



枯草芽孢杆菌 L-脯氨酸合成途径中 *glnA*、*proB*、*proA* 基因功能探究

吴志勇^{1,2}, 李由然^{1,2}, 顾正华^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 张梁^{1,2}, 石贵阳^{1,2*}

¹江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

²江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】从基因水平探究枯草芽孢杆菌渗透压调节因子 L-脯氨酸合成途径中 *glnA*、*proB*、*proA* 基因的功能, 通过分子改造实现对代谢途径的人工扰动。【方法】从枯草芽孢杆菌 WB600 出发, 通过向胞内引入一系列基因敲除或过表达, 分别构建了 *proB* 和 *proA* 基因过表达的重组菌 WB601 和 WB602、*glnA* 基因缺失的重组菌 WB603 以及在此基础之上过表达 *proB* 基因的重组菌 WB604。借助菌株胞外和胞内游离脯氨酸积累的表型分析影响途径的关键节点。【结果】在非胁迫条件下, 重组菌 WB601 和 WB602 胞外脯氨酸含量分别是原始菌的 2.21 倍和 2.82 倍, 单位细胞胞外脯氨酸得率分别是原始菌的 4.09 倍和 9.80 倍, 胞内游离脯氨酸含量分别是原始菌的 1.91 倍和 3.34 倍; 重组菌 WB603 胞外脯氨酸含量上升至 1221.43 mg/L, 是原始菌的 6.28 倍, 单位细胞胞外和胞内游离脯氨酸得率分别为原始菌的 9.13 倍和 3.66 倍; 而重组菌 WB604 胞外脯氨酸含量最高达 1391.65 mg/L, 相比菌株 WB603, 其胞外脯氨酸含量及单位细胞得率分别提高了 13.94%和 14.10%, 且胞内游离脯氨酸含量提高了 32.60%。在 5% NaCl 胁迫条件下, 重组菌 WB601 和 WB602 的胞外脯氨酸含量分别是原始菌的 1.94 倍和 1.54 倍, 单位细胞胞外脯氨酸得率分别是原始菌的 2.15 倍和 2.19 倍; 重组菌 WB603 胞外脯氨酸含量及其单位细胞得率分别是原始菌的 4.16 倍和 7.29 倍; 相同条件下, 相比于重组菌 WB603, 重组菌 WB604 的胞外脯氨酸含量及其单位细胞得率分别提高了 32.61%和 5.54%。此外, 实验组菌株的胞内游离脯氨酸含量均高于非胁迫时, 并达到相对平衡状态。【结论】*proB* 和 *proA* 基因的过表达均能显著提升细胞合成脯氨酸的能力, 并且能增强细胞的耐盐性; *glnA* 基因的缺失能增强脯氨酸合成途径, 提高脯氨酸的积累; 两种效应的正向叠加可进一步提升细胞脯氨酸合成能力。

关键词: L-脯氨酸, 枯草芽孢杆菌, 代谢途径, 关键基因, 渗透压

基金项目: 国家自然科学基金(31401674); “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0401404); 江南大学自主重点项目(JUSRP51503)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-01-05; 修回日期: 2017-04-04; 网络出版日期: 2017-05-12

枯草芽孢杆菌是重要的工业微生物，具有发酵周期短、遗传背景清楚、可利用开发价值高以及作为食品药品安全性好等显著特点，广泛应用于工业发酵和微生物分子遗传领域^[1]。这一类革兰氏阳性细菌起初分离自渗透压波动剧烈的土壤表层，为适应这一变化，在长期的自然演化中它们形成了多种渗透压调节机制^[2]，其中最主要的调节方式就是通过合成或者从外界吸收一些低分子量的相容溶质物质^[3]来调节自身的渗透压。L-脯氨酸作为一种渗透压保护剂，可以在高渗条件下防止蛋白质和细胞物质变性^[4]。它可以被枯草芽孢杆菌从头合成(*de novo*)来调节渗透压^[5]，从而适应高渗环境。微生物体内的脯氨酸合成途径有两种，一是以谷氨酸为前体，另一种则以鸟氨酸为前体。枯草芽孢杆菌体内 L-脯氨酸的生物合成主要是以 L-谷氨酸为前体，经过三步酶促反应合成^[6](图 1)，其中包含多个同工酶：*proB/proJ* 编码谷氨酸激酶(GK)；*proI/proH* 编码 Δ^1 -二氢吡咯-5-羧酸还原酶(P5CR)。proB-proA-proI 途径合成的脯氨酸用于合成蛋白质；而在外界高渗环境的胁迫下，L-脯氨酸的合成则主要通过 *proJ-proA-proH* 途径^[7]。同工酶因其各异的表达调控与催化机制，使代谢反应可依据环境因素灵活调节，然而它们的分工及对代谢途径的影响方式尚不清楚。

目前关于枯草芽孢杆菌脯氨酸合成途径的研究基本集中于细胞生理层面^[8]，包括途径中各基因的表达对胞内游离脯氨酸变化以及自身渗透压调节的影响^[2,5]，或者将研究枯草芽孢杆菌与植物的生理条件研究相结合，探究枯草芽孢杆菌作为根系微生物在高渗环境下提升植物生存能力的机制^[9-10]。现有的研究已阐明，枯草芽孢杆菌编码谷氨酸激酶(GK)的 *proB* 基因在高渗透压胁迫下表达会上调^[11]，

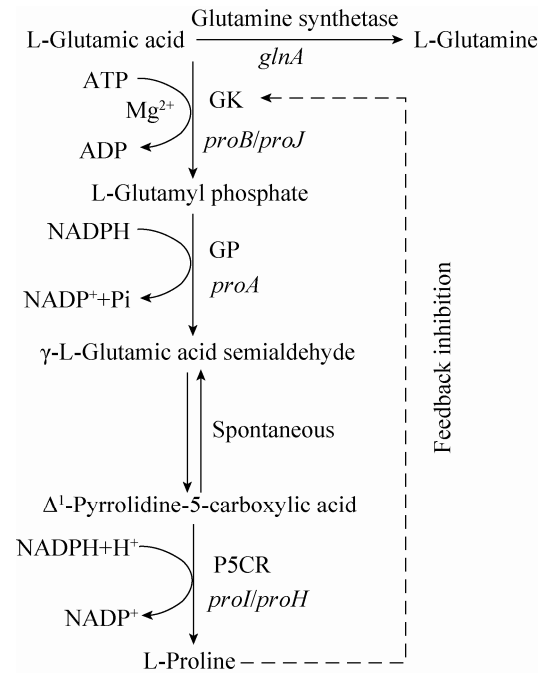


图 1. 枯草芽孢杆菌 L-脯氨酸生物合成途径

Figure 1. Biosynthetic pathway of L-proline in *Bacillus subtilis*.

且其表达受到产物 L-脯氨酸的反馈抑制^[12]。融合表达枯草芽孢杆菌 *proBA* 基因能进一步提高菌株的胞内游离脯氨酸含量和极端环境耐受性^[13]。而在非胁迫条件下，该途径中各基因对代谢通路的影响未知。

本文从枯草芽孢杆菌以谷氨酸为前体的脯氨酸合成途径出发，分别考察了 *glnA*、*proB* 和 *proA* 基因在盐离子胁迫条件下和非胁迫条件下对胞外和胞内游离脯氨酸积累的影响，研究结果有助于相关代谢途径关键节点的鉴定，从而为利用基因工程技术增强微生物及其依附的植物在高渗环境下的耐受性提供了理论依据^[13-14]。此外，本研究通过对合成途径的改造，可以有效加强脯氨酸生物合成，进而提高胞外脯氨酸的积累量，为从系统代谢工程水平构建产 L-脯氨酸工程菌提供了实验基础^[15]。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本研究中所使用的菌株、质粒如表 1 所示。

1.2 工具酶与试剂

本研究所用的 *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、T4 连接酶均购于大连宝生物工程有限公司；pMD19-T vector 购自 TaKaRa 公司；试剂新霉素、氨苄青霉素、四环素购自 Sigma 公司；质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购于北京博大泰克生物有限公司。蛋白胨、酵母粉、琼脂粉购于 OXOID 公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 培养基与培养条件

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 固体 LB 培养基需加入 1.5%的琼脂粉。TB 发

酵培养基(g/L): 蛋白胨 12.00, 酵母粉 24.00, K_2HPO_4 12.54, KH_2PO_4 2.30, pH 7.0。摇瓶发酵装液量为 30 mL/250 mL。在菌株构建和发酵过程中, 培养基中添加的氨苄青霉素、新霉素、四环素终浓度分别为 100、6、20 mg/L。

1.4 引物

本研究克隆新霉素基因 *Neo* 所用的引物是根据 pMA5 质粒上新霉素抗性基因序列设计而成, 其余所用引物根据 GenBank 中 *Bacillus subtilis* 168 的 *glnA*、*proB*、*proA* 和 *P43* 的基因序列信息设计而成, 本实验所用引物的合成及相关测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成, 具体序列见表 2。

1.5 重组质粒的构建

利用引物 proBB-FW & proBE-RV 从枯草芽孢杆菌 WB600 基因组上将编码谷氨酸激酶的 *proB*

表 1. 文中所用菌株与质粒
Table 1. Strains and plasmids used in this study

Stains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
JM109	<i>E. coli</i> , wild type	This Lab
WB600	<i>Bacillus subtilis</i> , wild type	This Lab
WB601	WB600 harboring pHY-P43-proB plasmid	This study
WB602	WB600 harboring pHY-P43-proA plasmid	This study
WB603	WB600($\Delta glnA$, $glnA::Neo$), Neo^f	This study
WB604	WB600($\Delta glnA$, $glnA::(P43-proB-Neo)$), Neo^f	This study
Plasmids		
pMA5	<i>Bacillus-E. coli</i> shuttle vector, Amp^f and Neo^f	This Lab
pMD19-T	Cloning vector, Amp^f	This Lab
pMD19T- <i>glnA</i>	pMD19-T based vector, carrying <i>glnA</i> gene, Amp^f	This study
pMD19T- <i>Neo</i>	pMD19-T based vector, carrying <i>Neo</i> gene, Amp^f	This study
pMD19T- $\Delta glnA::Neo$	pMD19- <i>glnA</i> based vector, Amp^f and Neo^f	This study
pMD19T-P43-proB	pMD19-T based vector, Amp^f	This study
pMD19T- $\Delta glnA::P43-proB-Neo$	pMD19T- $\Delta glnA::Neo$ based vector, Amp^f and Neo^f	This study
pHY-P43	<i>Bacillus-E. coli</i> shuttle vector, Amp^f and Tet^f	This Lab
PHY-P43-proB	PHY-P43 based vector, carrying <i>proB</i> gene, Amp^f and Tet^f	This study
PHY-P43-proA	PHY-P43 based vector, carrying <i>proA</i> gene, Amp^f and Tet^f	This study

表 2. 本研究所用引物
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
glnA-FW	ATGGCAAAGTACACTAGAGAAG
glnA-RV	TTAATACTGAGACATATACTGT
NEO-FW	ACGCCATGGAGGATTGAAGGATGCT
NEO-RV	CCACTGCAGAGCACACCCTTTATTC
P43N-FW	CATGCCATGGTGTGCGACGTGCATGCAGGCC
P43N-RV	CATGCCATGGTATAATGGTACCGCTATCACTTT
proBB-FW	CGCGGATCCATGAAAAAACAAGAATAG
proBE-RV	CCGGAATTCCTAGTCTTTTACATTGAC
proBN-RV	CATGCCATGGCTAGTCTTTTACATTGACCC
proA-FW	CGGGATCCATGAGTGAAG TTTCTGTAAA A
proA-RV	TCCCCGGGCTATTCACGG ATTTGCCAGTT
LJ-P43B	TATTCTTTGTTTTTTTCATTATAATGGTACCGCTATCAC
LJ-BP43	TATAAAGTGATAGCGGTACCATTATAATGAAAAAACAAGAATAGT

Underline sequences are cleavage site of restriction enzyme.

基因克隆出来，连接到经相同酶切的 pHY-P43 载体上，构建质粒 pHY-P43-proB。利用类似方法构建了重组质粒 pHY-P43-proA。

1.6 枯草芽孢杆菌目的基因的敲除

枯草芽孢杆菌目的基因的敲除采用同源重组的方法^[16]。本实验首先利用谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 上下游引物 glnA-FW 和 glnA-RV 扩增出 *glnA* 基因序列，大小为 1335 bp。然后将其连接到 pMD19-T 质粒上，构建质粒 pMD19T-glnA。同样的，利用引物 NEO-FW 和 NEO-RV 扩增出新霉素抗性基因 *Neo*，并将其连接到 pMD19-T 载体上，构建质粒 pMD19T-Neo。将质粒 pMD19T-glnA 和 pMD19T-Neo 均用 *Nco* I 和 *Pst* I 酶进行双酶切，酶切后的新霉素片段连接到经同样酶切的 pMD19T-glnA 质粒上，构建敲除质粒 pMD19T-Δ*glnA*::*Neo*。最后将敲除质粒 pMD19T-Δ*glnA*::*Neo* 转化进入枯草芽孢杆菌 WB600 中进行同源重组，在新霉素平板

上筛选正确的转化子。敲除质粒的构建如图 2 所示。

1.7 重叠片段 P43-proB 的整合

首先利用引物 P43N-FW 和 P43N-RV，proBB-FW 和 proBN-RV 分别从枯草芽孢杆菌 WB600 的基因组上扩增出启动子 *P43* 以及谷氨酸激酶基因 *proB* 的序列。然后利用引物 LJ-P43B 和 LJ-BP43 将二者通过重叠 PCR 连接成片段 *P43-proB*，并将此片段经 *Nco* I 单酶切后连接到同样经 *Nco* I 单酶切的敲除质粒 pMD19T-Δ*glnA*::*Neo* 上，构建了重组质粒 pMD19T-Δ*glnA*::*P43-proB-Neo*。然后将此重组质粒转化进入枯草芽孢杆菌 WB600 中进行同源重组，在新霉素抗性平板上筛选正确的转化子。具体的构建方法见图 2。

1.8 重组菌生长曲线的绘制

将重组菌接种于 20 mL LB 液体培养基中，37 °C、200 r/min 过夜活化。按照初始 OD_{600} 0.1 的添加量转接于 30 mL LB 液体培养基中，37 °C、

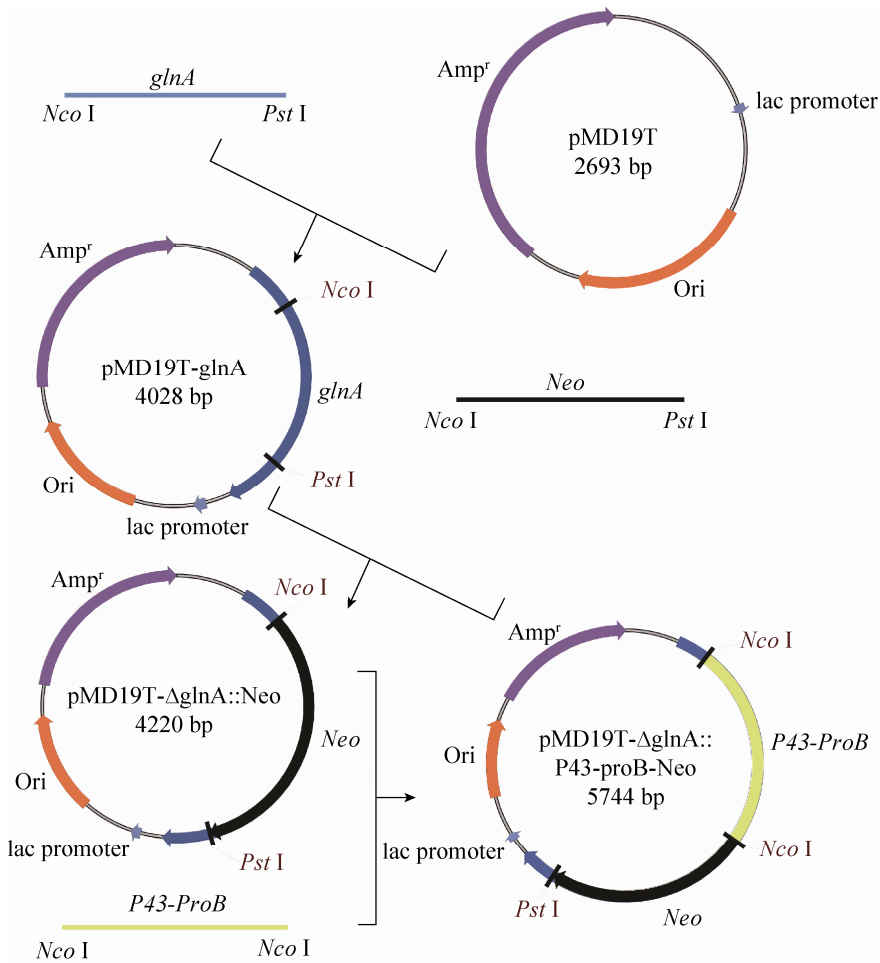


图 2. 敲除质粒 pMD19T-ΔglnA::Neo 和 pMD19T-ΔglnA::P43-proB-Neo 的构建

Figure 2. Cloning strategy of knockout plasmids pMD19T-ΔglnA::Neo and pMD19T-ΔglnA::P43-proB-Neo.

200 r/min 培养 36 h, 期间每隔 2 h 取样 1 次测定菌体浓度, 最后一次取样间隔为 4 h。菌体浓度的测定以分光光度计 600 nm 波长下的吸光值 OD_{600} 表示。 OD_{600} 根据下列公式转化为细胞干重^[17]:
 $1 OD = 0.35 \text{ g/L DCW}$ 。

1.9 重组菌摇瓶发酵

将重组菌接种于 20 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 活化 12 h。按初始 OD_{600} 0.1 的接种量转接至 50 mL 的 TB 培养基中, 菌株 WB603 和 WB604 初始培养基中添加终浓度为 5 mmol/L 的谷氨酰胺, 37 °C、250 r/min 摇瓶发酵 24 h。发

酵结束时取样测量 OD_{600} 以及发酵液中 L-脯氨酸含量, 并收集细胞测定胞内游离脯氨酸含量。

1.10 L-脯氨酸的测定

L-脯氨酸的测定采用酸性茚三酮法^[2,18]。胞外脯氨酸的测定: 发酵液 12000 r/min 离心 30 min 后, 取上清加入等体积 10%三氯乙酸沉淀 4 h, 12000 r/min 离心 20 min 后取上清, 稀释适当倍数后测定胞外脯氨酸含量。胞内游离脯氨酸测定: 收集菌体, 菌体用去离子水洗涤 2 次, 重悬菌体并调整到 OD_{600} 值为 5, 加入终浓度为 20 mg/L 的溶菌酶 37 °C 保温 3 h 后参照 Whatmore AM 的方法^[2]测定。

2 结果和讨论

2.1 含重组质粒枯草芽孢杆菌的构建

按照 1.5 节的方法构建了质粒 pHY-P43-proB 和 pHY-P43-proA, 并转化入大肠杆菌 JM109 中, 转化子提取质粒酶切验证。其中, 质粒 pHY-P43-proB 经 *Bam*H I & *Eco*R I 双酶切后片段大小分别为 5278 bp、1098 bp; 质粒 pHY-P43-proA 经 *Bam*H I & *Sma* I 双酶切后片段大小分别为 5278 bp 和 1248 bp, 此结果表明重组质粒构建成功, 如图 3。分别将二者转化入枯草芽孢杆菌 WB600 原始菌株中, 构建了菌株 WB601 和 WB602。

2.2 *glnA* 基因缺失重组菌的构建

按照上述 1.6 节的方法构建了敲除质粒 pMD19T-Δ*glnA*::Neo, 并将其转化入 WB600 原始菌株中, 转化子以 *glnA*-FW 和 Neo-RV 为引物经菌落 PCR 后得到大小为 1241 bp 的片段。结果表明成功敲除了谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*, 即构建了菌株 WB603。

2.3 *P43-proB* 基因片段整合到基因组 *glnA* 位点重组菌的构建

按照 1.7 节的方法将启动子 *P43* 与 *proB* 基因

连接成 *P43-proB* 基因片段, 大小为 1524 bp。同时, 在 1.6 构建的敲除盒基础上, 将 *P43-proB* 片段连接至 pMD19T-Δ*glnA*::Neo 质粒上, 构建敲除质粒 pMD19T-Δ*glnA*::*P43-proB*-Neo, 并将其转化入原始菌 WB600 中。转化子以 *glnA*-FW 和 *glnA*-RV 为引物菌落 PCR 后得到大小为 3051 bp 的片段; 以 *glnA*-FW 和 *proB*-RV 为引物菌落 PCR 后得到大小为 1765 bp 的片段, 结果表明 *P43-proB* 片段成功整合到原始菌株基因组 *glnA* 位点上, 即构建了重组菌 WB604。

2.4 *glnA* 基因缺失以及 *P43-proB* 片段整合到基因组上对重组菌生长的影响

为判断谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的缺失对重组菌生长的影响, 将重组菌 WB603 和 WB604 按 1.8 节所示方法接种于 LB 培养基中, 绘制其菌体生长曲线。重组菌 WB603 生长状况如图 4-A 所示, 在不添加谷氨酰胺的情况下生长缓慢, 最大 OD_{600} 仅能达到 4 左右, 约为原始菌的 60%; 而在添加了 5 mmol/L 谷氨酰胺的情况下, WB603 生长加快, 延滞期明显缩短, 最大 OD_{600} 可以达到 5.7 左右, 但仍与原始菌存在差距。此结果表明, *glnA* 基因的缺失在改变重组菌基因组结构的同时, 也影响了菌体正常生理代谢, 进而使其无法恢复正

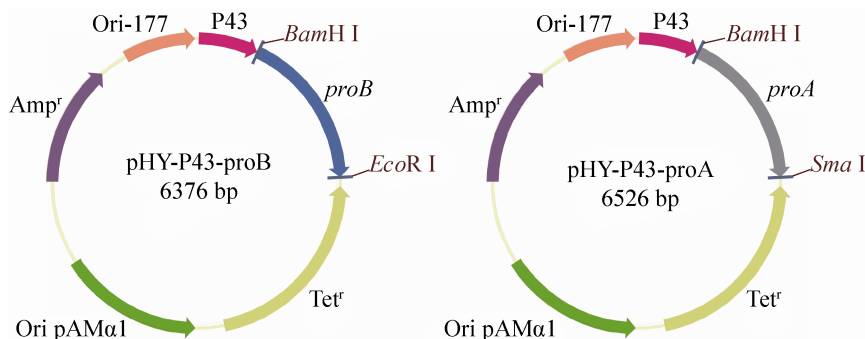


图 3. 重组质粒示意图

Figure 3. Recombinant plasmids map.

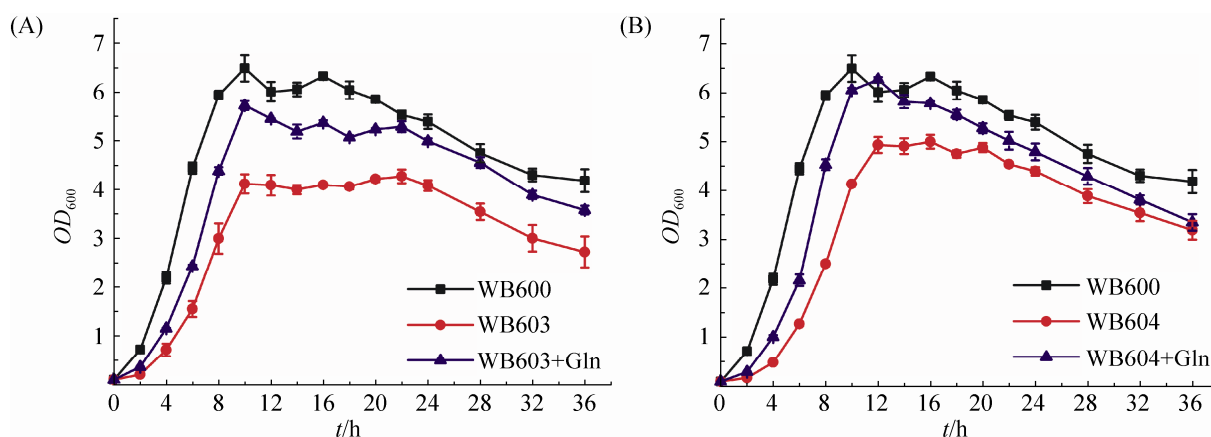


图 4. 重组菌 WB603 和 WB604 生长曲线

Figure 4. Growth curves of recombinant strains WB603 and WB604. +Gln means initial LB medium contained 5 mmol/L glutamine.

常生长。因此, *glnA* 基因的缺失会形成谷氨酰胺部分营养缺陷型, 而通过外源添加谷氨酰胺可部分回补细胞的营养型生长^[19]。

重组菌 WB604 生长与 WB603 类似, 在培养基中添加终浓度 5 mmol/L 谷氨酰胺时, 其生长状况明显优于未添加谷氨酰胺, 如图 4-B 所示。

2.5 非胁迫条件下重组菌胞外和胞内游离脯氨酸积累情况

为考察不同重组菌株 WB601、WB602、WB603、WB604 合成 L-脯氨酸的能力, 分别对这 4 株菌进行摇瓶发酵, 对照组为原始菌株 WB600。

发酵条件: TB 培养基 37 °C、250 r/min 摇瓶培养 24 h, 结果如表 3 所示。

在无胁迫条件下, 过表达 *proB* 和 *proA* 的重组菌 WB601 和 WB602 其胞外脯氨酸含量分别是原始菌的 2.21 和 2.82 倍, 单位细胞胞外脯氨酸得率分别是原始菌的 4.09 倍和 9.80 倍, 而胞内游离脯氨酸含量分别是原始菌的 1.91 倍和 3.34 倍。此结果表明, *proB* 和 *proA* 基因的过表达能够显著增强细胞合成脯氨酸的能力, 这是因为 *proB* 和 *proA* 基因的过表达增加了脯氨酸合成途径的代谢通量, 从而提高了脯氨酸的积累量。然而, *proB* 和

表 3. 非胁迫条件下胞外和胞内游离脯氨酸的测定结果

Table 3. The results of extracellular and intracellular free proline content under non stress conditions

Strain	OD ₆₀₀	Extracellular L-proline/ (mg/L)	Extracellular L-proline yield/ (mg/g DCW)	Intracellular free L-proline yield/ (mg/g DCW)
WB600	16.34±0.03	194.53±1.41	34.36±4.54	5.06±1.24
WB600 (+Gln)	15.95±0.07	215.87±6.19	39.57±5.21	6.49±2.80
WB601	8.74±0.08	430.31±9.24	140.61±4.24	9.66±2.07
WB602	4.68±0.03	548.28±7.69	336.89±11.62	16.90±2.04
WB603	11.17±0.05	1221.43±10.06	313.56±8.84	18.53±0.95
WB603 (+Gln)	13.17±0.10	925.27±9.56	201.23±7.43	25.52±1.81
WB604	11.20±0.05	1391.65±11.54	357.78±9.67	24.57±2.53
WB604 (+Gln)	13.65±0.78	992.48±8.79	208.59±6.35	26.90±1.52

+Gln means initial medium contained 5 mmol/L glutamine.

proA 基因的过表达也会对菌体生长带来负担(最大菌体量仅为原始菌的 53%和 28%左右), 其中 *proA* 基因的过表达对生长的负面作用更显著。在枯草芽孢杆菌中, *proB* 和 *proA* 基因分别编码谷氨酸激酶和谷氨酰磷酸还原酶, 过表达 *proB* 和 *proA* 时一方面使得细胞将更多的能量用于酶的表达; 另一方面, 基因的过表达可能使得野生菌细胞内平衡的代谢流发生了扰动^[20], 从而影响了生长。此外, *proB* 基因编码的谷氨酸激酶过表达时会使得 L-脯氨酸积累更多^[21], 过量的脯氨酸会对谷氨酸激酶造成一定程度的反馈抑制^[7], 而 *proA* 基因编码的谷氨酰磷酸还原酶则不会出现这种情况, 从表中也可知过表达 *proA* 基因相比过表达 *proB* 基因更有利于脯氨酸的合成。因此, 谷氨酰磷酸还原酶的表达效果可能要优于谷氨酸激酶的表达, 因而过表达 *proA* 基因对生长造成的负担大于过表达 *proB* 基因^[22]。

在不添加谷氨酰胺时, *glnA* 基因缺失的重组菌 WB603 胞外脯氨酸含量为 1221.43 mg/L, 是原始菌的 6.28 倍, 单位细胞胞外和胞内游离脯氨酸分别为原始菌的 9.13 倍和 3.66 倍。这表明, *glnA* 基因的缺失提高了细胞合成脯氨酸的能力, 并且对胞外脯氨酸的合成影响更显著。由此推断, 谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的敲除阻断了谷氨酸的竞争支路, 增加了脯氨酸从头合成途径中的前体物质谷氨酸含量, 结果使代谢流更多向脯氨酸积累, 从而加强了脯氨酸的生物合成。此外, 本研究中 *glnA* 基因的缺失使得重组菌在积累胞外脯氨酸方面要优于 *proB* 和 *proA* 基因的过表达, 这可能是因为细胞内基因的敲除与过表达对细胞造成的影响不同, 从而造成了细胞合成代谢物质的能力有所差异。而在本实验中, *glnA* 基因的缺失对生长造成的影响小于 *proB* 和 *proA* 基因的过表达, 从而可能造成了其胞外脯氨酸的积累高于后二者。

与此同时, 在相同条件下, 重组菌 WB604 的菌体量与 WB603 几乎相同, 表明在基因组 *glnA* 位点上插入 *P43-proB* 片段与单独敲除 *glnA* 基因相比对菌体生长几乎没有影响。但重组菌 WB604 胞外积累了 1391.65 mg/L 脯氨酸, 单位细胞得率为 357.78 mg/g DCW, 相比菌株 WB603, 胞外脯氨酸含量提高了 13.94%, 单位细胞胞外脯氨酸得率提高了 14.10%, 且胞内游离脯氨酸含量提高了 32.60%。这表明, 对脯氨酸合成途径关键节点 *glnA* 和 *proB* 的同时改造可使正向协同效应叠加, 进一步提升了细胞合成脯氨酸的能力。

另一方面, 不添加 Gln (谷氨酰胺)时重组菌生长变差, 但较添加后相比区别不大。此外, 对于胞外脯氨酸来说, 不添加 Gln 时重组菌 WB603 和 WB604 胞外脯氨酸含量分别为 1221.43 mg/L 和 1391.65 mg/L, 分别是添加 Gln 时的 1.32 倍和 1.40 倍。值得注意的是, 添加 Gln 时重组菌 WB603 和 WB604 的胞内游离脯氨酸含量均有所提高, 分别为不添加时的 1.38 倍和 1.09 倍, 而 Gln 的加入对原始菌胞外和胞内游离脯氨酸含量影响不大。此结果表明, Gln 的加入能够部分弥补重组菌因基因缺失而造成的生长缺陷, 然而 Gln 的加入在促进重组菌生长的同时, 也可能会促使菌株利用胞外脯氨酸作为碳源或氮源来合成其他代谢物质^[23], 从而造成胞外脯氨酸含量有所降低, 胞内游离脯氨酸浓度有所提高^[24]。

2.6 盐离子胁迫条件下重组菌胞外和胞内游离脯氨酸积累情况

为探究重组菌在盐离子胁迫下脯氨酸的积累情况, 在 2.5 节重组菌培养的基础上, 在培养基中添加 5%的 NaCl, 其余条件不变, 摇瓶培养 24 h 后测定重组菌胞外和胞内游离脯氨酸含量, 测定结果见表 4。

表 4. 5% NaCl 胁迫条件下胞外和胞内游离脯氨酸测定结果

Table 4. The results of extracellular and intracellular free proline content under 5% NaCl stress

Strains	OD_{600}	Extracellular L-proline/ (mg/L)	Extracellular L-proline yield/ (mg/g DCW)	Intracellular free L-proline yield/ (mg/g DCW)
WB600	13.47±0.24	248.44±5.25	52.37±8.49	51.10±1.10
WB600 (+Gln)	13.79±0.02	296.32±7.99	64.21±6.06	50.98±1.93
WB601	12.25±0.04	482.67±8.15	112.46±4.04	50.59±1.29
WB602	9.61±0.04	381.51±4.24	114.79±6.36	50.67±0.55
WB603	7.74±0.09	1032.74±11.88	381.68±8.15	49.65±2.98
WB603 (+Gln)	10.12±0.06	728.42±8.49	206.93±3.54	47.75±1.59
WB604	9.73±0.02	1369.54±13.69	402.84±9.26	54.88±0.95
WB604 (+Gln)	11.08±0.57	783.91±5.66	202.59±4.49	52.62±1.69

+Gln means initial medium contained 5 mmol/L glutamine.

在含 5% NaCl 的培养基中, 实验组菌株生长均受到不同程度的胁迫, 而胞内游离脯氨酸含量均高于非胁迫条件下, 这与所报道的在盐离子胁迫条件下细胞内的游离脯氨酸浓度会有所提高一致^[5], 并且实验组菌株的胞内游离脯氨酸浓度差异不大, 这可能与胞内游离脯氨酸平衡有关^[2]。值得一提的是, 过表达 *proB* 和 *proA* 基因的重组菌 WB601 和 WB602 相比于非胁迫条件下, 菌体量却有所提高(可参比非胁迫条件下的表 3)。此外, 在 *glnA* 基因缺失的基础上进一步过表达 *proB* 基因的重组菌 WB604 在盐离子胁迫条件下的生长要优于重组菌 WB603。由此可以得出结论, *proB* 和 *proA* 基因的过表达能够在一定程度上增强菌株的耐盐性。

对重组菌 WB601 和 WB602 的胞外脯氨酸积累情况分析可得, 其胞外脯氨酸含量分别是原始菌的 1.94 倍和 1.54 倍, 单位细胞胞外脯氨酸得率分别是原始菌的 2.15 倍和 2.19 倍, 差别不大且较非胁迫时相比有所降低。与此同时, 在不添加 Gln 时, *glnA* 基因缺失的重组菌 WB603 胞外脯氨酸含量及单位细胞得率分别是原始菌的 4.16 倍和 7.29

倍, 同样低于非胁迫条件下。相同条件下, 相比于 WB603, 重组菌 WB604 的胞外脯氨酸含量及其单位细胞得率分别提高了 32.61% 和 5.54%, 较非胁迫时相比胞外脯氨酸提升幅度增加, 而单位细胞胞外脯氨酸得率有所降低, 这可能与在盐离子胁迫时过表达 *proB* 基因的重组菌 WB604 菌体生长受到的影响较 WB603 小有关。以上结果表明, 在盐离子胁迫条件下, *glnA* 基因的缺失同样能提高细胞合成脯氨酸的能力; 而在此基础之上过表达 *proB* 基因进一步提高了细胞合成脯氨酸的能力, 但受盐离子胁迫的干扰。此外, 在添加 Gln 时, 重组菌 WB603 和 WB604 的胞外脯氨酸含量分别比不添加时降低了 29.47% 和 42.76%, 且单位细胞胞外脯氨酸得率也明显降低。这可能因为是在盐离子胁迫条件下, 菌株为了应对胁迫环境, 一方面通过自身的保护机制吸收外界脯氨酸维持体内渗透压^[4], 一方面可能利用胞外脯氨酸来尽可能合成生长需要的营养物质^[23], 而生长有缺陷的基因工程菌对此需求更大。值得注意的是, 原始菌胞外脯氨酸含量较非胁迫时相比均有所提高, 这可能是胞内游离脯氨酸达到平衡后溢出所致^[2]。

3 结论

本研究以枯草芽孢杆菌谷氨酸到脯氨酸代谢途径中 *glnA*、*proB*、*proA* 基因为研究对象, 通过分子改造分别构建了重组菌 WB601–WB604, 摇瓶发酵检测各重组菌的胞外和胞内游离脯氨酸积累情况, 以此探究途径中相关基因的功能以及对渗透压调节因子脯氨酸合成的影响。结果显示, 在非胁迫条件下, *proB*、*proA* 基因的过表达能显著提高细胞合成脯氨酸的能力, 说明 *proB*、*proA* 基因的过表达增强了脯氨酸合成途径。但是过表达 *proB*、*proA* 会对菌体生长造成负担, 而过表达 *proA* 对生长的影响更大, 进而可能影响了其胞外脯氨酸的积累; *glnA* 基因的缺失同样能增强细胞合成脯氨酸的能力, 表明敲除 *glnA* 基因阻断了脯氨酸代谢途径中前体谷氨酸的分解途径, 从而加强了脯氨酸合成途径。此外, 相比于单独敲除 *glnA* 基因, 在 *glnA* 基因缺失的基础上过表达 *proB* 基因使得重组菌脯氨酸的合成能力进一步提升。这表明, 以上 2 个关键节点的同时改造可对细胞合成脯氨酸的能力产生正向协同作用。

在盐离子胁迫条件下, 实验菌株生长均受到不同程度的胁迫, 而胞内游离脯氨酸含量均高于非胁迫条件下, 并达到相对平衡的状态, 这说明在盐离子胁迫条件下, 细胞内的游离脯氨酸浓度会上升并达到相对平衡状态从而应对高渗环境。此外, 重组菌 WB601、WB602 和 WB604 的菌体量均高于非胁迫时, 说明过表达 *proB*、*proA* 基因有助于提高细胞的耐盐性。与此同时, 与非胁迫条件下相同, 过表达 *proB*、*proA* 基因以及 *glnA* 基因的缺失均能显著增强细胞合成胞外脯氨酸的能力, 在 *glnA* 基因缺失的基础上过表达 *proB* 基因使得重组菌脯氨酸的合成能力进一步提高。但

其胞外脯氨酸含量均较非胁迫时有所下降, 这可能与胁迫条件下菌株利用胞外脯氨酸来维持自身生长代谢以应对高渗环境有关^[3,23]。

参考文献

- [1] Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(1): 1–17.
- [2] Whatmore AM, Chudek JA, Reed RH. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136(12): 2527–2535.
- [3] Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 319–330.
- [4] von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, Bremer E. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: Characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Molecular Microbiology*, 1997, 25(1): 175–187.
- [5] Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, Bremer E. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(19): 5335–5346.
- [6] Belitsky BR, Brill J, Bremer E, Sonenshein AL. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(14): 4389–4392.
- [7] Brill J, Hoffmann T, Putzer H, Bremer E. T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2011, 157: 977–987.
- [8] Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(11): 1456–1466.
- [9] Marulanda A, Barea JM, Azcón R. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2009, 28(2): 115–124.
- [10] Vardharajula S, Ali SZ, Grover M, Reddy G, Bandi V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 2011, 6(1): 1–14.

- [11] Kunst F, Rapoport G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(9): 2403–2407.
- [12] Chen MQ, Cao JW, Zheng CY, Liu Q. Directed evolution of an artificial bifunctional enzyme, γ -glutamyl kinase/ γ -glutamyl phosphate reductase, for improved osmotic tolerance of *Escherichia coli* transformants. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 263(1): 41–47.
- [13] Chen MQ, Wei HB, Cao JW, Liu RJ, Wang YL, Zheng CY. Expression of *Bacillus subtilis proBA* genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in *Transgenic Arabidopsis*. *BMB Reports*, 2007, 40(3): 396–403.
- [14] Liu RJ, Chen T, Cao JW. Construction of fused osmoregulation *proBA* gene from a salt-tolerant mutant of *Bacillus subtilis* and its influence on the osmotolerance of *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(1): 23–26. (in Chinese)
刘瑞杰, 陈婷, 曹军卫. 渗透压调节基因 *proBA* 的融合表达对大肠杆菌耐高渗胁迫能力的影响. *微生物学报*, 2005, 45(1): 23–26.
- [15] Park JH, Lee SY. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(5): 454–460.
- [16] Peng QA, Zhang XF, Wu SF, Wang WP. Construction of *Bacillus subtilis* *tkl* mutant by homologous recombination. *Biotechnology*, 2006, 16(6): 23–26. (in Chinese)
彭其安, 张西峰, 吴思方, 王伟平. 同源重组法构建枯草芽孢杆菌转酮酶缺失突变菌株. *生物技术*, 2006, 16(6): 23–26.
- [17] 刘延峰. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效合成 N-乙酰氨基葡萄糖. 江南大学博士学位论文, 2015.
- [18] Zhi MX, Li XJ. Improvement on the method for measuring proline content. *Plant Physiology Communications*, 2005, 41(3): 355–357. (in Chinese)
职明星, 李秀菊. 脯氨酸测定方法的改进. *植物生理学通讯*, 2005, 41(3): 355–357.
- [19] Schreier HJ, Sonenshein AL. Altered regulation of the *glnA* gene in glutamine synthetase mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1986, 167(1): 35–43.
- [20] Varma A, Palsson BO. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Nature Biotechnology*, 1994, 12(10): 994–998.
- [21] Pérez-Arellano I, Carmona-Álvarez F, Gallego J, Cervera J. Molecular mechanisms modulating glutamate kinase activity. Identification of the proline feedback inhibitor binding site. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 404(5): 890–901.
- [22] Seo JH, Bailey JE. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(12): 1668–1674.
- [23] Moses S, Sinner T, Zapras A, Stöveken N, Hoffmann T, Belitsky BR, Sonenshein AL, Bremer E. Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(4): 745–758.
- [24] Zapras A, Bleisteiner M, Kerres A, Hoffmann T, Bremer E. Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 250–259.

Function of *glnA*, *proB* and *proA* genes in L-proline anabolic pathway of *Bacillus subtilis*

Zhiyong Wu^{1,2}, Youran Li^{1,2}, Zhenghua Gu^{1,2}, Zhongyang Ding^{1,2}, Liang Zhang^{1,2}, Guiyang Shi^{1,2*}

¹ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the function of *glnA*, *proB* and *proA* genes in the pathway of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. **[Methods]** *B. subtilis* WB600 was used as the original strain. After a series of intracellular gene deletion and overexpression, we constructed recombinant strain WB601 with *proB* gene overexpression and WB602 with *proA* gene overexpression; WB603 with *glnA* gene deletion. Then, WB604 with *proB* gene overexpression was constructed. The anabolic key nodes were analyzed by phenotypes of extracellular and intracellular free proline accumulation. **[Results]** Under non-stress conditions, the extracellular proline content of the recombinant strains WB601 and WB602 were 2.21 times and 2.82 times of that of the original strain, the unit cell extracellular proline yield were 4.09 times and 9.80 times of that of the original strain, and the intracellular free proline content were 1.91 times and 3.34 times of that of the original strain, respectively. The extracellular proline content of the recombinant strain WB603 increased to 1221.43 mg/L, 6.28 times of that of the original strain, and the unit cell extracellular and intracellular free proline yield were 9.13 times and 3.66 times of that of the original strain, respectively. The extracellular proline content of the recombinant strain WB604 up to 1391.65 mg/L, compared with strain WB603, the extracellular proline content and unit cell yield were increased by 13.94% and 14.10%, respectively, and the intracellular free proline content increased by 32.60%. Under 5% NaCl stress, the extracellular proline content of recombinant strains WB601 and WB602 were 1.94 times and 1.54 times of the original strain, and the unit cell yield were 2.15 times and 2.19 times of the original strain, respectively; the extracellular proline content and unit cell yield of recombinant strain WB603 were 4.16 times and 7.29 times of the original strain, respectively; under the same conditions, compared with the recombinant strain WB603, the extracellular proline content and unit cell yield of the recombinant strain WB604 were increased by 32.61% and 5.54%, respectively. In addition, the intracellular free proline content of the experimental groups were higher than that of non stress conditions, and reached a relative equilibrium state. **[Conclusion]** Overexpression of *proB* and *proA* gene can significantly enhance the ability of cells to synthesize proline and enhance the salt tolerance of cells; deletion of *glnA* could enhance proline *de novo* synthesis pathway and increase the accumulation of proline; moreover, the positive accumulation of the two effects could further improve the ability of proline synthesis.

Keywords: L-proline, *Bacillus subtilis*, anabolic pathway, key nodes, osmotic pressure

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401674), by the 13th Five-Year National Key Program for Technology Research and Develop of China Plan Grant (2016YFD0401404) and by the Independent Key Project of Jiangnan University (JUSRP51503)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: 5 January 2017; Revised: 4 April 2017; Published online: 12 May 2017