出发菌株,围绕胞内前体物和辅酶因子 NADPH 供应、副产物积累和优化终端合成途径对 L-赖氨酸合成的影响,采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术对磷酸戊糖途径、L-赖氨酸终端合成途径和 L-赖氨酸竞争支路代谢途径进行重构,获得一株枯草芽孢杆菌重组菌株。结果表明,将 *B. subtilis* 中内源的参与 L-赖氨酸合成的关键性酶替换成来源于 *C. glutamicum* 中的解除反馈调节作用的关键性酶(AKⅢ、G6PD 和 6GPD),可有效为合成 L-赖氨酸提供前体物和辅酶因子 NADPH,保证在 *B. subtilis* 中有效积累 L-赖氨酸。此外,将 *B. subtilis* 中 L-赖氨酸合成支路途径中的限速酶 HSD 替换成来源于 *C. glutamicum* 中的渗漏型 HSD,可实现在不影响菌体生长的情况下降低副产物积累,从而保证在 *B. subtilis* 中高效清洁发酵生产 L-赖氨酸。进一步实验结果表明,在 *B. subtilis* 中引入来自 *C. glutamicum* 的脱氢酶途径,可以引导碳流进入脱氢酶途径,从而促进 L-赖氨酸的高效合成。经上述对 *B. subtilis* 基因组进行的一系列遗传改造,最终获得的重组菌株 *B. subtilis* XH6 中 L-赖氨酸产量达到 (25.6 ± 2.3) g/L。重组菌株 *B. subtilis* XH6 经 10 次传代培养后仍然具有稳定的 L-赖氨酸产量,这些结果表明重组菌株 *B. subtilis* XH6 具有良好的遗传稳定性。此外,重组菌株 *B. subtilis* XH6 的出发菌株为饲料工业常用的益生菌 *B. subtilis* ACCC11025,因此重组菌株 *B. subtilis* XH6 保留了出发菌株的益生功能。综上所述,*B. subtilis* XH6 即为兼具益生功能和 L-赖氨酸高效合成功能的“双功能”枯草芽孢杆菌重组菌株。

参考文献:

[1] LIU N,ZHANG T T,RAO Z M,et al. Reconstruction of the diaminopimelic acid pathway to promote L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021,22(16):9065.

[2] LI C L, RUAN H Z, LIU L M, et al. Rational

reformation of *Corynebacterium glutamicum* for producing L-lysine by one-step fermentation from raw corn starch[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2022,106(1):145-160.

- [3] XU J Z, RUAN H Z, YU H B, et al. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar [J]. Microbial Cell Factories,2020,19(1):39.
- [4] 王雅敏,刘莹露,李景河,等. 益生菌发酵饲料对蛋鸡生产性能、蛋品质及脂质代谢的影响[J]. 家畜生态学报,2021,42(10):27-33.
- [5] 张桂枝,刘璐,靳双星,等. 枯草芽孢杆菌发酵制剂对饲喂含黄曲霉毒素 B1 饲料肉鸡免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2019,55(7):142-146.
- [6] WANG C, WEI S Y, XU B C, et al. *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* co-fermented feed regulates lactating sow's performance, immune status and gut microbiota [J]. Microbial Biotechnology,2021,14(2):614-627.
- [7] MALIK W A, JAVED S. Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021,9:800265.
- [8] LEE J E, KYE Y C, PARK S M, et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens [J]. Veterinary Research,2020,51(1):68.
- [9] 张林鑫,赵春萍,王婧,等. 枯草芽孢杆菌对家禽生产影响的研究概述[J]. 贵州畜牧兽医, 2020,44(3):11-14.
- [10] 曾国洪,丛丽娜,毕楠. 枯草芽孢杆菌诱变株产抗菌脂肽的特性[J]. 大连工业大学学报, 2019,38(4):235-238.
- [11] 欧荣娣,邢月腾,范觉鑫,等. 高产赖氨酸枯草芽孢杆菌的选育[J]. 中国饲料,2014(20):29-31.
- [12] XU J Z, WU Z H, GAO S J, et al. Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in *Corynebacterium glutami-*

- cum[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 105.
- [13] PETERS-WENDISH P G, SCHIEL B, WENDISH V F, et al. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, 3(2): 295–300.
- [14] XU J Z, YANG H K, ZHANG W G. NADPH metabolism: A survey of its theoretical characteristics and manipulation strategies in amino acid biosynthesis[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(7): 1061–1076.
- [15] SACHLA A J, ALFONSO A J, HELMANN J D. A simplified method of CRISPR-Cas9 engineering of *Bacillus subtilis* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e00754-21.
- [16] FENG L Y, XU J Z, ZHANG W G. Improved L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by optimizing the aminotransferases [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2102.
- [17] XU J Z, HAN M, ZHANG J L, et al. Metabolic engineering *Corynebacterium glutamicum* for the L-lysine production by increasing the flux into L-lysine biosynthetic pathway[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(9): 2165–2175.
- [18] 许金坤, 闵伟红, 詹冬玲, 等. 北京棒杆菌 AS1. 299 高丝氨酸脱氢酶突变体 D206G 的酶学性质表征[J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 240–244.
- [19] 孙玉莹. 革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌中赖氨酸核糖开关调控机制的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2019.
- [20] 魏佳, 王壮壮, 于海波, 等. 产 L-苏氨酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 695–706.
- [21] WANG Y Y, ZHANG F, XU J Z, et al. Improvement of L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by altering the redox flux[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8): 2020.
- [22] WANG Z W, MA X H, SHEN Z, et al. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(4): 3934–3940.
- [23] XU J Z, RUAN H Z, LIU L M, et al. Overexpression of thermostable meso-diaminopimelate dehydrogenase to redirect diaminopimelate pathway for increasing L-lysine production in *Escherichia coli* [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2423.

Metabolic engineering for improving the L-lysine production by *Bacillus subtilis*

ZHANG Xiaoxia¹, CHEN Shengling², ZHU Zhiqun¹, KANG Chuntao¹, XU Jianzhong²

1. Jiangsu Xinghai Biotechnology Co., Ltd., YanCheng 224233, China;

2. School of Biotechnology/The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, WuXi 214122, China

Abstract: In order to construct a dual-functional *B. subtilis* with probiotic function and L-lysine production, *B. subtilis* ACCC11025 was systematically modified. These results indicated that the strain with replacement of *thrD*, *zwf* and *gnd* from *B. subtilis* by *lysC*³¹¹, *zwf*²³⁴ and *gnd*³⁶¹ from *C. glutamicum* (i. e., *B. subtilis* XH4) was beneficial to L-lysine production, and the yield of L-lysine was (20.3 ± 1.9) g/L. In addition, the strain with replacement of *hom* from *B. subtilis* by *hom*⁵⁹ from *C. glutamicum* (i. e., *B. subtilis* XH5) produced (23.2 ± 1.7) g/L of L-lysine without the decrease of cell growth. In addition, the yield of by-products in *B. subtilis* XH5 was significantly decreased. Moreover, the DapDH from *C. glutamicum* was introduced into the *B. subtilis* XH5 (i. e., *B. subtilis* XH6), resulting in the increase of L-lysine production because of the redirection of the carbon flux in DAP pathway. The resulted recombinant strain *B. subtilis* XH6 produced (25.6 ± 2.3) g/L of L-lysine.

Key words: *Bacillus subtilis*; L-lysine production; CRISPR-Cas9; feedback regulation; metabolic engineering

(责任编辑:杨晓娟)