

## $\gamma$ -谷氨酰激酶基因敲除对产 L-精氨酸钝齿棒杆菌 8-193 生理代谢的影响

李小曼<sup>1,2</sup>, 赵智<sup>1</sup>, 张英姿<sup>1</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 丁久元<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:**【目的】为了阻断 L-精氨酸合成的前体物 L-谷氨酸的分支代谢途径, 增加 L-精氨酸合成的代谢流, 构建钝齿棒杆菌 8-193 (*Corynebacterium crenatum* 8-193)  $\gamma$ -谷氨酰激酶 (EC: 2.7.2.11,  $\gamma$ -glutamyl kinase) 基因 *proB* 敲除的菌株, 并研究 *proB* 基因敲除对菌株生理特性的影响。【方法】运用 PCR 技术分别扩增 *proB* 基因的上游和下游序列, 构建带有内部缺失的 *proB* 基因的敲除载体。经过两次同源重组, 敲除 *C. crenatum* 8-193 的 *proB* 基因, 构建菌株 8-193- $\Delta$ *proB*, 并用带有 *proB* 基因的表达载体对 8-193- $\Delta$ *proB* 进行互补验证。通过摇瓶发酵研究 8-193- $\Delta$ *proB* 的生理特性。【结果】PCR 验证、 $\gamma$ -谷氨酰激酶酶活测定和营养缺陷型鉴定表明, 获得了 *proB* 基因缺陷的菌株。摇瓶发酵结果表明, 与出发菌株相比, 8-193- $\Delta$ *proB* 生物量降低 9.6%, L-精氨酸产量提高 13.6%。副产物中谷氨酸族和天冬氨酸族氨基酸含量升高;  $\alpha$ -酮戊二酸、磷酸烯醇式丙酮酸和琥珀酸含量降低。*proB* 基因敲除后, 菌株的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶活性提高。【结论】对谷氨酸分支代谢途径的阻断可以改善 8-193 菌株的葡萄糖利用和精氨酸合成能力。

**关键词:** 钝齿棒杆菌,  $\gamma$ -谷氨酰激酶, 基因敲除, L-精氨酸

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)11-1476-09

L-精氨酸是人体的半必需氨基酸, 在生长、组织修复和提高机体免疫功能方面起着重要的生理作用<sup>[1-2]</sup>。近年来发现, 精氨酸是血管扩张信使分子一氧化氮合成的前体化合物<sup>[3]</sup>。由于精氨酸在医疗、食品领域的广泛应用, 其微生物代谢调控及生产技术受到研究者的广泛关注<sup>[4-7]</sup>。

与大部分氨基酸一样, 采用谷氨酸棒杆菌突变株进行微生物发酵是 L-精氨酸工业生产的主要方式。采用传统的诱变育种手段, 可以获得 L-精氨酸生产菌株。基于对代谢调节的认识, 可以在基因水平和酶学水平上对精氨酸的合成途径进行理性操

作。L-精氨酸和 L-脯氨酸同属于谷氨酸族氨基酸。在 N-乙酰谷氨酸合成酶催化下, 谷氨酸生成 N-乙酰谷氨酸, 进入 L-精氨酸合成途径; 而在  $\gamma$ -谷氨酰激酶催化下, 谷氨酸生成  $\gamma$ -谷氨酰磷酸, 进入 L-脯氨酸合成途径 (图 1)。在大肠杆菌中, 通过使精氨酸合成的操纵子去阻遏, 解除精氨酸对 N-乙酰谷氨酸合成酶的反馈抑制, 以及过表达精氨酸合成途径中的氨甲酰磷酸合成酶 *car* 操纵子基因和鸟氨酸转氨甲酰酶 *arg1* 基因等手段获得了精氨酸的高产菌株<sup>[8]</sup>。而在棒杆菌中, 早期大多采用诱变育种技术选育精氨酸产生菌。随着对精氨酸代谢调控机制的

\* 通信作者。Tel/Fax: + 86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介: 李小曼 (1986-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: mypicture@163.com

收稿日期: 2011-05-04; 修回日期: 2011-05-27

了解和遗传操作系统的建立,代谢工程技术开始用于精氨酸产生菌的分子育种<sup>[9]</sup>。对于分支合成途径而言,阻断分支代谢,使碳流流向目的产物是代谢调控育种中常用的策略。因此,在 L-精氨酸合成代谢中,谷氨酸是重要的调控靶点。

我们曾报道了过表达精氨酸合成途径的关键酶

N-乙酰谷氨酰激酶基因对钝齿棒杆菌精氨酸合成的影响<sup>[10]</sup>。本工作从产 L-精氨酸的钝齿棒杆菌突变株 8-193 出发,利用同源重组技术敲除了  $\gamma$ -谷氨酰激酶基因,以期阻断谷氨酸生成脯氨酸的代谢途径,考察了基因敲除菌株积累 L-精氨酸的能力及其它生理特性。

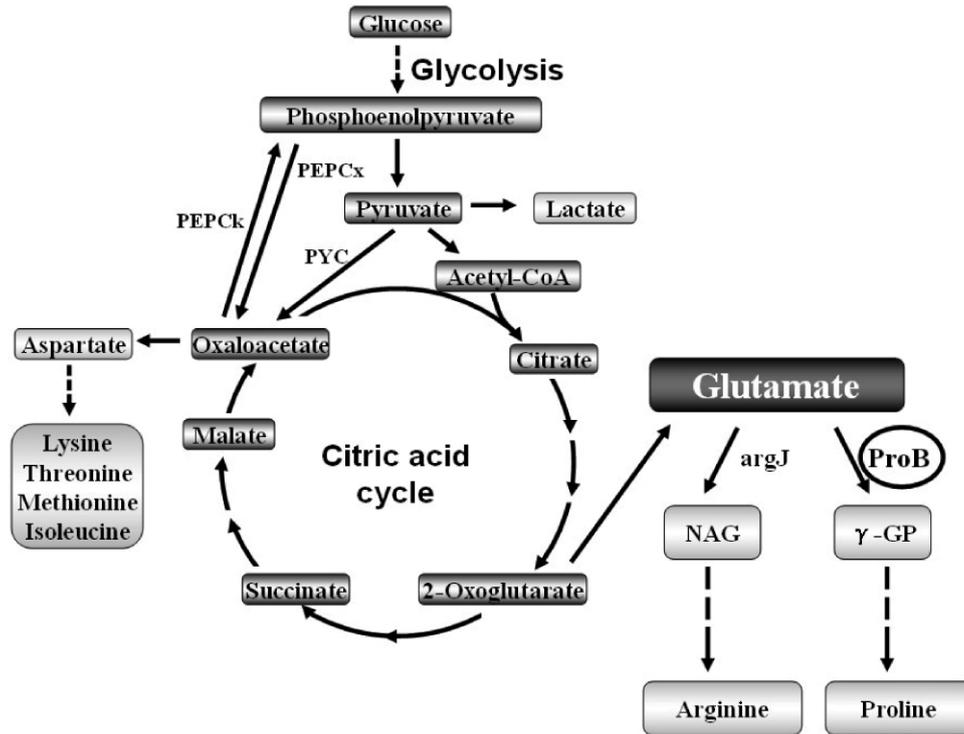


图 1 谷氨酸棒杆菌中心代谢途径和相关氨基酸的合成

Fig.1 Diagram of the central metabolism and the biosynthesis of several amino acids of *C. glutamicum*. Abbreviations: PEPCK, PEP carboxykinase; PEPCKx: PEP carboxylase; PYC: pyruvate carboxylase; argJ: ornithine acetyltransferase; ProB:  $\gamma$ -glutamyl kinase; NAG: N-Acetyl-glutamate;  $\gamma$ -GP:  $\gamma$ -Glutamylphosphate. Dashed arrows indicate pathways consisting of several reactions; solid arrows indicate single reactions.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本实验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器:所有分子生物学工具酶均购自 TaKaRa 公司;L-谷氨酸购自 BBI 公司;磷酸烯醇丙酮酸 PEP 和苹果酸脱氢酶均购自 Sigma 公司;ATP 购自 Bio Basic Inc 公司;NADH 购自 Ameresco 公司;其余生化药品为进口或国产分析纯试剂;使用的主要仪器有 MJ 公司 PTC-150 型基因扩增仪;BIO-RAD MicroPulser™ 电击仪;Beckman

DU800 分光光度计;Alphalmager EC 凝胶成像仪;Agilent 1200 系列液相色谱仪。

1.1.3 培养基和培养条件:①LB<sup>[12]</sup>培养基用于培养 *E. coli* 和 *C. crenatum*;②LB 培养基加入 4% 甘氨酸用于制备电击转化用的 *C. crenatum* 感受态细胞<sup>[13]</sup>;③LB 培养基加入 10% 的蔗糖作为第二次重组的筛选培养基<sup>[11]</sup>;④基本培养基用于酶活测定和发酵种子培养:每升含葡萄糖 20 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,  $\text{NaCl}$  0.1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  25 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  25 mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  50 mg, 生物素 0.4 mg, 硫胺素 0.2 mg, 组氨酸 50 mg, 脯氨酸 400 mg (培养 8-193-

表1 实验所用菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 <i>LacZ</i> $\Delta$ M15 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i>	Stored in this lab
<i>C. crenatum</i>		
8-493	his <sup>-</sup> SG <sup>R</sup>	This lab
8-493- $\Delta$ <i>proB</i>	his <sup>-</sup> SG <sup>R</sup> , pro <sup>-</sup> , 8-493 with <i>proB</i> knock-out	This study
8-493- $\Delta$ <i>proB</i> -C	his <sup>-</sup> SG <sup>R</sup> 8-493- $\Delta$ <i>proB</i> complemented with pBS57- <i>proB</i>	This study
Plasmids		
pMD19-T	T-vector 2.7 kb, Amp <sup>R</sup> <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pK18 <i>mobsacB</i>	Mobilizable <i>E. coli</i> vector; Km <sup>R</sup> Suc <sup>S</sup>	Schäfer A <sup>[11]</sup>
pT-F <i>proB</i>	pMD19-T containing <i>proB</i> upstream fragment from 8-493	This study
pT-B <i>proB</i>	pMD19-T containing <i>proB</i> downstream fragment from 8-493	This study
pT- <i>proB</i>	pMD19-T containing 1.2kb PCR fragment of 8-493 <i>proB</i> gene	This study
pK18-F <i>proB</i>	pK18 <i>mobsacB</i> containing <i>proB</i> upstream fragment from 8-493	This study
pK18- $\Delta$ <i>proB</i>	pK18 <i>mobsacB</i> containing <i>proB</i> in-frame deletion fragment $\Delta$ <i>proB</i> from 8-493	This study
pBS57	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle expression vector, Km <sup>R</sup>	This lab
pBS57- <i>proB</i>	pBS57 containing <i>proB</i> from 8-493, to generate <i>proB</i> expression or complementation for 8-493- $\Delta$ <i>proB</i>	This study

his<sup>-</sup>: no cell growth without histidine addition on minimal medium, SG: sulfaganidine, pro<sup>-</sup> no cell growth without proline addition on minimal medium.

$\Delta$ *proB* 时添加), 调 pH 至 7.0; ⑤ 发酵培养基: 每升含葡萄糖 60g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 20mg, 生物素 0.1mg, 硫胺素 0.2mg, CaCO<sub>3</sub> 30g, 组氨酸 50mg, 脯氨酸 400mg (培养 8-493- $\Delta$ *proB* 时添加), 调 pH 至 7.0。若要制备固体培养基, 按 1.2% 的量加入琼脂粉。*E. coli* 在 37℃ 培养, *C. crenatum* 在 30℃ 培养。抗生素使用浓度为: 氨苄青霉素 100 μg/mL, 卡那霉素 50 μg/mL。

## 1.2 DNA 操作

*E. coli* 质粒提取参照文献 [12], *E. coli* 转化采用 CaCl<sub>2</sub> 法, *C. crenatum* 转化采用电击转化法<sup>[13]</sup>。

## 1.3 *proB* 结构基因及其上、下游基因片段的 PCR 扩增

1.3.1 引物: 根据同源性, 参照 *C. glutamicum* R 的  $\gamma$ -谷氨酰激酶基因 *proB* 序列 (GenBank accession number AP009044), 设计三对引物分别用于扩增 8-193 *proB* 结构基因和 *proB* 内部缺失的上、下游基因片段 (表 2)。

引物 P1 和 P2 用于扩增 *proB* 结构基因。引物 P3 和 P4 用于扩增 *proB* 上游序列 F*proB*, 引物 P5 和 P6 用于扩增 *proB* 下游序列 B*proB*。

1.3.2 PCR 扩增: 采用 20 μL 反应体系, 反应条件为: 98℃ 10s; 68℃ 1min; 30 个循环。反应完毕后, 体系加入 0.5 μL EasyTaq DNA 聚合酶 72℃ 反应 10min。

表2 实验所用引物列表

Table 2 Primers for gene amplification and gene disruption

Primers	Sequences (5'→3')	Size/bp	Restriction site
P1	<u>TTTAAA</u> <b>TAAGGAAGCTA</b> AAGTGACAGAGCTTCCCGAC	37	<i>Dra</i> I
P2	<u>TCTAGA</u> <b>TTATGCCGCGCCTG</b> GCGTAGTTGG	29	<i>Xba</i> I
P3	GGT <u>AAGCTT</u> <b>AGCCAGCGCC</b> CTCGCATTGT	29	<i>Hind</i> III
P4	CGG <u>TCTAGA</u> <b>ACTGCGCCAG</b> AGGACACAAC	29	<i>Xba</i> I
P5	GAC <u>TCTAGA</u> <b>TGATGATGGC</b> GCGGTGGAAG	29	<i>Xba</i> I
P6	CAC <u>GAATTC</u> <b>TGGCTGTCAG</b> GAAGTGCTC	29	<i>EcoR</i> I

Boxed bases indicate restriction sites; bold bases indicate Shine-Dalgarno sequence; underlined bases indicate homologous sequences with *proB*.

引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。引物设计采用软件 Primer premier 5.0。

## 1.4 酶活分析

1.4.1  $\gamma$ -谷氨酰激酶: 将 8-493、8-493- $\Delta$ *proB* 和 8-193- $\Delta$ *proB*-C 分别接种于培养基④中, 在 30℃ 摇床培养 12h 后, 离心收集菌体。用 50mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0) 洗涤 2 次, 用该缓冲液悬浮菌体, 置冰浴中超声破碎菌体细胞。细胞破碎液经 13500 r/min 离心 15min 后, 上清液用于酶活测定。

测活体系参照文献 [14], 37℃ 反应 90min。加

入 1 mL 反应终止液:55 g/L  $\text{FeCl}_3$ , 20 g/L 三氯乙酸 21 mL/L HCl。离心,取上清测定  $\gamma$ -谷氨酰氧肟酸的光吸收值  $A_{535}$ 。 $\gamma$ -谷氨酰氧肟酸的摩尔消光系数为:250  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

一个单位  $\gamma$ -谷氨酰激酶活力定义为:反应体系中每分钟生成 1 nmol  $\gamma$ -谷氨酰氧肟酸所需的酶量。

**1.4.2 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶:**将 8-493 和 8-193- $\Delta proB$  分别接种于培养基④中,在 30 °C 摇床培养 12 h 后,离心收集菌体。用 100 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5) 洗涤 2 次,用该缓冲液悬浮菌体,置冰浴中超声破碎菌体细胞。细胞破碎液经 13500 r/min 离心 15 min 后,上清液用于酶活测定。

采用苹果酸脱氢酶偶联测定法,测活体系参照文献[15],样品混匀后测定  $A_{340}$  值。NADH 的摩尔消光系数为:6220  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

一个单位磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活力定义为:反应体系中每分钟转化 1 nmol NADH 为  $\text{NAD}^+$  所需的酶量。

**1.4.3 丙酮酸羧化酶:**将 8-493 和 8-493- $\Delta proB$  分别接种于培养基④中,在 30 °C 摇床培养 12 h 后,离心收集菌体。用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 6.3, 含 50 mmol/L NaCl) 洗涤 2 次,适量 HEPES (100 mmol/L, 含 20% 甘油) 悬浮,置于 -20 °C 保存。测活前,将之取出冰融,加入 3% CTAB 使终浓度为 0.3%,迅速混匀后室温作用 1 min,取适量立即用于测定反应。

采用苹果酸脱氢酶偶联法,测活体系参照文献[16]。样品混匀后测定  $A_{340}$  值。

一个单位丙酮酸羧化酶活力定义为:上述细胞处理和反应条件下,每分钟转化 1 nmol NADH 所需的细胞量。

**1.4.4 粗酶液中蛋白含量的测定:**采用考马斯亮蓝法<sup>[17]</sup>。

## 1.5 发酵实验

**1.5.1 摇瓶发酵:**将 8-493、8-493- $\Delta proB$  分别接种于培养基④中,在 30 °C 摇床 300 r/min 培养 12 h 后,按照 10% 的接种量接种于发酵培养基⑤中。在 30 °C 摇床 300 r/min 培养,每隔 12 h 取样分析。

**1.5.2 生物量的测定:**发酵液用 1 mol/L HCl 中和碳酸钙后,用蒸馏水稀释至适当倍数,测定 600 nm 处的光密度。

**1.5.3 葡萄糖的测定:**采用 SBA-40C 生物传感分析仪测定发酵液中残余的葡萄糖浓度。

**1.5.4 氨基酸的测定:**发酵液经 12000 r/min 离心 10 min 后,取上清,稀释适当倍数,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔膜过滤后,采用高效液相色谱仪 Agilent 1200 进行测定氨基酸的分析。

柱条件:色谱柱为 Zorbax Eclipse-AAA (Agilent);流动相 A:40mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH7.8; B:ACN:MeOH:水(45:45:10, v/v/v) 梯度洗脱<sup>[18]</sup>;流速 2.0 mL/min;柱温 40 °C;程序进样<sup>[18]</sup>;检测器:DAD 338 nm 和 262 nm。

**1.5.5 有机酸的测定<sup>[19]</sup>:**发酵液经于 80 °C 水浴 10 min,12000 r/min 离心 10 min 后,取上清,稀释适当倍数,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔膜过滤后,采用高效液相色谱仪 Agilent 1200 进行有机酸分析。

柱条件:色谱柱为 Aminex HPX-87H (BioRad);流动相 2.75 mmol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;流速 0.6 mL/min;柱温 50 °C;进样量 10  $\mu\text{L}$ ;检测器:DAD 210 nm。

## 2 结果和分析

### 2.1 *proB* 基因克隆和序列同源性

以 8-493 染色体 DNA 为模板,用引物 P1 和 P2,经 PCR 扩增得到一条约 1.2 kb 的片段。纯化后连接 pMD19-T 载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上,筛选得到带有 *proB* 基因的重组子,重组质粒命名为 pT-*proB*。插入片段经测序分析,长度为 1246 bp,包含一个长度为 1221 bp 的 ORF,起始密码子为 GTG,编码一条 406 个氨基酸的多肽链。*C. crenatum* 8-493 的 *proB* 基因编码区与 *C. glutamicum* R *proB* 基因编码区序列比对:核酸序列同源性为 99.34%,有 8 个碱基的差别;氨基酸序列同源性为 100%。该序列已提交 GenBank,序列号为:JF897613。

用 *Dra* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pT-*proB*,回收 *proB* 片段。同时用 *Dra* I 和 *Xba* I 双酶切表达载体 pBS57,回收大片段,与上述 *proB* 片段连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上,筛选得到带有 *proB* 基因的表达载体,命名为 pBS57-*proB*。

### 2.2 敲除载体 pK18- $\Delta proB$ 的构建

以 8-493 染色体 DNA 为模板,分别用引物 P3,

P4 和 P5 ,P6 经 PCR 扩增得到两条 1.1 kb 的片段。纯化后分别连接 pMD19-T 载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上,筛选得到带有相应片段的阳性克隆。重组质粒经酶切验证后分别命名为 pT-FproB、pT-BproB。

用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切质粒 pT-FproB,回收 FproB 片段。同时用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切质粒 pK18*mobsacB*,回收大片段,与上述 FproB 片段连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上,筛选得到带有 *proB* 上游序列的阳性克隆。重组质粒经酶切验证后命名为 pK18-FproB,用 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pT-BproB,回收 BproB 片段。同时用 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pK18-FproB,回收大片段,与上述 BproB 片段连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上,筛选阳性克隆。重组质粒经酶切验证,仅带有 *proB* 基因的上游和下游 DNA 片段,缺失了部分中间序列,与预期结果相符,命名为 pK18- $\Delta$ *proB*,用于 *proB* 基因敲除。

### 2.3 *proB* 基因敲除菌株的筛选与互补

将敲除载体 pK18- $\Delta$ *proB* 经电击法转化 8-493 后,涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上,筛选重组子。pK18- $\Delta$ *proB* 在 8-493 中无法复制,如果转化子已获得卡那霉素抗性,那么证明在该重组子中,pK18- $\Delta$ *proB* 与染色体 DNA 已完成第一次同源重组,载体 DNA 完全整合于宿主染色体上。

将带有卡那霉素抗性的重组子涂布于培养基③的平板上,进行第二次筛选。在培养基③上生长时,pK18- $\Delta$ *proB* 载体上的 *sacB* 基因会对宿主菌产生致死效应,只有发生第二次同源重组,载体 DNA 从基因组上被删除的重组子方可存活,这类转化子同时失去卡那霉素抗性。

通过菌落 PCR 的方法筛选和鉴定得到 *proB* 基因敲除的菌株。为了确保经过筛选得到的菌株确为单一的 *proB* 基因敲除的纯菌株,在培养基③的平板上进行第二次筛选。所得到的 *proB* 基因敲除菌株命名为 8-493- $\Delta$ *proB*。

将 2.1 得到的表达载体 pBS57-*proB* 经电击法转化 *proB* 基因敲除的菌株 8-493- $\Delta$ *proB*,在含有卡那霉素的 LB 平板上挑选重组子。对重组子进行质粒提取和酶切验证,确认获得了互补菌株 8-493- $\Delta$ *proB*-C。

### 2.4 *proB* 基因敲除菌株的验证

为了验证菌株  $\Delta$ *proB* 染色体上 *proB* 基因已被敲除失活,我们对筛选得到的重组子进行了 PCR 检测、营养缺陷型验证和酶活力分析。

分别以 8-493 和 8-493- $\Delta$ *proB* 染色体 DNA 为模板,用引物 P3 和 P6 进行 PCR 扩增,对得到的 PCR 产物进行凝胶电泳。从 8-493- $\Delta$ *proB* 扩增得到的 PCR 产物长度比从出发菌株 8-493 得到的小 600bp 左右(图 2),与预期结果是一致的。

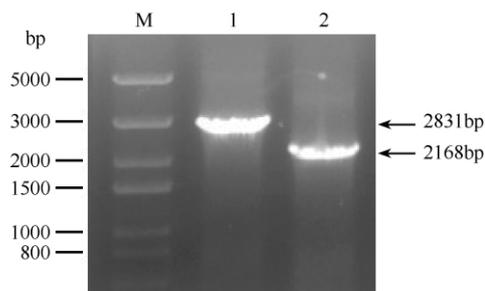


图 2 *proB* 基因敲除菌株的 PCR 鉴定

Fig. 2 Characterization of defined *proB* knock-out mutant by PCR analysis. M. DNA marker (*Trans*5K DNA Marker); 1. PCR fragment of *proB* of 8-493; 2. PCR fragment of *proB* of 8-493- $\Delta$ *proB*.

将 8-493、8-493- $\Delta$ *proB* 和 8-493- $\Delta$ *proB*-C 同时划线接种于基本培养基平板上,30  $^{\circ}$ C 培养 48 h。观察各菌株的生长情况,结果表明在同时添加了组氨酸和脯氨酸的基本培养基上,三株菌均可正常生长;在只添加了组氨酸的基本培养基上,8-493- $\Delta$ *proB* 无法生长,而 8-493 和 8-493- $\Delta$ *proB*-C 正常生长(图 3)。证明在 *proB* 敲除菌株中,该基因已失活,使菌株表

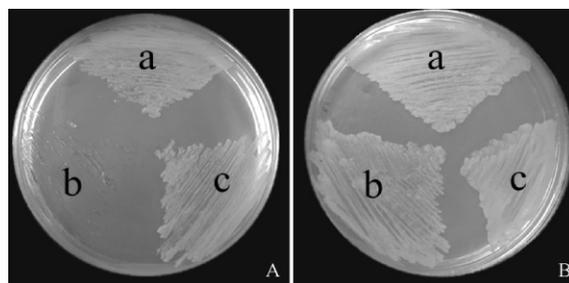


图 3 8-493、8-493- $\Delta$ *proB* 和 8-493- $\Delta$ *proB*-C 在基本培养基上的生长情况

Fig. 3 The growth of 8-493, 8-493- $\Delta$ *proB* and 8-493- $\Delta$ *proB*-C on minimal medium. I: Minimal medium containing histidine; II: Minimal medium containing histidine and proline. a: *C. crenatum* 8-493; b: *C. crenatum* 8-493- $\Delta$ *proB*; c: *C. crenatum* 8-493- $\Delta$ *proB*-C.

现出脯氨酸营养缺陷型。

对这三株菌的  $\gamma$ -谷氨酰激酶活力进行了测定。在 8-193- $\Delta proB$  中没有检测到酶活性,8-193 菌株的酶比活力为  $18.35 \pm 0.22$  U/mg,而 8-193- $\Delta proB$ -C 的酶比活力为  $23.19 \pm 0.93$  U/mg,比出发菌株提高了 26.38%,说明 *proB* 基因在 8-193- $\Delta proB$  中实现了表达。

以上实验结果均表明 8-193- $\Delta proB$  确实是 *proB* 基因敲除菌株。

### 2.5 *proB* 基因敲除对 8-193 生理特性的影响

为了研究 *proB* 基因敲除后对 8-193 代谢的影响,我们用基本培养基进行了摇瓶发酵实验,考察了细胞生长,葡萄糖利用,L-精氨酸及副产物积累的变化。

在相同接种量的条件下,8-193- $\Delta proB$  较出发菌株 8-193 进入对数期和稳定期时间早,且进入稳定期之前生物量高于 8-193,但最终的生物量低于出发菌株 9.6% (图 4-A)。菌体葡萄糖利用和 L-精氨酸积累的测定结果表明:8-193- $\Delta proB$  的葡萄糖利用略快于出发菌株 8-193。而 8-193- $\Delta proB$  合成 L-精氨酸的速率一直高于 8-193,最终积累浓度为 13.78 g/L,比出发菌株 8-193 提高了 13.6% (图 4-B)。

对两株菌的发酵参数进行了分析。结果表明,*proB* 基因敲除对 8-193 的发酵特性产生了影响。糖耗速率增加,产物得率和生产强度都有所提高(表 3)。

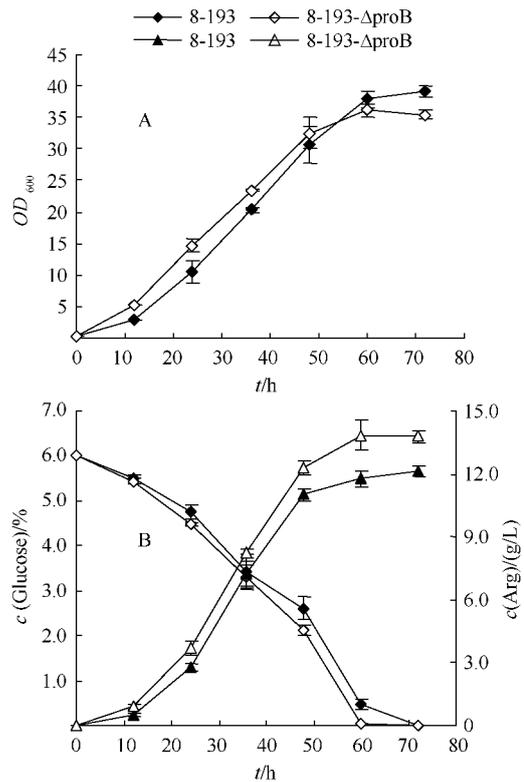


图 4 8-193 和 8-193- $\Delta proB$  的发酵过程: A 生长曲线; B 糖耗和产酸曲线

Fig. 4 Time course of 8-193 and 8-193- $\Delta proB$  fermentation: (A) cell growth profiles; (B) glucose consumption and L-arginine production profiles.

表 3 两菌株的发酵参数比较

Table 3 Comparison of fermentation parameters of the two strains

Strains	Parameters						
	$P_{Arg}$ / (g/L)	$X_{max}$ / (g/L)	$Q_s$ / [g/(L·h)]	$R_x$ / [g/(L·h)]	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$\Phi$ [g/(L·h)]
8-193	12.13	10.12	0.83	0.14	0.20	0.17	0.17
8-193- $\Delta proB$	13.78	9.32	1.00	0.13	0.23	0.16	0.19

$P_{Arg}$ : Arginine Production;  $X_{max}$ : The maximum Cell Dry weight;  $Q_s$ : Glucose consumption rate;  $R_x$ : Average Growth Rate;  $Y_{P/S}$ : Arginine yield on Glucose;  $Y_{X/S}$ : Biomass yield on Glucose;  $\Phi$ : Arginine productivity.

我们也对发酵液中副产物氨基酸进行了测定(表 4)。8-193- $\Delta proB$  发酵液中天冬氨酸族氨基酸(天冬氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸)浓度均有所提高,谷氨酸族氨基酸浓度提高最为显著,谷氨酸、谷氨酰胺和瓜氨酸分别提高了 145%、194% 和 70%。而丝氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸浓度未有明显变化,丙氨酸和缬氨酸的浓

度略有下降。

同时,对发酵液中的有机酸进行了分析。结果表明 8-193- $\Delta proB$  发酵液中乳酸和苹果酸含量较出发菌株 8-193 分别提高了 70.3% 和 31.2%; $\alpha$ -酮戊二酸、磷酸烯醇式丙酮酸和琥珀酸含量分别降低了 9.1%、31.4% 和 49.7%;而柠檬酸含量没有明显变化(表 5)。

表 4 发酵液中的副产物氨基酸分析

Table 4 The analysis of by-product amino acids in fermentation broth

Strains	c(Amino acid)/(mg/L)				
	Aspartate	Asparagine	Isoleucine	Lysine	Threonine
8-193	137.86 ± 9.93	30.13 ± 0.89	1858.23 ± 66.08	86.70 ± 6.71	308.90 ± 54.58
8-193- $\Delta$ proB	154.07 ± 5.56	33.20 ± 1.57	2249.27 ± 59.39	130.35 ± 4.67	370.99 ± 22.77
	Methionine	Glutamate	Glutamine	Citrulline	Serine
8-193	78.00 ± 8.37	8.22 ± 1.21	4.15 ± 0.68	749.77 ± 3.57	6.13 ± 1.10
8-193- $\Delta$ proB	98.90 ± 6.22	20.10 ± 1.83	12.22 ± 1.10	1278.29 ± 18.05	6.87 ± 0.31
	Tyrosine	Phenylalanine	Alanine	Valine	Leucine
8-193	52.35 ± 6.55	55.80 ± 9.20	1546.10 ± 75.68	5.01 ± 0.62	28.17 ± 2.40
8-193- $\Delta$ proB	51.14 ± 2.67	55.14 ± 3.39	1350.72 ± 43.65	4.65 ± 0.30	28.92 ± 1.90

表 5 发酵液中的有机酸分析

Table 5 The analysis of organic acids in fermentation broth

Strains	c(Organic acid)/g/L				
	Citric acid	Acetic acid	Lactic acid	Succinic acid	Malic acid
8-193	0.47 ± 0.05	3.72 ± 0.02	2.22 ± 0.35	4.63 ± 0.38	1.54 ± 0.04
8-193- $\Delta$ proB	0.48 ± 0.07	3.80 ± 0.13	3.78 ± 0.34	2.33 ± 0.44	2.02 ± 0.42
	Pyruvate	$\alpha$ -Ketoglutaric acid		PEP	
8-193	0.42 ± 0.01	0.33 ± 0.12		0.00637 ± 0.00046	
8-193- $\Delta$ proB	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.00		0.00437 ± 0.00034	

以上结果表明 *proB* 基因敲除对谷氨酸节点处代谢流的影响最为显著,表现为  $\alpha$ -酮戊二酸进入谷氨酸族氨基酸合成途径的流量增加。这一改造导致  $\alpha$ -酮戊二酸下游琥珀酸节点处碳流减少,琥珀酸的积累量只有出发菌株的一半。而回补代谢途径可以在草酰乙酸节点处,补充这部分流失的碳流,因此苹果酸的浓度反而有所提高,天冬氨酸族氨基酸的浓度也有不同程度的提高。

### 2.6 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶活性测定

为了研究 *proB* 基因敲除对 8-193 菌株中心代谢回补途径的影响,分别测定了出发菌株和 *proB* 基因敲除菌株的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶活性。结果表明,与出发菌株相比,8-193- $\Delta$ proB 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性提高了 75%,丙酮酸羧化酶活性提高了 44%(表 6)。说明 8-193- $\Delta$ proB 的回补代谢流增强。

表 6 8-193 和 8-193- $\Delta$ proB 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶比活力Table 6 Specific activity of PEPCx and PYC of 8-193 and 8-193- $\Delta$ proB

Strains	Specific enzyme activity	
	PEPCx/ (U/mg protein)	PYC/ (U/mg cell dry weight)
8-193	94.4 ± 6.9	57.2 ± 3.6
8-193- $\Delta$ proB	165.2 ± 12.0	82.3 ± 13.9

## 3 讨论

谷氨酸是 L-精氨酸合成和 L-脯氨酸合成的共同前体化合物。本工作通过同源重组技术敲除 8-193 菌株的  $\gamma$ -谷氨酰激酶基因 *proB*,阻断 L-脯氨酸的合成途径,增加谷氨酸在 L-精氨酸合成中的可利用性。实验结果表明,*proB* 基因敲除后,突变株完全失去  $\gamma$ -谷氨酰激酶活性,表现为 L-脯氨酸营养缺陷型。突变株的发酵特性改变,生长和葡萄糖利用均加快,L-精氨酸积累能力提高了 13.6%。从氨基酸副产物和有机酸分析的结果,可以看到阻断谷氨酸的分支代谢后菌株的其他生理特性也发生了较大变化。谷氨酸是从  $\alpha$ -酮戊二酸衍生出的氨基酸,*proB* 基因敲除后,菌株  $\alpha$ -酮戊二酸进入谷氨酸的代谢流也有所增加,谷氨酸、谷氨酰胺和瓜氨酸的积累量升高,说明在 L-精氨酸合成途径上还存在瓶颈。而流入其下游产物琥珀酸的流量下降,琥珀酸的积累减少了 50%。此外,基因敲除菌株天冬氨酸族氨基酸浓度有所提高,这是由于  $\alpha$ -酮戊二酸节点处的分流使得三羧酸循环的碳流减弱,菌株通过回补途径补充碳流,增加了草酰乙酸的合成,这部分代谢流一方面使得菌株的能量合成没有受到影响,另一方面也有部分碳流自草酰乙酸进入了天冬氨酸族氨基酸的合成路径。棒杆菌在以葡萄糖为碳源生长时,存在两个合成草酰乙酸的回补途径,分别由丙酮酸

羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化,二者同时表现活性<sup>[15-16]</sup>。*proB* 敲除菌株的这两个回补酶的活性均有所提高,菌株生长和葡萄糖利用均加快。同时,丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸以及自丙酮酸衍生出的氨基酸的积累都有不同程度降低。这从另一个方面验证了我们的推测。

本工作敲除了 8-193 的 *proB* 基因,研究了 8-193- $\Delta$ *proB* 菌株的生理特性。在谷氨酸棒杆菌基因组中,与 L-脯氨酸生物合成相关的基因已被鉴定<sup>[20-21]</sup>。*proB* 与编码  $\gamma$ -谷氨酰磷酸还原酶的基因 *proA* 之间有一个长约 1kb 的未知基因 *proA* 位于未知基因的下流,而编码吡咯啉-5-羧酸还原酶的 *proC* 基因位于基因组的其它位置。本工作敲除了 *proB* 基因内部 600bp 左右的序列,序列分析表明,在敲除了 600bp 的核苷酸后 *proB* 的 ORF 内部未有启动子或终止子序列。因此 *proB* 基因敲除不会影响其下游基因的表达。8-193- $\Delta$ *proB* 菌株的互补实验结果也证明了这一点。可见 *proB* 敲除菌株代谢特性的改变确实是由 *proB* 基因功能所决定的。

本工作将阻断谷氨酸的分支代谢以提高精氨酸产物合成的策略用于精氨酸产生菌突变株的分子改造,获得了成功。但研究结果表明,在钝齿棒杆菌 8-193- $\Delta$ *proB* 菌株的精氨酸合成途径上还存在瓶颈。ArgR 是精氨酸生物合成基因簇中的转录阻遏蛋白。在谷氨酸棒杆菌中 *argR* 调节精氨酸合成途径中的关键酶, N-乙酰谷氨酰激酶基因 *argB* 的转录,在精氨酸合成途径中起着负调节作用<sup>[22-23]</sup>。敲除 8-193- $\Delta$ *proB* 菌株的 *argR* 基因并表达 *argB* 基因,将有可能进一步改善菌株的精氨酸合成能力。

## 参考文献

- [1] Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002, 56(9):427-438.
- [2] de Jonge WJ, Kwikkers KL, te Velde AA, van Deventer SJ, Nolte MA, Mebius RE, Ruijter JM, Lamers MC, Lamers WH. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 110(10): 1539-1548.
- [3] Bian K, Murad F. Nitric oxide (NO) - biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. *Frontiers in bioscience*, 2003, 8: 264-278.
- [4] Lu CD. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70: 261-272.
- [5] Xu Y, Labedan B, Glansdorff N. Surprising Arginine Biosynthesis: a Reappraisal of the Enzymology and Evolution of the Pathway in Microorganisms. *Microbiology and molecular biology review*, 2007, 71: 36-47.
- [6] 陈雪岚,许正宏,陶文沂. 钝齿棒杆菌产精氨酸关键酶分析. *食品科学(Food Science)*, 2005, 26: 35-39.
- [7] 饶志明,徐美娟,陆元修,周晨,蓝春燕,窦文芳,张晓梅,许泓瑜,许正宏. 钝齿棒杆菌精氨酸琥珀酸酶编码基因 *argH* 的克隆表达及其重组菌发酵产精氨酸研究. *中国生物工程杂志(China Biotechnology)*, 2010, 30(9): 49-55.
- [8] Tuchman M, Rajagopal BS, McCann MT, Malamy MH. Enhanced production of arginine and urea by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 33-38.
- [9] Ikeda M, Mitsuhashi S, Tanaka K, Hayashi M. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-Arginine and L-Citrulline Producer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 1635-1641.
- [10] 郝宁,赵智,王宇,张英姿,丁久元. 钝齿棒杆菌 N-乙酰谷氨酰激酶基因的克隆、序列分析及表达. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(1): 90-94.
- [11] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler. A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73.
- [12] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] Jang KH, Britz ML. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 539-545.
- [14] Hayzer DJ, Leisinger T. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of general microbiology*, 1980, 118(2): 287-293.
- [15] O'Regan M, Thierbach G, Bachmann B, Villeval D, Lepage P, Viret JF, Lemoine Y. Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Gene*, 1989, 77(2): 237-251.
- [16] 王锋,刘阳剑,王宇,张英姿,余志华,丁久元. 钝齿棒杆菌 CD945 丙酮酸羧化酶基因的克隆、序列分析及表达. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43(2): 214-219.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.

- [18] Henderson JW, Ricker RD, Bidlingmeyer BA, Woodward C. Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids. AAA Technical note P5 2000: Publication No 5980-1193.
- [19] Chinnici F, Spinabelli U, Riponi C, Amati A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Food Composition and Analysis*, 2005, 18: 121-130.
- [20] Ankri S, Serebrijski I, Reyes O, Leblon G. Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the *proA* step. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(15): 4412-4419.
- [21] Serebrijski I, Wojcik F, Reyes O, Leblon G. Multicopy Suppression by *Asd* Gene and Osmotic Stress-Dependent Complementation by Heterologous *proA* in *proA* Mutants. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(24): 7255-7260.
- [22] Lee SY, Park JM, Lee JH, Chang ST, Park JS, Kim YH, Min J. Interaction of Transcriptional Repressor ArgR with Transcriptional Regulator FarR at the *argB* Promoter Region in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(3): 711-718.
- [23] Lee SY, Shin HS, Park JS, Kim YH, Min J. Proline reduces the binding of transcriptional regulator ArgR to upstream of *argB* in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1): 235-242.

## Effect of gamma-glutamyl kinase gene knock-out on metabolism in L-arginine-producing strain *Corynebacterium crenatum* 8-193

Xiaoman Li<sup>1,2</sup>, Zhi Zhao<sup>1</sup>, Yingzi Zhang<sup>1</sup>, Yu Wang<sup>1</sup>, Jiuyuan Ding<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [ **Objective** ] In order to optimize precursor supply for L-arginine biosynthesis, we constructed a *Corynebacterium crenatum* 8-193 mutant with gamma-glutamyl kinase gene (*proB*) in-frame deletion. The effects of *proB* knock-out on physiological characteristics of the mutant were investigated. [ **Methods** ] The upstream and downstream fragments of *proB* were cloned from *C. crenatum* 8-193 chromosome and ligated to integration vector. The mutant *C. crenatum* 8-193- $\Delta$ *proB* was obtained by homologous recombination. The mutant phenotype can be reversed by complementation with *proB* gene from the expression vector. The physiological characteristics of the mutant were investigated by measurement of the activities of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCx) and pyruvate carboxylase (PYC). [ **Results** ] The *proB* gene in-frame deletion was screened and confirmed by PCR, gamma-glutamyl kinase determination and complementation. The mutant lost the ability of growth on minimal medium without proline addition. The *proB* knock-out mutant resulted a decrease of cell mass by 9.6% and an increase of L-arginine accumulation by 13.6% compared with that of the parent strain. The analysis of by-products of fermentation broth showed that the concentrations of glutamate-related and aspartate-related amino acids increased, and the concentrations of  $\alpha$ -ketoglutaric acid, PEP and succinic acid decreased. The specific activities of PEPCx and PYC increased in 8-193- $\Delta$ *proB*. [ **Conclusion** ] The *proB* gene knock-out of the strain 8-193 blocked branch catabolism of L-glutamate and improved efficiency of the glucose utilization and L-arginine accumulation.

**Keywords:** *Corynebacterium crenatum*, gamma-glutamyl kinase, gene knock-out, L-arginine

(本文责编:王晋芳)

Corresponding author. Tel/Fax: + 86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

Received: 4 May 2011 / Revised 27 May 2011