

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除对北京棒杆菌 PD-67 的生理代谢的影响

陆敏涛^{1,2}, 赵智¹, 张英姿¹, 王宇¹, 丁久元^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:【目的】为了优化 L-色氨酸合成的前体供应, 构建北京棒杆菌 PD-67 (*Corynebacterium pekinense* PD-67) 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (EC:4.1.1.31, phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCx) 基因 *ppc* 敲除的菌株, 并研究 *ppc* 基因敲除对菌株生理特性的影响。【方法】运用 PCR 技术扩增 *ppc* 基因的上游和下游序列, 构建带有目标基因内部缺失的基因整合载体。通过同源重组技术将 *C. pekinense* PD-67 的 *ppc* 基因敲除, 构建 *ppc* 基因缺陷突变株 *C. pekinense* PD-67- Δppc 。通过摇瓶发酵研究突变株的生理特性, 并测定突变株丙酮酸激酶和丙酮酸羧化酶的活性。【结果】PCR 验证和 PEPCx 活性分析结果表明, 筛选到 *ppc* 缺陷的突变株。摇瓶发酵结果表明, 与出发菌株相比, 突变株的生长速率下降, 生物量降低 20%, L-色氨酸积累降低 62%, 丙酮酸激酶活力提高, 而丙酮酸羧化酶活力下降。【结论】*C. pekinense* PD-67 的 *ppc* 基因敲除以后, 对菌株的代谢影响较大。仅通过阻断 PEPCx 催化的回补途径, 减少磷酸烯醇式丙酮酸的分支代谢, 不能提高该菌株 L-色氨酸的积累。

关键词: 北京棒杆菌; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; L-色氨酸; 基因敲除

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1334-07

磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP) 是糖代谢的中间产物, 参与糖酵解途径和回补途径, 能被多种途径竞争性利用, 例如磷酸转移酶系统 (Phosphotransferase system, PTS), 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCx) 和丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase, PK) 的不可逆催化, 是代谢调控的一个关键节点。同时, PEP 也是芳香族氨基酸合成的前体化合物, 在 DAHP 合成酶催化下与 4-磷酸赤藓糖缩合生成芳香族化合物合成途径的第一个化合物 3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖-7-磷酸 (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)。PEP 的可利用性直接影响到芳香族化合物的合成。因此, PEP 也是芳香族氨基酸合成调控的重要靶点。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化 CO₂ 和 PEP 生成草酰乙酸和无机磷酸, 该反应为三羧酸循环 (TCA cycle) 提供草酰乙酸, 在碳代谢中起着回补作用, 从而保证了 TCA 循环和氨基酸合成中 C₄ 分子的持续供应^[1]。多种细菌的 PEPCx 已经得到研究^[2–3], 乙酰辅酶 A 和果糖-1,6-二磷酸对其有激活作用, 而天冬氨酸和 α -酮戊二酸对其有反馈抑制作用^[3–5]。

L-色氨酸是人和动物必需氨基酸, 广泛用于医药、食品和饲料添加剂领域, 市场需求很大。但是, 目前发酵法生产 L-色氨酸的效率较低, 实现高产率仍然比较困难。利用代谢工程技术改善菌株的生产性能已经受到研究者的重视, 采用的策略包括通过对中心代谢途径的修饰, 增加前体物的供应^[6–7]; 或通过芳香族氨基酸合成途径的修饰, 增强代谢转化

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

作者简介: 陆敏涛 (1983–), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: lumintao@126.com

收稿日期: 2010-04-26; 修回日期: 2010-05-24

过程^[8]。

北京棒杆菌 PD-67 是能够积累 L-色氨酸的突变株。我们已经对其芳香族氨基酸合成途径中的两个关键酶,邻氨基苯甲酸合成酶和 DAHP 合成酶进行了研究^[9-10]。本工作以 PEP 为靶点,采用同源重组技术构建了 *ppc* 基因敲除突变株,阻断了 PEPCx 催化的回补途径,减少 PEP 的代谢支路,考察了该突变株的生理特性。

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。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work		
Strains or plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80 LacZ ΔM15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	Stored in this lab
<i>C. pekinense</i> PD-67	<i>phe</i> ⁻ <i>tyr</i> [±]	This lab
<i>C. pekinense</i> PD-67-Δ <i>ppc</i>	<i>C. pekinense</i> PD-67 with <i>ppc</i> knock-out	This study
Plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pK18 <i>mobsacB</i>	Mobilizable <i>E. coli</i> vector; Km ^R Suc ^S	Schäfer A ^[11]
pT-F <i>ppc</i>	pMD19-T containing <i>ppc</i> upstream fragment from PD-67	This study
pT-B <i>ppc</i>	pMD19-T containing <i>ppc</i> downstream fragment from PD-67	This study
pK18- <i>ppc</i>	pK18 <i>mobsacB</i> containing <i>ppc</i> in-frame deletion fragment Δ <i>ppc</i> from PD-67	This study

phe⁻: no cell growth without phenylalanine addition in minimal medium, *tyr*[±]: meager cell growth without tyrosine addition in minimal medium.

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;磷酸烯醇式丙酮酸购自 Sigma;苹果酸脱氢酶和乳酸脱氢酶购自 Amresco;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;Unico 7200 分光光度计;LKB ULTROSPEC II 分光光度计;Alphalmager EC 凝胶成像仪。

1.1.3 培养基和培养条件:①LB^[12]培养基用于培养大肠杆菌;②LB 培养基加入 1% 葡萄糖和 0.2% 的尿素用于培养 *C. pekinense*,并作为测酶活和发酵种子培养基;③LB 培养基加入 4% 甘氨酸^[13]用于制备电击转化用 *C. pekinense* 细胞;④LB 培养基加入 10% 的蔗糖作为第二次重组的筛选培养基;⑤发酵培养基:每升含葡萄糖 85 g, (NH₄)₂SO₄ 20 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, FeSO₄ · 7H₂O 20 mg, MnSO₄ · H₂O 20 mg, 酪氨酸 150 mg, 苯丙氨酸 150 mg, 精氨酸 600 mg, 丝氨酸 100 mg, 生物素 50 μg, 硫胺素 200 μg, CaCO₃ 30 g, 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. pekinense* 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 CaCl₂ 法, *C. pekinense* 转化采用电击转化法^[13]。

1.3 *ppc* 上游和下游基因片段的 PCR 扩增

根据同源性,参照 *C. glutamicum* ATCC 13032 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 *ppc*,设计两对引物用于扩增 *C. pekinense* PD-67 *ppc* 内部缺失的上游和下游基因片段。

引物 P1:5'- TAGGCATGCTGCTGCTGAGCTGGCCAACAC-3'
引物 P2:5'- AAAGGATCCCAAAACAGTGC GCGCGGCGAG-3'
引物 P3:5'- AGTGGATCCTCATGCTGCCAGGCTGGTTTG-3'
引物 P4:5'- CCGGAATTCCACCACCTTTGCCGAAATCTTG-3'

下划线处分别为限制性内切酶 *Sph* I ,*Bam*H I 和 *Bam*H I ,*Eco*R I 切点。

引物 P1 和 P2 用于扩增 *ppc* 上游序列,引物 P3 和 P4 用于扩增 *ppc* 下游序列。

反应体系(50 μL)含:2 × PrimeStar GC buffer 25 μL,dNTP 4 μL,PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL,100 μmol/L 引物各 0.1 μL, DNA 模板 1 μL,ddH₂O 19.4 μL

反应条件为:98 ℃ 10 s; 68 ℃ 1 min; 30 个循环。反应完毕后,体系加入 0.5 μL rTaq DNA 聚合酶 72 ℃ 反应 10 min。

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

1.4 酶活分析

1.4.1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶:将 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67-Δ*ppc* 分别接种于培养基②中,在 30 ℃ 摇床培养 22 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 8000 r/min 离心 10 min 后,上清液用于酶活测定。

采用苹果酸脱氢酶偶联测定法^[14],2 mL 反应体系含:6 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸,10 mmol/L NaHCO_3 ,100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),1 mmol/L DTT,0.15 mmol/L NADH,2 U/mL 苹果酸脱氢酶,3.3 mmol/L MnSO_4 ,适量的粗酶液。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 μmol NADH 为 NAD^+ 所需的酶量。

1.4.2 丙酮酸羧化酶:将 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67- Δppc 分别接种于培养基②中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 22 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 $^{\circ}\text{C}$ 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^[15],500 μL 反应体系含:20 mmol/L 丙酮酸钠,10 mmol/L NaHCO_3 ,10 mmol/L MgCl_2 ,100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),8 mmol/L ATP 二钠盐,0.05 mmol/L NADH,1 U 苹果酸脱氢酶,适量细胞 CTAB 悬液。NADH 的氧化由 340 nm 光吸收测得。

活力单位定义:一个活力单位(U)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。

1.4.3 丙酮酸激酶活性:将 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67- Δppc 分别接种于培养基②中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 22 h 后,离心收集菌体。用 80 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.7) 洗涤两次,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 8000 r/min 离心 10 min 后,上清液用于酶活测定。

采用乳酸脱氢酶偶联法测定^[16],1 mL 反应体系含:80 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7),20 mmol/L KCl,10 mmol/L MnCl_2 ,2 mmol/L ADP,5 mmol/L PEP,0.4 mmol/L NADH,10 U 乳酸脱氢酶,适量的粗酶液,于 340 nm 测定吸光值。

一个酶活力单位定义为:反应体系中每分钟转化 1 μmol NADH 所需的酶量。

1.4.4 粗酶液中蛋白含量的测定:采用考马斯亮蓝法^[17]。

1.5 发酵实验

将 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67- Δppc 分别接种于培养基②中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 300 r/min 培养 22 h 后,按照 10% 的接种量接种于发酵培养基⑤中。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 300 r/min 培养,定时取样分析。在波长 600 nm 处测定菌体生长;发酵液中的葡萄糖含量用 SBA-40C 生物传感分析仪测定;L-色氨酸测定按照文献[18]进行并加以适当的修改。取适量无细胞发酵液以蒸馏水补足到 1 mL,加入 2.5 mL 9 mol/L H_2SO_4 和 0.5 mL 3% 的对二甲氨基苯甲醛,混匀,置暗处反应 1 h 后,加入 100 μL 2% 的 NaNO_2 ,再于暗处反应 30 min,于 600 nm 处测定光吸收值。

发酵液中副产物氨基酸的测定由中国农业科学院饲料研究所中心分析室完成。

2 结果和分析

2.1 *C. pekinense* PD-67 *ppc* 上游和下游片段的克隆及重组质粒 pK18-*ppc* 的构建

提取 *C. pekinense* PD-67 的染色体 DNA 作为模板,分别用引物 P1,P2 和引物 P3,P4,用 PCR 的方法克隆出 2 条大小各为 1 kb 左右 DNA 片段。回收 PCR 产物并分别与 pMD19-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α ,涂布在含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上。挑取阳性克隆,提取质粒酶切验证,结果与预期的相符。重组质粒分别命名为 pT-F*ppc*,pT-B*ppc*。

用 *Sph* I 和 *Bam* H I 双酶切质粒 pT-F*ppc*,回收含有 *ppc* 上游片段的 DNA 片段。同时用 *Sph* I 和 *Bam* H I 双酶切载体 pK18-*mobsacB*,回收大片段,与上述含有 *ppc* 上游片段的 DNA 片段连接,转化 *E. coli* DH5 α ,得到重组质粒 pK18-F*ppc*。重组质粒经酶切鉴定与预期结果相符。

用 *Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切质粒 pT-B*ppc*,回收含有 *ppc* 下游片段的 DNA 片段。同时用 *Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切质粒 pK18-F*ppc*,回收大片段,与上述含有 *ppc* 下游片段的 DNA 片段连接,转化 *E. coli* DH5 α ,涂布在含有卡那霉素的 LB 培养基平板上。挑取阳性克隆,提取质粒酶切验证,结果与预期的相符。重组质粒命名为 pK18-*ppc*。重组质粒 pK18-*ppc* 仅含有 *ppc* 上游和下游 DNA 片段,而缺失了 *ppc* 的部分中间序列。

2.2 C. pekinense PD-67 ppc 基因敲除菌株的筛选与验证

将重组质粒 pK18-ppc 电击转化到 *C. pekinense* PD-67 中,涂布到含有卡那霉素的加有葡萄糖和尿素的 LB 平板上。载体 DNA 在宿主染色体上进行定点整合,在含有卡那霉素的培养基上筛选获得第一次重组子。将第一次筛选得到的重组子在含有 10% 蔗糖培养基平板上进行第二次筛选。由于载体上含有 *sacB* 基因,使菌体不能在含有 10% 蔗糖培养基平板上生长,因此以蔗糖为基质可以排除载体,使载体与染色体 DNA 发生第二次重组,并不再具有卡那霉素抗性。通过菌落 PCR 的方法筛选和鉴定得到 *ppc* 基因敲除的菌株。为了确保经过筛选到的菌株确为单一的 *ppc* 基因敲除的纯菌株,而不再具有卡那霉素抗性,进行第二次蔗糖平板筛选。所得到的 *ppc* 基因敲除菌株命名为 *C. pekinense* PD-67- Δ ppc。

为了验证所得到的 *ppc* 基因敲除菌株,我们对筛选到的重组子进行了 PCR 检测和酶活力分析。

分别提取出发菌株 *C. pekinense* PD-67 和 *ppc* 基因敲除菌株 *C. pekinense* PD-67- Δ ppc 的染色体 DNA 作为模板,用引物 P1 和引物 P4 进行 PCR 扩增,对得到的 PCR 产物进行凝胶电泳。*C. pekinense* PD-67- Δ ppc 的 PCR 产物长度比出发菌株 *C. pekinense* PD-67 小 1.7 kb 左右(图 1),与预期结果是一致的。

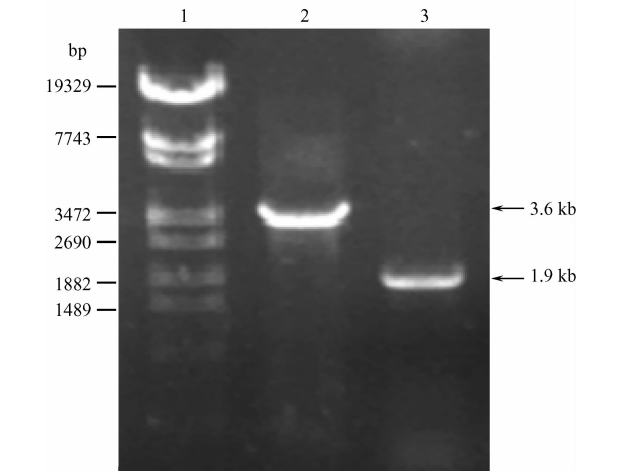


图 1 *ppc* 基因敲除菌株的 PCR 鉴定
Fig. 1 Characterization of defined *ppc* knock-out mutant by PCR analysis. M. DNA marker λ /EcoT14 I; 1. PCR fragment of *ppc* of *C. pekinense* PD-67; 2. PCR fragment of *ppc* of *C. pekinense* PD-67- Δ ppc.

同时,我们也对这两个菌株的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活力进行了测定。结果表明,*C. pekinense* PD-67 的酶比活力为 0.294 U/mg,而未在 *C.*

pekinense PD-67- Δ ppc 中检测到酶活性。PCR 检测和酶活性分析结果均表明,*C. pekinense* PD-67- Δ ppc 确实是 *ppc* 基因敲除菌株。

2.3 ppc 基因敲除对 C. pekinense PD-67 生理特性的影响

为了研究 *ppc* 基因敲除后对 *C. pekinense* PD-67 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,葡萄糖利用和 L-色氨酸积累的变化。

C. pekinense PD-67- Δ ppc 的生长速率低于出发菌株 *C. pekinense* PD-67,并且其最终的生物量也较出发菌株低(图 2)。

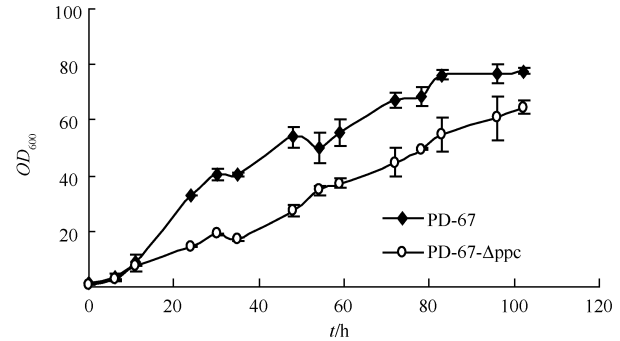


图 2 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67- Δ ppc 的生长曲线

Fig. 2 The cell growth profiles of *C. pekinense* PD-67 and *C. pekinense* PD-67- Δ ppc.

菌体葡萄糖利用和 L-色氨酸积累结果表明,*C. pekinense* PD-67- Δ ppc 的葡萄糖利用速率比出发菌株要慢,而且其积累 L-色氨酸浓度还不及出发菌株的一半。*C. pekinense* PD-67 的最终 L-色氨酸积累浓度为 3.49 g/L, *C. pekinense* PD-67- Δ ppc 仅为 1.33 g/L(图 3)。

将两个菌株的发酵特性进行比较,可以看出,基

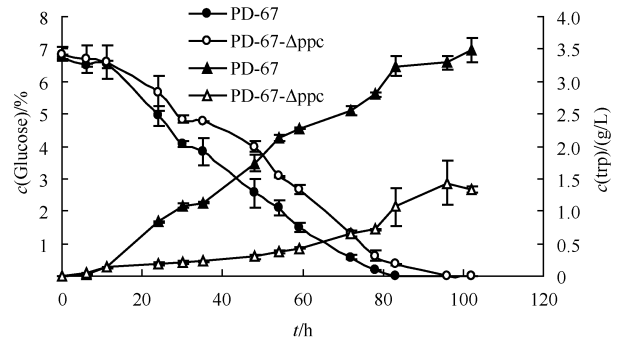


图 3 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67- Δ ppc 的糖耗和产酸曲线

Fig. 3 The glucose consumption and L-tryptophan production profiles of *C. pekinense* PD-67 and *C. pekinense* PD-67- Δ ppc.

因敲除菌株的各项参数均低于出发菌株,表明其代谢过程受到较大影响(表2)。

我们也对发酵液中的氨基酸副产物进行了测定。结果表明,*C. pekinense* PD-67-Δ*ppc* 菌株的副产

物谷氨酸,缬氨酸,亮氨酸和赖氨酸量增加,其中缬氨酸和赖氨酸量增加了3倍,甘氨酸和异亮氨酸量减少。*ppc* 基因的敲除影响了菌体氨基酸合成的代谢流(表3)。

表 2 各菌株的发酵参数
Table 2 Comparison of fermentation parameters of different strains

Strains	Parameters						
	P _{trp} /(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)	Φ/[g/(L·h)]
PD-67	3.49	22.15	0.86	0.22	0.052	0.33	0.034
PD-67-Δ <i>ppc</i>	1.33	18.45	0.77	0.18	0.02	0.27	0.013

P_{trp}:Tryptophan Production; X_{max}:The maximum Cell dry weight; Q_s: Glucose consumption rate; R_x: Average Growth rate; Y_{p/s}: Tryptophan yield on Glucose; Y_{x/s}:Biomass yield on Glucose;Φ:Tryptophan productivity。

表 3 发酵液中的副产物氨基酸
Table 3 The by-products amino acid of fermentation broth

Strains	c(Amino acid)/(g/L)						
	Glutamate	Glycine	Alanine	Valine	Isoleucine	Leucine	Lysine
PD-67	None	0.15	9.2	3.61	0.52	0.57	0.08
PD-67-Δ <i>ppc</i>	0.11	0.05	9.26	10.27	0.37	0.82	0.25

2.4 *C. pekinense* 丙酮酸羧化酶和丙酮酸激酶活性的测定

为了探讨 *ppc* 基因敲除所引起的碳流分布的改变,我们测定了出发菌株和 *ppc* 基因敲除菌株的丙酮酸激酶以及丙酮酸羧化酶的活性。结果表明,与出发菌株相比 *C. pekinense* PD-67-Δ*ppc* 的丙酮酸激酶活性提高,而丙酮酸羧化酶活性下降(表4)。

表 4 *C. pekinense* PD-67 和 *C. pekinense* PD-67-Δ*ppc* 的丙酮酸激酶和丙酮酸羧化酶比活力

Table 4 Specific activity of PK and PCx of *C. pekinense* PD-67 and *C. pekinense* PD-67-Δ*ppc*

Strains	Specific activity	
	PK/(U/mg protein)	PCx/(U/mg cell dry weight)
<i>C. pekinense</i> PD-67	0.693	11.2
<i>C. pekinense</i> PD-67-Δ <i>ppc</i>	0.811	7.5

PK:pyruvate kinase;PCx:pyruvate carboxylase

由以上结果可以看出,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除影响了 *C. pekinense*PD-67 的代谢过程,菌体生长受到妨碍,一些副产物合成量增加,在 PEP 节点处的碳流没有更多的流向芳香族氨基酸合成途径。

3 讨论

磷酸烯醇式丙酮酸是芳香族氨基酸合成的前体化合物,同时也是中心代谢途径的回补网络中的重要化合物。在回补网络中,PEP 和 CO₂ 经磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化,不可逆的转化生成三羧酸循环的中间产物草酰乙酸。本工作通过同源重组技术

构建了 *ppc* 基因敲除的突变株,试图减少回补途径对 PEP 的竞争性利用,从而增加 PEP 在芳香族氨基酸合成途径中的供应。实验结果表明,*ppc* 基因敲除导致突变株完全丧失 PEPCx 活性。突变株的生理代谢变化较大,生长变弱,糖耗变慢。这可能是由于该回补途径被阻断,另一个催化生成草酰乙酸的回补反应的重要酶——丙酮酸羧化酶的活力也有所降低,同时自草酰乙酸和 α-酮戊二酸衍生的赖氨酸和谷氨酸的合成有所增加,从而使得三羧酸循环的碳流变弱能量不够所致。野生型棒杆菌在以葡萄糖为碳源生长时,作为回补酶,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶可以相互替代,二者同时表现活性,但所起作用的程度有所不同,丙酮酸羧化酶催化的途径对 C₃ 羧化活性的贡献占 90% 以上^[19-20]。Peters-Wendisch 等人的工作表明,*ppc* 基因的缺失不影响 *C. glutamicum* ATCC13032 的生长,PEPCx 对菌体的生长是非必需的^[21-22]。而本研究结果表明, *C. pekinense* PD-67 的 *ppc* 基因敲除后,对生长影响较大,PEPCx 对回补途径碳流的贡献可能更大一些,也许是由于经过多次诱变,该菌株酶的催化活性发生了变化,这有待于进一步研究。

突变株的氨基酸合成也发生了改变,L-色氨酸积累降低,副产物谷氨酸,缬氨酸,亮氨酸和赖氨酸的积累增加,其中缬氨酸和赖氨酸积累量增加了3倍。缬氨酸和亮氨酸都是由前体物丙酮酸和 α-酮丁酸在乙酰乳酸合成酶催化下开始合成的^[23]。由此我们推测,*ppc* 基因敲除后阻断了 PEP 至草酰乙

酸的回补途径,但 PEP 并没有像预期的那样流向芳香族氨基酸的合成,说明在芳香族氨基酸合成途径存在瓶颈。同时由于丙酮酸激酶活性增强,碳流流向了丙酮酸,进而生成了以丙酮酸为前体物的氨基酸。有关磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶缺陷对芳香族氨基酸合成影响的报道不多,国内尚未见相关报道。Miller 等报道,大肠杆菌 *ppc*⁻菌株的生长较 *ppc*⁺菌株慢了两倍,带有 DAHP 合成酶基因和抗反馈调节预苯酸脱水酶基因的 *ppc*⁻菌株,合成苯丙氨酸,丙酮酸和乙酸的量增加^[24]。Katsumata 等报道,谷氨酸棒杆菌失去 75% PEPCx 酶活性的 *ppc*⁻突变株中,L-色氨酸的积累量高于出发菌株^[25]。本工作结果表明,仅通过阻断 PEPCx 催化的回补途径,减少磷酸烯醇式丙酮酸的分支代谢,不能提高该菌株 L-色氨酸的积累。

参考文献

- [1] Eikmanns BJ, Follettie MT, Griot MU, Sinskey AJ. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Molecular and General Genetics*, 1989, 218:330-339.
- [2] Izui K, Matsuda Y, Kameshita I, Katsuki H, Woods AE. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Inhibition by various analogs and homologs of phosphoenolpyruvate. *Journal of Biochemistry*, 1983, 94(6):1789-1795.
- [3] Mori M, Shiio I. Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *Journal of Biochemistry*, 1985, 97(4):1119-1128.
- [4] Mori M, Shiio I. Synergistic inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by aspartate and 2-oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*. *Journal of Biochemistry*, 1985, 98(6):1621-1630.
- [5] Mori M, Shiio I. Multiple Interaction of Fructose 1,6-Bisphosphate and Other Effectors on Phosphoenolpyruvate Carboxylase from *Brevibacterium flavum* and Its Aspartate-producing Mutant. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50(10):2605-2614.
- [6] Ranjan Patnaik, James C. Liao. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(11):3903-3908.
- [7] Masato Ikeda, Ryoichi Katsumata. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6):2497-2502.
- [8] David E. Tribe, James Pittard. Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(2):181-190.
- [9] 陈小芳, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 北京棒杆菌邻氨基苯甲酸合成酶基因的克隆、序列分析及表达. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(1):48-53.
- [10] 张春花, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 北京棒杆菌 DAHP 合成酶 I 基因的克隆、序列分析及表达. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(11):1466-1472.
- [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, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京:科学出版社, 1992.
- [13] 沈天翔, 那淑敏, 肖文中. 棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 1995, 11(3):245-249.
- [14] 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.
- [15] 王绛, 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.
- [16] Jetten M S, Gubler M E, Lee S H, Sinskey A J. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(7):2501-2507.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [18] Gunnar S. Skogman, Jan-Eric Sjöström. Factors affecting the biosynthesis of L-tryptophan by genetically modified strains of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130:3091-3100.
- [19] Petra G. Peters-Wendisch, Volker F. Wendisch, Susanne Paul, Bernhard J. Eikmanns, Hermann Sahm. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in

- Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 1997, 143: 1095-1103.
- [20] Sören Petersen, Albert A. de Graaf, Lothar Eggeling, Michael Möllney, Wolfgang Wiechert, Hermann Sahl. In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 35932-35941.
- [21] Petra G. Peters-Wendisch, Bernhard J. Eikmanns, Georg Thierbach, Bernd Bachmann, Hermann Sahl, Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 112(3): 269-274.
- [22] Petra G. Peters-Wendisch, Volker F. Wendisch, Albert A. de Graaf, B. J. Eikmanns, Hermann Sahl, C3-carboxylation as an anaplerotic reaction in phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Archives of Microbiology*, 1996, 165(6): 387-396.
- [23] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [24] Judith E. Miller, Keith C. Backman, Mary Jane O'Connor, Randolph T. Hatch. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1987, 2: 143-149.
- [25] Katsumata R, Kino K. Process for producing amino acids by fermentation. Japan Patent 01,317,395 A (P2,578,488), 1989.

Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase gene knock-out on metabolism in *Corynebacterium pекinense* PD-67

Mintao Lu^{1,2}, Zhi Zhao¹, Yingzi Zhang¹, Yu Wang¹, Jiuyuan Ding^{1*}

(¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] In order to optimize precursor supply for L-tryptophan biosynthesis, a *Corynebacterium pекinense* PD-67 mutant with phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*ppc*) in-frame deletion was constructed. The effect of *ppc* knock-out on physiological characteristics of the mutant was investigated. [Methods] The upstream and downstream fragments of *ppc* were cloned from *C. pекinense* PD-67 chromosome and ligated to integration vector. The mutant *C. pекinense* PD-67- Δppc was screened by homologous recombination. The physiological characteristics of the mutant were investigated by fermentation experiments and measurement of pyruvate carboxylase (PCx) and pyruvate kinase (PK). [Results] The mutant with *ppc* gene in-frame deletion was screened and confirmed by PCR check and phosphoenolpyruvate carboxylase determination. The mutant exhibited slow growth and less cell mass, 80% as much as the parent strain. The *ppc* knock-out resulted in decrease of L-tryptophan accumulation and overproduction of pyruvate-related amino acids, which accompanied by increase of PK activity and the decrease of PCx activity, in *C. pекinense* PD-67. [Conclusion] The knock-out of *ppc* gene affected the metabolism of the strain to some extent. Only by blocking the anaplerotic pathway PEPCx participated was insufficient to increase the accumulation of L-tryptophan in *C. pекinense* PD-67.

Keywords: *Corynebacterium pекinense*; phosphoenolpyruvate carboxylase; gene knock-out; L-tryptophan

(本文责编: 张晓丽)

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

Received: 26 April 2010 / Revised: 24 May 2010