



氨甲酰磷酸不同合成途径在大肠杆菌中的比较

张译文^{1,2} 林白雪^{*1} 陶勇^{*1,2}

1 中国科学院微生物研究所 微生物生理与代谢工程重点实验室 北京 100101

2 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】氨甲酰磷酸是生物合成代谢中精氨酸与嘧啶的重要前体物质,在工业微生物生产精氨酸与嘧啶及其衍生物中发挥关键作用。【目的】在大肠杆菌 *Escherichia coli* BW25113 中比较氨甲酰磷酸不同合成途径的催化效率。【方法】在大肠杆菌 *Escherichia coli* BW25113 中过表达鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)的基础上,分别过表达大肠杆菌自身的氨基甲酸激酶(CK)和氨甲酰磷酸合酶(CPS II)并表征其反应效果。通过优化底物供应(调整底物浓度与引入 L-谷氨酰胺合成酶)对 CK 与 CPS II 的催化反应进行优化。【结果】在大肠杆菌中过表达 OTC,建立细胞水平氨甲酰磷酸检测体系。在此基础上比较不同来源的 CK,发现大肠杆菌来源的 CK 效果最好,50 mmol/L NH_4HCO_3 条件下全细胞催化 9 h 得到 2.95 ± 0.15 mmol/L L-瓜氨酸;过表达 CPS II 时,50 mmol/L L-谷氨酰胺催化 9 h 得到 3.16 ± 0.29 mmol/L L-瓜氨酸。通过改变底物 NH_4HCO_3 浓度和引入外源 L-谷氨酰胺合成酶(GS)等方式对 CK 与 CPS II 的催化反应分别进行优化后,100 mmol/L NH_4HCO_3 条件下,L-瓜氨酸浓度分别提高至 4.67 ± 0.55 mmol/L 和 6.12 ± 0.38 mmol/L,且过表达 GS 后 CPS II 途径可以利用 NH_3 ,不需要额外添加 L-谷氨酰胺。【结论】引入 L-谷氨酰胺合成酶后的 CPS II 途径合成氨甲酰磷酸的能力优于 CK 途径,为精氨酸、嘧啶及其衍生物的合成提供了一种更加高效的策略。

关键词: 氨甲酰磷酸, 氨基甲酸激酶, 氨甲酰磷酸合酶 II, L-瓜氨酸

Comparison of synthesis of carbamoyl phosphate through different pathway in *Escherichia coli*

ZHANG Yi-Wen^{1,2} LIN Bai-Xue^{*1} TAO Yong^{*1,2}

1 Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Carbamoyl phosphate is an important precursor in metabolism of arginine and pyrimidine, and plays a key role in biosynthesis of arginine and pyrimidine and its derivatives in microorganisms. [Objective] The synthesis of carbamoyl phosphate through different pathways was

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31670051)

***Corresponding authors:** Tel: 86-10-64807798

E-mail: LIN Bai-Xue: linbx@im.ac.cn; TAO Yong: taoyong@im.ac.cn

Received: 01-04-2019; **Accepted:** 15-04-2019; **Published online:** 15-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31670051)

***通信作者:** Tel: 010-64807798

E-mail: 林白雪: linbx@im.ac.cn; 陶勇: taoyong@im.ac.cn

收稿日期: 2019-04-01; **接受日期:** 2019-04-15; **网络首发日期:** 2019-05-15

investigated and compared in *Escherichia coli* BW25113. **[Methods]** Ornithine carbamoyltransferase (OTC) was overexpressed in *E. coli* BW25113 as a carbamoyl phosphate detecting system. Then carbamate kinase (CK) from different species or carbamoyl phosphate synthase II (CPS II) was overexpressed in *E. coli* BW25113 to enhance carbamoyl phosphate biosynthesis. These two carbamoyl phosphate biosynthetic pathways (CK pathway and CPS II pathway) were then optimized by adjusting substrates supply and introducing L-glutamine synthetase. **[Results]** A carbamoyl phosphate detection system was established *in vivo* by overexpressing OTC in *E. coli*. By overexpressing CKs from different species in *E. coli* with OTC, the carbamoyl phosphate biosynthetic pathway was enhanced, and the results showed that CK from *E. coli* was better than the other two, which produced 2.95 ± 0.15 mmol/L L-citrulline in 9 h whole-cell bioconversion. By overexpressing CPS II in *E. coli* with OTC, the carbamoyl phosphate biosynthesis was improved, and 3.16 ± 0.29 mmol/L L-citrulline was obtained in the whole-cell biocatalytic process. The CK and CPS II pathways were optimized by changing the concentration of substrate NH_4HCO_3 to 100 mmol/L and introducing exogenous L-glutamine synthetase (GS). As a result, 4.67 ± 0.55 mmol/L and 6.12 ± 0.38 mmol/L L-citrulline was achieved by strains with CK or CPS II pathway respectively. After the optimization of CPS II pathway with overexpressing GS, extra addition of L-glutamine was not required in the reaction system. **[Conclusion]** Biosynthesis of carbamoyl phosphate was improved by constructing and optimizing the CK synthetic pathway or CPS II synthetic pathway. CPS II pathway with introducing GS is better than that of the CK synthetic pathway in respect of carbamoyl phosphate synthesis, and provides a more efficient strategy for the synthesis of arginine, pyrimidine and its derivatives.

Keywords: Carbamoyl phosphate, Carbamate kinase, Carbamoyl phosphate synthetase II, L-Citrulline

氨甲酰磷酸(Carbamoyl phosphate, CP)是几乎所有微生物的代谢途径中精氨酸与嘧啶合成的共同前体^[1-2], 是两条途径的“交汇点”。CP 可以将其氨基甲酰基团转移至许多重要分子的氨基氮原子上, 包括最熟知的精氨酸/尿素合成途径的鸟氨酸和嘧啶生物合成途径的天冬氨酸。氨甲酰磷酸化学性质较为活泼^[3], 在 100 °C 下半衰期只有 2 s^[4]。鉴于氨甲酰磷酸在合成代谢中的重要地位及其活泼的化学性质, 氨甲酰磷酸的合成对于生产精氨酸、嘧啶类及其衍生物等高附加值化合物有着极为重要的意义^[5-6]。

氨甲酰磷酸合成酶(Carbamoyl phosphate synthetase, CPS)有 3 种, 分别为 CPS I、CPS II 和 CPS III。CPS I 分布于动物肝脏与肾脏的线粒体中^[7], CPS III 分布于非脊椎动物与鱼类, 且 CPS I 与 CPS III 均需要 N-乙酰谷氨酸来变构激活^[8-10]。CPS II 不仅分布于脊椎动物, 在真菌与细菌中也有分布, 并且不需要 N-乙酰谷氨酸变构激活^[11]。在大部分细菌^[12]以及大肠杆菌^[13-14]中, 氨甲酰磷酸合酶 II (CPS II, EC: 6.3.5.5) 催化一分子 L-谷氨酰胺、

两分子 Mg^{2+}ATP 和一分子 HCO_3^- 反应形成氨甲酰磷酸, 此反应为不可逆反应^[12]。CPS II 由大小两亚基组装而成, 小亚基(*carA* 编码)催化 L-谷氨酰胺水解产生氨, 大亚基(*carB* 编码)催化一分子 Mg^{2+}ATP 和一分子 HCO_3^- 形成中间体羧基磷酸^[13,15], 后加氨生成氨基甲酸。最后, 再利用第 2 个 Mg^{2+}ATP 磷酸化氨基甲酸合成氨甲酰磷酸^[16]。

此外, 在一些厌氧菌中还发现了一种氨基甲酸激酶(Carbamate kinase, CK, EC: 2.7.2.2), 是由约 33 kD 的亚基组成的同源二聚体^[17], 在有 ATP 、 HCO_3^- 和 NH_3 存在的情况下可以生成氨甲酰磷酸^[18-19]。值得注意的是, CK 所利用的直接底物是 HCO_3^- 和 NH_3 在水溶液中反应形成的氨基甲酸^[20], 利用 Mg^{2+}ATP 将氨基甲酸磷酸化成氨甲酰磷酸, 此反应为可逆反应^[18,21]。因此, CK 具有合成氨甲酰磷酸能力^[22], 是一种可以在微生物细胞内替代 CPS II 的酶^[18]。

CK 利用无机氨来合成氨甲酰磷酸, CPS II 则利用有机化合物即 L-谷氨酰胺的氨基来合成氨甲酰磷酸, 目前仍缺乏两种酶产氨甲酰磷酸效果的比较。由于氨甲酰磷酸不稳定^[3], 因此检测难度较大。鸟氨

酸氨甲酰基转移酶(Ornithine carbamoyltransferase, OTC)可以催化氨甲酰磷酸与鸟氨酸反应生成 L-瓜氨酸(L-Citrulline), 所以可以通过检测 L-瓜氨酸的含量表征氨甲酰磷酸的含量^[23]。

本研究在大肠杆菌中过表达其 OTC, 建立了细胞水平的氨甲酰磷酸检测体系。在此体系基础上, 通过检测 L-瓜氨酸含量, 在大肠杆菌中筛选了不同来源的 CK, 并对不同来源 CK 与大肠杆菌 CPS II 合成氨甲酰磷酸的能力进行了初步评价。通过改变底物浓度或引入 L-谷氨酰胺合成酶等手段, 对不同氨甲酰磷酸的合成途径进行了一定的优化后, 系统比较了利用无机氨作为氨供体的 CK 与利用 L-谷氨酰胺的 CPS II 合成氨甲酰磷酸的效率。本研究在大肠杆菌中构建两种不同的氨甲酰磷酸合成模块, 并对两种途径进行优化与比较, 发现氨甲酰磷酸的高效合成对瓜氨酸、精氨酸、嘧啶类化合物及其衍生物等高附加值化合物的代谢工程改造具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BW25113 菌株, 质粒 pLB1a 和 pSB1s 均为中国科学院微生物研究所微生物生理与代谢工程重点实验室保存。研究所使用的菌株和质粒见表 1, 质粒构建所使用的引物见表 2。

1.1.2 主要试剂和仪器

L-阿拉伯糖购自上海宏邦医药科技有限公司; 链霉素与氨苄青霉素购自 Amresco 公司; 色谱纯乙腈购自赛默飞世尔科技公司; 限制性内切酶、Gibson 组装克隆试剂盒购自 NEB 公司; 高保真 DNA 聚合酶与大肠杆菌 T1 商业感受态购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒与基因组 DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; PCR 所需引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。

高效液相色谱(HPLC)仪购于岛津公司; PCR 仪购于 Bio-Gener 公司; DNA 琼脂糖凝胶电泳仪与

表 1 本文中所用到的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

菌种和质粒 Strains and plasmids	特征描述 Description	来源 Source
Strains		
<i>E. coli</i> BW25113	<i>lacF</i> ^r rrnB _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR</i> 514 Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	[24]
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁺ φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44λ-thi-1 gyrA96relA1phoA</i>	Invitrogen
ECFI	<i>E. coli</i> BW25113 carrying pLB1a-yahI and pSB1s-argFI	This study
EFFI	<i>E. coli</i> BW25113 carrying pLB1a-EfarcC and pSB1s-argFI	This study
LLFI	<i>E. coli</i> BW25113 carrying pLB1a-LlarcC and pSB1s-argFI	This study
ABFI	<i>E. coli</i> BW25113 carrying pSB1s-argFI and pLB1a-carAB	This study
GSABFI	<i>E. coli</i> BW25113 carrying pSB1s-argFI and pLB1a-glnA-carAB	This study
Plasmids		
pLB1a	r6k origin, <i>araBAD</i> promoter, Amp ^R	Our laboratory
pSB1s	repA origin, <i>araBAD</i> promoter, Str ^R	Our laboratory
pLB1a-yahI	pLB1a containing <i>yahI</i> gene from <i>Escherichia coli</i>	This study
pLB1a-EfarcC	pLB1a containing <i>arcC</i> gene from <i>Enterococcus faecalis</i>	This study
pLB1a-LlarcC	pLB1a containing <i>arcC</i> gene from <i>Lactococcus lactis</i>	This study
pLB1a-carAB	pLB1a containing <i>carAB</i> gene from <i>Escherichia coli</i>	This study
pSB1s-argFI	pSB1s containing <i>argFI</i> gene from <i>Escherichia coli</i>	This study
pLB1a-glnA-carAB	pLB1a containing <i>glnA</i> gene from <i>Bifidobacterium bifidum</i> and <i>carAB</i> gene from <i>Escherichia coli</i>	This study

表 2 本文中所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
EfarC-F	CATGCCATGGGGAAAAAATGGTCGTTG	28
EfarC-R	CCGCTCGAGTTATTTTGTACAACCGTTCC	30
LlarC-F	CATGCCATGGTAAAACGTATTGTTGTAGC	29
LlarC-R	CCGCTCGAGTTAAGGAACAATTCTTGTTCCAC	32
yahI-F	CATGCCATGGGCAAAGAGCTTGTGGTCGTTG	31
yahI-R	CCGCTCGAGTTACGTTTTAATAATATGAGTGCCC	34
carA-F	ACAGGAGGAATTAACCATGGGTATTAAGTCAGCGCTATTGGTTC	44
carB-F	TAACAGGAGGAATTAACCATGGGCCAAAACGTACAGATATAAAAAGTATC	51
argF-F	GGGCTAACAGGAGGAATTAACCATGTCCGATTATACAAAAAACAC	46
argF-R	TTAATTCCTCCTGTGGCTGCTGCACTCACTCCCAAGCGTTGC	43
argI-F	GTGCAGCAGCCACAGGAGGAATTAATGTCCGGTTTTATCATAAGC	47
argI-R	CACTAGTACCAGATCTACCCTCGAGTTATTTACTGAGCGTCGCG	44
glnA-F	CACGCACAGATCAAATAAAGGAGGAATTAACCATGGATAAGCAGCAAGAGTTTG	54
glnA-R	CACCACTAGTACCAGATCTACCCTCGAGTTAGAGCTTGGGCAGGTACTTCTTC	53
BAD-F	CCATAGCATTTTTATCCATAAGATT	25
BAD-R	GTTTTATCAGACCGCTTCTG	20

蛋白电泳仪购于 Bio-Rad 公司；凝胶成像系统购于天能公司；测序由北京睿博兴科公司完成。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母粗提物 5.0, 蛋白胨 10.0。需要时向其中加入终浓度 50 mg/L 链霉素或 100 mg/L 氨苄青霉素。

2YT 培养基(g/L): 氯化钠 5.0, 酵母粗提物 10.0, 蛋白胨 16.0。需要时向其中加入终浓度 50 mg/L 链霉素或 100 mg/L 氨苄青霉素。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与纯化

基因组 DNA 与质粒 DNA 的提取, PCR 产物纯化以及 DNA 切胶回收纯化均按照相应试剂盒的操作说明进行。

1.2.2 表达载体的构建

以提取的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)与大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因组为模板, 分别用特定引物(表 2)进行 PCR 扩增, 得到 3 种不同菌株的氨基甲酸激酶的编码基因, 分别为 *EfarC* (Gene ID: 1199007)、*LlarC* (Gene

ID: 1115710)和 *yahI* (Gene ID: 944984)。PCR 反应体系(50 μ L): 1 \times Buffer, 模板 DNA 1 ng/ μ L, 正、反向引物各 0.5 pmol/ μ L, dNTPs 0.2 mmol, *FastPfu* 聚合酶 2 U。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 25 $^{\circ}$ C 5 min。将上述 3 个基因片段通过 T4 连接酶分别连接到 pLB1a 质粒的 *Nco* I 与 *Xho* I 位点之间, 转化至 *E. coli* T1 感受态中。用 BAD 引物对(表 2)进行 PCR 筛选阳性转化子, 将阳性转化子的质粒送样测序, 测序结果正确, 得到重组质粒 pLB1a-EfarC、pLB1a-LlarC 和 pLB1a-yahI。

以 *E. coli* BW25113 基因组为模板, 用特定引物(表 2)进行 PCR 扩增(同前), 得到 *E. coli* 鸟氨酸氨甲酰基转移酶编码基因 *argF* (Gene ID: 944844)和 *argI* (Gene ID: 948774), 大肠杆菌氨甲酰磷酸合成酶 II 基因 *carAB* (Gene ID: 949025, 944775), 用 Gibson 连接的方式连接至质粒载体 pSB1s 或 pLB1a 的 *Nco* I 与 *Xho* I 位点之间, 按上述相同方法筛选到序列正确的质粒, 命名为 pSB1s-argFI、pLB1a-carAB。

以两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)基因

组为模板,用相应引物进行 PCR 扩增(同前),得到相应的 L-合成酶编码基因 *glnA* (Gene ID:9888687),通过 Gibson 连接插入至 pLB1a-carAB 的 *Xho* I 位点,得到质粒 pLB1a-glnA-carAB。

1.2.3 重组菌株的构建

将 pSB1s-ArgFI 质粒与 pLB1a-EfarcC、pLB1a-LlarcC、pLB1a-yahI、pLB1a-carAB 和 pLB1a-glnA-carAB 质粒用氯化钙转化法分别共转至 *E. coli* BW25113 的感受态中,构建 EFFI 至 GSABFI 一系列重组菌株,详见表 1。

1.2.4 2YT 分步诱导

将大肠杆菌重组菌株接种于 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养 12 h 得到种子液。将重组菌株种子液以 1% 的体积比接到 20 mL 2YT 培养基,37 °C、200 r/min 培养 2–3 h,测量菌液 OD_{600} 光吸收值达到 0.6 ± 0.1 时,加入 20 μ L 质量分数 20% 的 L-阿拉伯糖诱导剂,30 °C、200 r/min 诱导 12 h。

1.2.5 SDS-PAGE 验证

收集上述 2YT 分步诱导后的菌体,以 OD_{600} 为 10 的终浓度重悬于 1 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 中。将菌悬液以 200 W 的功率超声破碎(超声 3 s,间隔 10 s,总时长 6.5 min)后 13 000 r/min 离心 1 min,取 20 μ L 上清液与 20 μ L 20 mmol/L Tris-HCl 重悬沉淀液体,分别加入等体积的 2 \times 蛋白上样缓冲液,100 °C 煮沸 10 min,分别制备成上清与沉淀蛋白样品;待样品冷却后,13 000 r/min 离心 30 s,取 5 μ L 蛋白样品上样进行 SDS-PAGE。SDS-PAGE 结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 0.5 h,然后换 1–2 次脱色液,脱色至蛋白条带清晰可见。

1.2.6 全细胞催化

收集上述 2YT 分步诱导后的菌体,用生理盐水洗涤 2 遍,以 OD_{600} 为 20 的终浓度重悬于反应液中,30 °C、200 r/min 全细胞催化 9 h。全细胞催化反应液包括:30 mmol/L L-鸟氨酸,5 mmol/L $MgSO_4$,45 mmol/L 葡萄糖,50 mmol/L NH_4HCO_3 ,100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)。

1.2.7 样品的衍生处理

全细胞催化样品 13 000 r/min 离心 1 min,取上

清稀释 10 倍后进行 2,4-二硝基氟苯(DNFB)衍生。在 1.5 mL EP 管中加入 100 μ L 稀释后样品溶液,100 μ L 0.5 mol/L $NaHCO_3$,50 μ L DNFB 衍生剂(1% DNFB 乙腈溶液),60 °C 反应 1 h。反应后,向 1.5 mL EP 管中加入 750 μ L 0.01 mol/L KH_2PO_4 混匀,用 0.22 μ m 滤膜过滤后制成 DNFB 衍生样品,用于 HPLC 检测氨基酸。

1.2.8 氨基酸的 HPLC 检测

HPLC 检测氨基酸所用色谱柱为 Agilent-XDB-C18,0.35 μ m,150 mm 柱;检测条件为 90% 50 mmol/L 乙酸钠与 10% 乙腈洗脱 15 min,之后乙腈浓度梯度增加到 50%,50 mmol/L 乙酸钠降至 10%,其余为水,维持 2 min 后梯度恢复至初始比例,总时长 35 min;柱温 30 °C,上样量为 10 μ L。

2 结果与分析

2.1 氨甲酰磷酸检测模块的构建

大肠杆菌本底水平的氨甲酰磷酸浓度并不高,其鸟氨酸氨甲酰磷酸转移酶(OTC)的表达也是仅仅满足生长活动所需。因为需要通过检测 L-瓜氨酸的含量来评价不同种类的酶产生氨甲酰磷酸的能力,所以将催化鸟氨酸与氨甲酰磷酸至 L-瓜氨酸的途径扩宽,才能够更加准确地比较氨甲酰磷酸的合成速度(图 1)。大肠杆菌的 OTC 是三聚体形式,由 2 种不同的亚基 ArgF 和 ArgI 构成了 4 种异构体形式(FFF, FFI, FII 和 III)^[25]。因此我们将含有大肠杆菌 *argF* 与 *argI* 的质粒 pSB1s-argFI 转入 BW25113,在大肠杆菌中过表达 OTC,构建含有氨甲酰磷酸检测模块的重组菌株 FI。如图 2B 所示,过表达 OTC 后,菌株 FI 能够更加快速地利用氨甲酰磷酸,全细胞催化后其 L-瓜氨酸含量相比野生型 *E. coli* BW25113 提高约 0.2 mmol/L,达到 0.80 ± 0.15 mmol/L。

2.2 氨甲酰磷酸合成途径中氨基甲酸激酶的筛选

克隆粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)与大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的氨基甲酸激酶(CK)编码基因(其中大肠杆菌

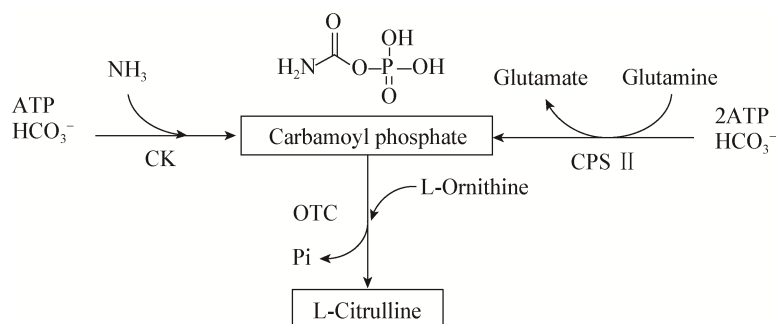


图 1 氨甲酰磷酸的不同合成途径与 L-瓜氨酸合成途径

Figure 1 Different carbamoyl phosphate synthetic pathways and L-citrulline synthetic pathway

注: CK: 氨基甲酸激酶; CPS II: 氨甲酰磷酸合成酶 II; OTC: 鸟氨酸氨甲酰基转移酶.

Note: CK: Carbamate kinase; CPS II: Carbamoyl phosphate synthetase II; OTC: Ornithine carbamoyltransferase.

基因 *yahI* 为 CK 类似蛋白编码基因), 分别构建质粒 pLB1a-EfarcC、pLB1a-LlarcC 和 pLB1a-yahI。将上述质粒分别转入菌株 FI 中, 得到 EFFI、LLFI 和 ECFI3 株重组菌株。重组菌株进行诱导表达后的 SDS-PAGE 电泳结果显示 3 种来源的 CK 均在大肠杆菌中实现了可溶性表达(图 2A)。

收集诱导后菌体, 按 1.2.6 所述方法进行全细胞催化, 其中反应液加入 NH_4HCO_3 作为 CK 的催化底物。反应后检测结果如图 2B 所示, 与对照菌

FI 相比, 菌株 EFFI、LLFI 和 ECFI 的 L-瓜氨酸含量均有所上升, 证明 3 种来源的 CK 均可以合成氨甲酰磷酸。其中大肠杆菌与粪肠球菌的 CK 催化效果较好, 催化 9 h 后, ECFI 和 EFFI 菌株分别生成了 2.95 ± 0.15 mmol/L 和 2.71 ± 0.30 mmol/L L-瓜氨酸, 相比对照菌 FI 分别增加了 2.15 mmol/L 和 1.91 mmol/L。LLFI 菌株催化效果较差, 但也生成了 2.39 ± 0.24 mmol/L L-瓜氨酸, 相较菌株 FI 增加了 1.59 mmol/L。

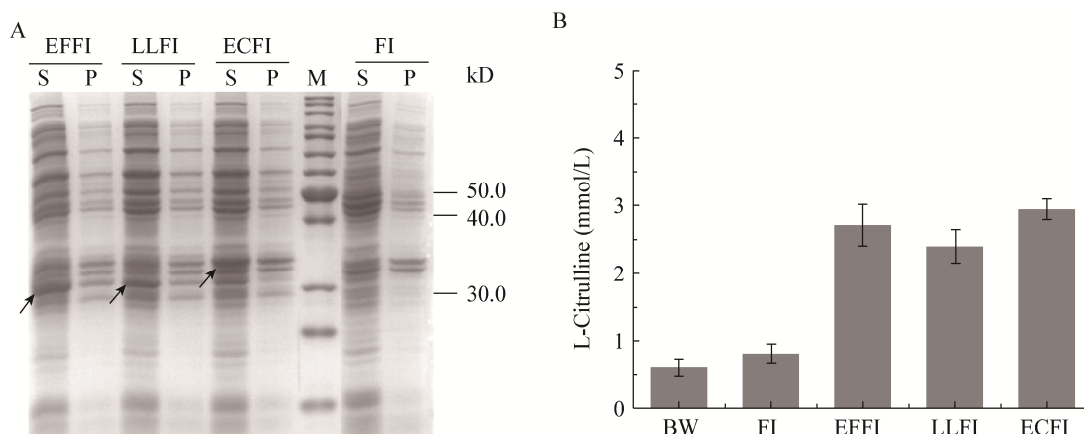


图 2 SDS-PAGE 分析不同来源 CK 的蛋白表达(A)与催化能力比较(B)

Figure 2 SDS-PAGE analysis of expressions of CKs from different species (A) and comparison of catalytic capacity of CKs (B)

注: A: M: Marker; EFFI、LLFI、ECFI 和 FI 菌株的详情见表 1; S: 细胞破碎上清; P: 细胞破碎沉淀。B: 全细胞催化反应液初始含有 50 mmol/L NH_4HCO_3 , 其余条件与 1.2.6 一致。

Note: A: M: Marker; See Table 1 for details of EFFI, LLFI, ECFI and FI strains; S: Supernatant; P: Precipitation. B: The whole cell catalytic reaction solution initially contained 50 mmol/L NH_4HCO_3 , and the other conditions were consistent with those in 1.2.6.

2.3 增强氨甲酰磷酸合成酶 II (CPS II) 合成氨甲酰磷酸

克隆 *E. coli* BW25113 的(CPS II)编码基因 *carAB*, 构建质粒 pLB1a-*carAB* 并在菌株 FI 中进行过表达, 构建 ABFI 重组菌株。将重组菌 ABFI 进行诱导后进行 SDS-PAGE 电泳, 在 SDS-PAGE 电泳图上 40 kD (CarA) 与 120 kD (CarB) 处看到明显可溶蛋白条带(图 3A), 证明大肠杆菌的 CPS II 成功过表达。

由于氨甲酰磷酸合成酶 II 所利用的底物为 L-谷氨酰胺而非 NH_3 , 所以将转化液中 NH_4HCO_3 替换为等浓度的 L-谷氨酰胺与 NaHCO_3 。结果如图 3B 所示, 大肠杆菌来源的 CPS II (CarAB) 利用 L-谷氨酰胺作为合成氨甲酰磷酸的氨基供体, 全细胞催化 9 h 生成了 3.16 ± 0.29 mmol/L L-瓜氨酸, 相比对照菌 FI (1.72 ± 0.15 mmol/L) 增加约 1.44 mmol/L, 提高了 83.72%。

2.4 氨基甲酸激酶途径与氨甲酰磷酸合成酶 II 途径的底物供应优化

2.4.1 氨基甲酸激酶途径 NH_4HCO_3 浓度的优化

在表现较好的菌株 ECFI 基础上, 将全细胞

催化 NH_4HCO_3 的初始浓度由 50 mmol/L 增加至 200 mmol/L, 发现在 100 mmol/L NH_4HCO_3 的条件下, 菌株 ECFI 产 L-瓜氨酸达到峰值 4.67 ± 0.55 mmol/L, 较 50 mmol/L NH_4HCO_3 条件下增加了 58%。当 NH_4HCO_3 浓度超过 100 mmol/L 时, L-瓜氨酸产量并未增加, 反而有所降低(图 4)。因此采用 100 mmol/L NH_4HCO_3 作为大肠杆菌来源 CK 的底物较为合适。

2.4.2 氨甲酰磷酸合成酶 II 途径引入 L-谷氨酰胺合成酶

由于 CPS II 利用 L-谷氨酰胺来合成氨甲酰磷酸的氨基, 之后 L-谷氨酰胺变为副产物 L-谷氨酸, 所以胞内 L-谷氨酰胺的浓度成为保证 CPS II 高效合成氨甲酰磷酸的必要条件。因此在菌株 ABFI 中尝试引入两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)来源的 L-谷氨酰胺合成酶(L-Glutamine synthetase, GS), 构建菌株 GSABFI, 在无机氮的推动下将副产物 L-谷氨酸转化为 L-谷氨酰胺, 提高胞内底物 L-谷氨酰胺的浓度。结果如图 5A 所示, 全细胞催化 9 h, 菌株 GSABFI 合成了 5.95 ± 0.45 mmol/L L-瓜氨酸,

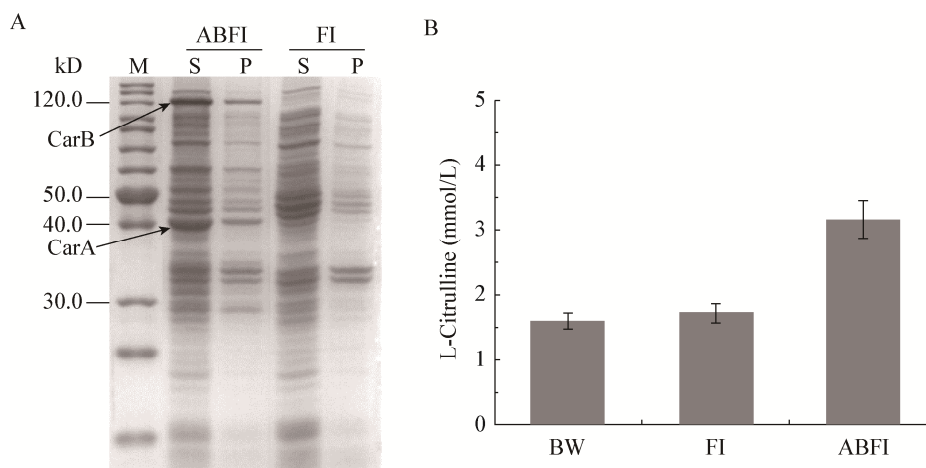


图 3 SDS-PAGE 分析 CPS II 的蛋白表达(A)与催化效果(B)

Figure 3 SDS-PAGE analysis of expression of CPS II (A) and catalytic effect (B)

注: A: M: Marker; ABFI 和 FI 菌株的详情见表 1; S: 细胞破碎上清; P: 细胞破碎沉淀。B: 全细胞催化反应液初始含有 50 mmol/L L-谷氨酰胺, 50 mmol/L NaHCO_3 , 无 NH_4HCO_3 , 其余条件与 1.2.6 一致。

Note: A: M: Marker; See Table 1 for details of ABFI and FI strains; S: Supernatant; P: Precipitation. B: The whole cell catalytic reaction solution initially contained 50 mmol/L L-glutamine, 50 mmol/L NaHCO_3 and no NH_4HCO_3 , the other conditions were consistent with those in 1.2.6.

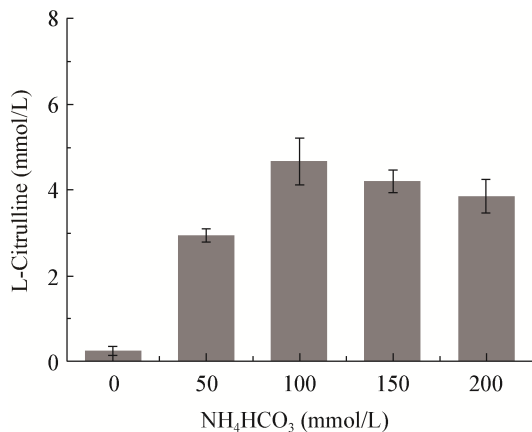


图4 NH_4HCO_3 浓度对菌株ECFI合成氨甲酰磷酸的影响
Figure 4 Effects of different concentrations of NH_4HCO_3 on synthesizing carbamoyl phosphate by strain ECFI

注: 全细胞催化反应液初始含有 0–200 mmol/L NH_4HCO_3 , 其余反应条件如 1.2.6 所述。

Note: Concentration of NH_4HCO_3 contained 0–200 mmol/L in the whole-cell biocatalytic reaction mixture, the other component were consistent with those in 1.2.6.

相比未过表达 GS 的菌株 ABFI (3.86 ± 0.31 mmol/L), L-瓜氨酸产量提高了 54.15%。实验证明, 过表达 GS 可以有效促进 CPS II 途径合成氨甲酰磷酸的效率, 通过 L-瓜氨酸检测模块表现为 L-瓜氨酸浓度的

提高。

由于 GS 可以催化谷氨酸与无机氨合成 L-谷氨酰胺, 因此可能不需要外源添加过多的 L-谷氨酰胺即可满足反应所需。在维持 50 mmol/L NH_4HCO_3 的条件下, 逐步减少外源 L-谷氨酰胺的添加量, 如图 5B 所示, 结果表明, 初始不添加 L-谷氨酰胺, 菌株 GSABFI 仍可以合成 5.73 ± 0.44 mmol/L 的 L-瓜氨酸, 与初始添加 50 mmol/L L-谷氨酰胺的一组 (5.95 ± 0.45 mmol/L) 无显著差异。结果表明, 通过引入 GS, 副产物 L-谷氨酸在 GS 作用下转化为 L-谷氨酰胺, 使反应继续, 因此系统中无需添加 L-谷氨酰胺。

2.5 氨基甲酸激酶途径与氨甲酰磷酸合酶 II 途径的比较

经过上述条件优化后, 将表征氨基甲酸激酶途径的 ECFI 菌株与表征氨甲酰磷酸合酶 II 途径的 GSABFI 菌株进行了系统的比较。结果如图 6 所示, 在初始添加 50 mmol/L NH_4HCO_3 的条件下, 对照菌株 FI 的 L-瓜氨酸浓度为 0.80 ± 0.15 mmol/L, ECFI 菌株为 2.95 ± 0.15 mmol/L, GSABFI 为 5.73 ± 0.44 mmol/L;

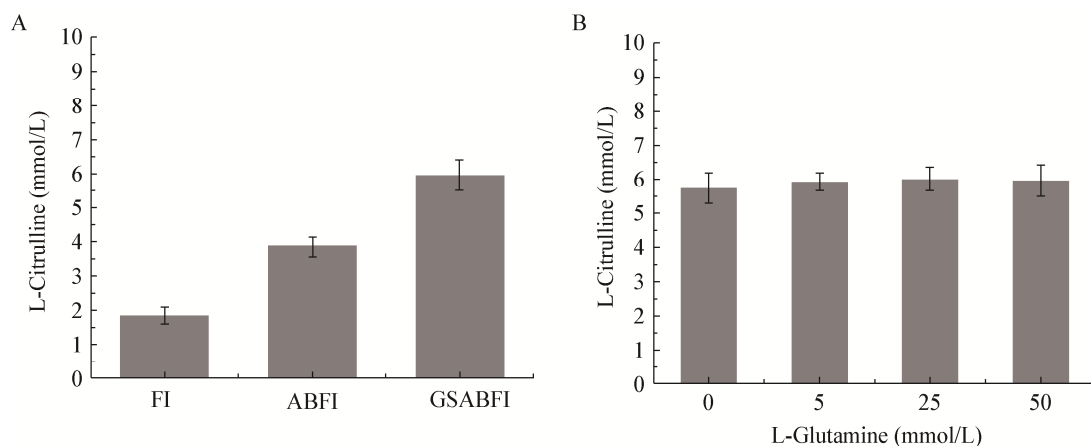


图5 引入两歧双歧杆菌来源 GS 对 CPS II 途径的影响(A), 以及降低 L-谷氨酰胺添加量对菌株 GSABFI 的影响(B)

Figure 5 The effect on CPS II synthesis with the introduction of GS from *Bifidobacterium bifidum* (A), and the effect of reducing the amount of L-glutamine on the strain GSABFI (B)

注: A: 全细胞催化反应液初始添加 50 mmol/L L-谷氨酰胺。B: 全细胞催化反应液初始含 50 mmol/L NH_4HCO_3 , L-谷氨酰胺为 0–50 mmol/L。其余反应条件与 1.2.6 一致。

Note: A: The whole cell catalytic reaction solution initially contained 50 mmol/L L-glutamine. B: Concentration of L-glutamine contained 0–50 mmol/L in the whole-cell biocatalytic reaction mixture. Remaining reaction conditions were consistent with those in 1.2.6.

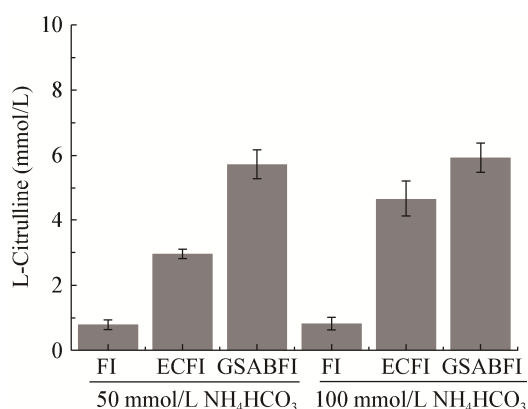


图6 两种合成氨甲酰磷酸途径的比较

Figure 6 Comparison of two carbamoyl phosphate biosynthesis pathways

注: 全细胞催化初始加入的 NH_4HCO_3 浓度如图所示, 其余条件如 1.2.6 所示。

Note: Concentrations of NH_4HCO_3 in the whole-cell biocatalytic reaction mixtures are shown in the figure, the other components were consistent with those in 1.2.6.

与对照菌 FI 相比, ECFI 菌株增加了 2.15 mmol/L, 而 GSABFI 菌株增加了 4.93 mmol/L, 是 ECFI 的 2.29 倍。在初始 NH_4HCO_3 浓度为 100 mmol/L 时, 与对照菌 FI 相比, ECFI 菌株的 L-瓜氨酸含量增加了 3.84 mmol/L, 而 GSABFI 菌株增加了 5.29 mmol/L, 是 ECFI 菌株的 1.38 倍。整体来看, 过表达 GS 后的氨甲酰磷酸合成酶途径 II, 即 GSABFI 菌株合成氨甲酰磷酸的效率更高。

3 讨论与结论

氨甲酰磷酸属于精氨酸与嘧啶类及其衍生物的“共同枢纽”, 而氨甲酰磷酸的化学性质又极其活泼, 所以氨甲酰磷酸的合成是微生物合成上述物质的关键点。目前在微生物合成领域, 针对不同途径合成氨甲酰磷酸效率比较的报道相对较少。本研究在大肠杆菌中, 对氨甲酰磷酸合成的 CPS II 途径与 CK 途径在全细胞催化水平进行了相应的比较和优化。我们对不同来源的 CK 进行过表达发现, 粪肠球菌、乳酸乳球菌与大肠杆菌 3 种来源的 CK 均可以催化 NH_4HCO_3 合成氨甲酰磷酸。本研究结果表明大肠杆菌来源的 *yahI* (据基因注释为 CK 类似蛋白编码基因) 所编码的蛋白具有 CK 活性, 而且与其

他两种来源的 CK 相比, 催化活力更好。过表达 *yahI* (ECFI 菌株), L-瓜氨酸产量提高 2.69 倍。通过优化底物 NH_4HCO_3 , ECFI 菌株比对照菌株 L-瓜氨酸产量提高 4.63 倍。增强 CPS II 途径的 ABFI 菌株较对照菌 FI 的 L-瓜氨酸增加了 83.72%。在 CPS II 催化途径中引入两歧双歧杆菌来源的 L-谷氨酰胺合成酶构建 GSABFI 菌株, 进一步促进了氨甲酰磷酸, L-瓜氨酸产量从 3.86 ± 0.31 mmol/L 提高到 5.95 ± 0.45 mmol/L, 提高了 54.15%。CPS II 催化过程中产生的副产物 L-谷氨酸在 L-谷氨酰胺合成酶催化下利用无机氨, 以加氨的方式被转化为 L-谷氨酰胺, 增加胞内 L-谷氨酰胺的供应, 促进合成氨甲酰磷酸, 表现为 L-瓜氨酸的增加。值得注意的是, 引入 L-谷氨酰胺合成酶后, L-谷氨酰胺浓度可以降低至无需添加(图 5B), GSABFI 菌株仍比对照菌 FI 增加了 5.90 倍, 使 CPS II 途径与 CK 途径一样使用无机氨、 HCO_3^- 以及葡萄糖产生的 ATP 合成氨甲酰磷酸。

不同于可逆的 CK 途径^[18,21], CPS II 途径为不可逆反应^[12], 因此 CPS II 途径在合成氨甲酰磷酸与生产相关高附加值产物上更具优势。针对 CPS II 途径的改造, 还可以寻找酶学性质更加优良的 L-谷氨酰胺合成酶, 使胞内 L-谷氨酰胺供应更加充足, 成为促进氨甲酰磷酸合成的推动力, 进一步提高 CPS II 途径合成氨甲酰磷酸的效率。对于大肠杆菌等菌种而言, 有望降低生产精氨酸、嘧啶类及其衍生物的成本。

REFERENCES

- [1] Charlier D, Glansdorff N. Biosynthesis of arginine and polyamines[J]. *EcoSal Plus*, 2004, 1(1). DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.10
- [2] Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria[J]. *Microbiological Reviews*, 1986, 50(3): 314-352
- [3] Wang Q, Xia JR, Guallar V, et al. Mechanism of thermal decomposition of carbamoyl phosphate and its stabilization by aspartate and ornithine transcarbamoylases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(44): 16918-16923
- [4] Purcarea C, Ahuja A, Lu T, et al. *Aquifex aeolicus* aspartate transcarbamoylase, an enzyme specialized for the efficient utilization of unstable carbamoyl phosphate at elevated

- temperature[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(52): 52924-52934
- [5] Wu XJ, Sun JK, Huo WT, et al. Effects of *carAB* and *pyrBI* overexpression on cytidine fermentation in *Escherichia coli*[J]. China Biotechnology, 2012, 32(2): 39-44 (in Chinese)
吴晓娇, 孙家凯, 霍文婷, 等. 过表达 *carAB* 和 *pyrBI* 对大肠杆菌发酵胞苷的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(2): 39-44
- [6] Charlier D, Nguyen Le Minh P, Roovers M. Regulation of carbamoylphosphate synthesis in *Escherichia coli*: an amazing metabolite at the crossroad of arginine and pyrimidine biosynthesis[J]. Amino Acids, 2018, 50(12): 1647-1661
- [7] Lopes-Marques M, Igrejas G, Amorim A, et al. Human carbamoyl phosphate synthetase I (CPSI): insights on the structural role of the unknown function domains[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 421(3): 409-412
- [8] Thoden JB, Huang XY, Raushel FM, et al. Carbamoyl-phosphate synthetase: creation of an escape route for ammonia[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(42): 39722-39727
- [9] Guadalajara AM, Rubio V, Grisolia S. Inactivation of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia) by elastase as a probe to investigate binding of the substrates[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983, 117(1): 238-244
- [10] Pekkala S, Martínez AI, Barcelona B, et al. Structural insight on the control of urea synthesis: identification of the binding site for *N*-acetyl-L-glutamate, the essential allosteric activator of mitochondrial carbamoyl phosphate synthetase[J]. Biochemical Journal, 2009, 424(2): 211-220
- [11] Shi DS, Caldovic L, Tuchman M. Sources and fates of carbamyl phosphate: a labile energy-rich molecule with multiple facets[J]. Biology, 2018, 7(2): 34
- [12] Rubio V, Cervera J. The carbamoyl-phosphate synthase family and carbamate kinase: structure-function studies[J]. Biochemical Society Transactions, 1995, 23(4): 879-883
- [13] Thoden JB, Raushel FM, Benning MM, et al. The structure of carbamoyl phosphate synthetase determined to 2.1 Å resolution[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 1999, 55(1): 8-24
- [14] Koo BS, Hyun HH, Kim SY, et al. Enhancement of thymidine production in *E. coli* by eliminating repressors regulating the carbamoyl phosphate synthetase operon[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(1): 71-78
- [15] Anderson PM. Binding of allosteric effectors to carbamyl-phosphate synthetase from *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 1977, 16(4): 587-593
- [16] Fan YB, Lund L, Shao Q, et al. A combined theoretical and experimental study of the ammonia tunnel in carbamoyl phosphate synthetase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(29): 10211-10219
- [17] Marina A, Uriarte M, Barcelona B, et al. Carbamate kinase from *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: cloning of the genes, studies on the enzyme expressed in *Escherichia coli*, and sequence similarity with *N*-acetyl-L-glutamate kinase[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 253(1): 280-291
- [18] Alcántara C, Cervera J, Rubio V. Carbamate kinase can replace *in vivo* carbamoyl phosphate synthetase. Implications for the evolution of carbamoyl phosphate biosynthesis[J]. FEBS Letters, 2000, 484(3): 261-264
- [19] Hennessy JE, Latter MJ, Fazelinejad S, et al. Hyperthermophilic carbamate kinase stability and anabolic *in vitro* activity at alkaline pH[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(3): e02250-17
- [20] Park H, Jung YM, You JK, et al. Analysis of the CO₂ and NH₃ reaction in an aqueous solution by 2D IR COS: formation of bicarbonate and carbamate[J]. Journal of Physical Chemistry A, 2008, 112(29): 6558-6562
- [21] Ramón-Maiques S, Marina A, Guinot A, et al. Substrate binding and catalysis in carbamate kinase ascertained by crystallographic and site-directed mutagenesis studies: movements and significance of a unique globular subdomain of this key enzyme for fermentative ATP production in bacteria[J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 397(5): 1261-1275
- [22] Uriarte M, Marina A, Ramón-Maiques S, et al. Carbamoyl phosphate synthesis: carbamate kinase from *Pyrococcus furiosus*[J]. Methods in Enzymology, 2001, 331: 236-247
- [23] Lund L, Fan YB, Shao Q, et al. Carbamate transport in carbamoyl phosphate synthetase: a theoretical and experimental investigation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(11): 3870-3878
- [24] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [25] Legrain C, Stalon V, Glansdorff N. *Escherichia coli* ornithine carbamoyltransferase isoenzymes: evolutionary significance and the isolation of *largF* and *largI* transducing bacteriophages[J]. Journal of Bacteriology, 1976, 128(1): 35-38