

# 枯草芽孢杆菌 *ccpA* 基因敲除及其核黄素产量的影响

应 明 班 睿\*

(天津大学化工学院 天津 300072)

**摘 要** :CcpA 蛋白是介导枯草芽孢杆菌碳分解代谢物阻遏( CCR )的全局调控因子 ,由 *ccpA* 基因编码。CCR 效应的存在影响 *B. subtilis* 对葡萄糖的利用 ,降低 *B. subtilis* 生产发酵产品的效率。采用基因重组技术敲除了核黄素发酵菌株 *B. subtilis*24/pMX45 的 *ccpA* 基因 ,构建了 CcpA 缺陷株 *B. subtilis*24A1/pMX45。发酵结果显示 :*B. subtilis*24A1/pMX45 能够在 70h 内基本耗尽 10% 的葡萄糖 ,生物量达到  $1.5 \times 10^9$  个细胞/mL ,溢流代谢产物积累量减少 ,在 8% 和 10% 葡萄糖浓度下 ,*B. subtilis*24A1/pMX45 核黄素产量分别比 *B. subtilis*24/pMX45 提高了 62% 和 95%。CcpA 的缺陷 ,可以缓解葡萄糖引起的 CCR 效应 ,显著提高菌株的核黄素产量。

**关键词** :CcpA 蛋白 ;碳分解代谢物阻遏 ;核黄素 ;发酵 ;枯草芽孢杆菌

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)01-0023-05

葡萄糖是大多数原核生物优先利用的碳源 ,其分解代谢物对许多基因的表达产生阻遏或激活作用 ,引起复杂的生理效应 ,这种现象称为碳分解代谢物阻遏效应( CCR 效应 )<sup>[1]</sup>。葡萄糖引起的 CCR 效应在 *Bacillus subtilis* 中已经被广泛研究<sup>[2,3]</sup>。分解代谢物控制蛋白( Catabolite control protein A ,CcpA )作为主要的调节蛋白 ,介导细胞的 CCR 效应。CcpA 蛋白与辅助蛋白 HPr-Ser46-P 或 Crh-Ser46-P 形成复合物<sup>[4]</sup> ,作用于靶基因上的分解代谢物响应元件( cre boxes ) ,抑制或激活靶基因的转录。HPr 是 PTS 系统中的小分子磷酸载体蛋白 ,当葡萄糖及分解代谢物存在时 ,其 46 位丝氨酸残基被磷酸化 ,形成 HPr-Ser46-P。Crh 蛋白是 HPr 功能类似蛋白。*B. subtilis* 中心代谢中许多基因都存在 cre boxes ,其表达都受 CcpA 调控。CCR 效应的主要生理表现包括 :控制细胞对葡萄糖及其它碳源吸收和利用<sup>[5]</sup> ;激活 EMP 途径和溢流代谢 ,导致乙酸、乳酸、羟基丁酮等发酵产物积累<sup>[6]</sup> ,引起 pH 值下降 ,降低细胞比生长速率 ;抑制 TCA 循环<sup>[7]</sup> ,降低呼吸和产能效率 ;增加无效代谢循环和能量耗费<sup>[8]</sup>。

*B. subtilis* 是生产酶制剂、核苷、维生素等产品的工业发酵菌株 ,CCR 效应通常导致发酵过程不稳定 ,降低发酵单位和收率。在工业发酵过程中 ,为了减少 CCR 效应的干扰 ,通常采用葡萄糖流加发酵工艺 ,严格控制发酵液中的葡萄糖浓度<sup>[9]</sup>。碳源流加工艺不能从根本上消除 CCR 效应 ,同时还增加发酵过程控制的复杂性及成本支出。重组 *B. subtilis*

subsp. *subtilis* 发酵生产核黄素 ,是目前核黄素工业生产中普遍采用的新技术<sup>[10]</sup>。但是葡萄糖作为发酵碳源以及引起的 CCR 效应 ,严重抑制菌体生长及核黄素合成 ,限制了葡萄糖在核黄素发酵中的应用<sup>[11]</sup>。本研究以重组核黄素发酵菌株 *B. subtilis*24 为出发菌 ,采用基因重组技术敲除 *ccpA* 基因 ,构建 CcpA 缺陷菌株 ,并研究了 CcpA 缺陷对细胞生长和核黄素发酵的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** :实验涉及的菌株和质粒见表 1。*B. subtilis*24/pMX45 是能够过量合成核黄素的工程菌株 ,质粒 pMX45 带有核黄素操纵子 ,在 *B. subtilis* 中有两个拷贝。

**1.1.2 试剂** :限制性内切酶、T4 连接酶、Pyrobest 聚合酶购自 Fermentas 公司 ;其它生化试剂均购自上海 Sangon 公司。

表 1 菌种和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmid used in this study		
Strains and plasmid	Genotype	Source
<i>B. subtilis</i> 168	Wild type	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> 24	8-AC <sup>r</sup> , roseflavin <sup>r</sup> , Dc <sup>r</sup> , rec44	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> 24/pMX45	8-AC <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> , roseflavin <sup>r</sup> , Dc <sup>r</sup> , rec44	Laboratory stock
<i>Escherichia coli</i> top10	Host for plasmid construction	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> 24A1/pMX45	8-AC <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> , roseflavin <sup>r</sup> , Dc <sup>r</sup> Δ <i>ccpA</i> : <i>erm</i>	This study
<i>B. subtilis</i> 24A1	8-AC <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> , roseflavin <sup>r</sup> , Dc <sup>r</sup> Δ <i>ccpA</i> : <i>erm</i>	This study
pUC18	Amp <sup>r</sup> , lacZ , <i>E. coli</i> plasmid	Laboratory stock
pMX45	Em <sup>r</sup> , rib operon <i>B. subtilis</i> plasmid	Laboratory stock
pA-spac	Em <sup>r</sup> , integration plasmid	BCSC
pUC-pA	Amp <sup>r</sup> , lacZ : <i>ccpA</i>	This study
pUC-pA :Em	Amp <sup>r</sup> Em <sup>r</sup> , lacZ : <i>ccpA</i> : <i>erm</i>	This study

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-22-27409493 ;E-mail banrui@eyou.com

作者简介 :应 明(1974 - ) ,女 ,天津市人 ,在读博士生 ,研究方向为分子生物学。E-mail ym8312@yahoo.com.cn

收稿日期 :2005-05-13 ;接受日期 :2005-05-27 ;修回日期 :2005-10-31

## 1.2 基因操作方法

*B. subtilis* 染色体提取采用玻璃珠法<sup>[12]</sup>。PCR 反应体系(50 $\mu$ L):无菌去离子水 38.25 $\mu$ L, 10 $\times$  pyrobest 缓冲液 5 $\mu$ L, dNTP 混合液(25mmol/L, pH 8.0)4 $\mu$ L, 上、下引物(15pmol/ $\mu$ L)各 1 $\mu$ L, 模板 DNA ( $\leq 0.1\mu$ g/mL) 0.5 $\mu$ L, Pyrobest 聚合酶(5U/ $\mu$ L) 0.25 $\mu$ L。PCR 反应条件:92 $^{\circ}$ C 4min; 92 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 40s, 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 保温 5min。

本试验中所采用的 DNA 操作, 包括 DNA 的酶切、片段回收、连接和琼脂糖凝胶电泳等方法参照文献<sup>[13]</sup>。转化 *B. subtilis* 24 采用原生质转化法<sup>[14]</sup>, 用 CMR 原生质再生抗性培养基筛选转化子。

## 1.3 发酵条件和分析方法

核黄素发酵培养基成分为 2.5% 酵母粉, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2% 的尿素, 分别加入 5%、8%、10% 的葡萄糖。发酵条件为 41 $^{\circ}$ C、250r/min、5% 接种量、装瓶量 50mL/500mL, 自然 pH 值。发酵周期为 80h, 间隔 12h 取样进行分析。生物量测定采用 25 $\times$ 16 型血球计数板, 显微镜全菌计数法。

核黄素定量分析采用分光光度法<sup>[15]</sup>:在 444nm 下测定发酵液的吸光度值, 根据  $Y = 0.0319X - 0.0042$  计算核黄素的含量; Y 为吸光度, X(mg/L) 为稀释后的核黄素浓度。发酵液中葡萄糖和溢流产物的定量分析都采用高效液相色谱法。

# 2 结果

## 2.1 重组质粒 pUC-pA::Em 的构建

GenBank 提供的 *B. subtilis* 168 基因序列显示, *ccpA* 基因位于染色体 263 $^{\circ}$ , 包括启动子和终止子在内全长 1242bp, 其中结构基因为 1002bp。在 *ccpA* 基因上、下游各 200bp 的范围内, 采用 oligo 软件进行辅助设计, 各选择了一段 20bp 的寡核苷酸序列; 同时依据 Vector NTI 软件对酶切位点的分析结果, 选择在该上述寡核苷酸序列两端加入 *Bam*H I 酶切位点和 5 个保护碱基, 设计出 PCR 扩增 *ccpA* 基因的引物 P1: 5'-GGGCCCGGATCCACGTTTTCATCATCTATAAA-3' 和 P2: 5'-GGGCCCGGATCCTGTTACGATGAAGAAA GAGG-3'。以 P1、P2 为引物, 扩增得到了包括全长 *ccpA* 基因在内的 1.4kb DNA 片段。

用 *Bam*H I 分别消化质粒 pUC18 和 *ccpA* 基因的 PCR 产物, 然后进行连接反应, 连接产物转化 *E. coli* Top10, 通过筛选转化子、提取质粒及酶切电泳鉴定, 得到重组质粒 pUC-pA。Vector NTI 酶切位点分析显示, 在 *ccpA* 基因中分别存在一个 *Bss*H II

(439bp) 和 *Cl*a I (680bp) 单切点, 恰好可以作为 *erm* 基因的插入位点, 并同时替换掉中间约 240bp 的寡核苷酸序列。用 *Cl*a I 和 *Bss*H II 消化质粒 pA-spac, 分离纯化得到 1.2kb 带有 *erm* 基因的 *Cl*a I -*Bss*H II 片段, 用 *Cl*a I 和 *Bss*H II 消化质粒 pUC-pA, 分离大片段后与 1.2kb 的 *erm* 基因 *Cl*a I -*Bss*H II 片段进行连接。连接产物转化 *E. coli* Top10, 在氨苄抗性平板上筛选转化子。经质粒提取和酶切电泳鉴定, 得到了重组质粒 pUC-pA::Em。在 pUC-pA::Em 质粒中, *ccpA* 基因被 *erm* 片段插入, 同时替换掉大约 200bp 的核苷酸序列。

## 2.2 CcpA 缺陷菌株的构建

重组质粒 pUC-pA::Em 转化 *B. subtilis* 24, 用含有 1 $\mu$ g/mL 红霉素的 CMR 平板筛选转化子, 得到 8 个转化子。将这 8 个转化子分别纯化后, 验证其红霉素抗性, 其中 4 个转化子为阳性转化子。因为 pUC-pA::Em 不带有 *B. subtilis* 的复制原点, 只有与染色体发生重组, 红霉素抗性才能稳定存在。所以, 这 4 个转化子应是 pUC-pA::Em 质粒的 *ccpA*::*erm* 片段, 与染色体发生了重组, 但是 *erm* 整合位点有可能发生在 *ccpA* 位点, 也有可能随机整合到了染色体上的其它位置。为了进一步鉴定重组是否为 *ccpA* 基因位点的双交换重组, 即 *erm* 片段是否正确插入到 *ccpA* 基因之中, 分别提取这 4 株转化子的染色体 DNA 作为模板, 采用 PCR 方法进行验证。

设计两条验证引物 dP<sub>1</sub> 5'-GGGCCCTGCCTGCTT TAACACAGAGG-3' 和 dP<sub>2</sub> 5'-GGGCCAGCCAATGGT GAAAGTCAAC-3', 这两条引物分别位于原扩增引物 P1、P2 的上游和下游。如果 *ccpA* 基因位点没有发生双交换重组, dP<sub>1</sub>、dP<sub>2</sub> 的 PCR 扩增产物应该略大于 P1、P2 的扩增产物, 在 1.5kb 左右。如果 *ccpA* 基因位点发生了双交换重组, 1.2kb 的 *erm* 片段被插入到 *ccpA* 基因之中, 则 dP<sub>1</sub>、dP<sub>2</sub> 的 PCR 产物大小应该在 2.6kb 左右。

4 株红霉素抗性的转化子的 PCR 验证结果显示, 有一株转化子的 PCR 产物为 2.6kb, 符合理论预期, 是 *ccpA* 缺陷型菌株, 该菌株被命名为 *B. subtilis* 24A1。将带有核黄素操纵子的质粒 pMX45 转化 24A1, 得到 CcpA 缺陷的核黄素发酵菌株 *B. subtilis* 24A1/pMX45。其它 3 个转化子 PCR 产物为 1.5kb, 说明这 3 株转化子可能是 *erm* 基因随机整合到了染色体的其它位点, 因此被淘汰。

## 2.3 CcpA 缺陷对细胞生长的影响

分别用含 5%、8%、10% 葡萄糖作为发酵碳源。

在摇瓶中分别进行 24A1/pMX45 和 24/pMX45 的核黄素发酵,测定生长曲线(图 1)。当葡萄糖浓度达到 8% 时 24/pMX45 的生长受到强烈抑制,最大生物量为  $5 \times 10^8$  个细胞/mL;而 24A1/pMX45 在 8% 的葡萄糖浓度下,最大生物量能达到  $2 \times 10^9$  个细胞/mL

以上;在 10% 的葡萄糖浓度下,生物量也能达到  $1.5 \times 10^9$  个细胞/mL 以上。可见,24A1/pMX45 的 CcpA 的缺陷,在一定程度上解除了 CCR 效应,使菌体能够在较高葡萄糖浓度下正常生长。

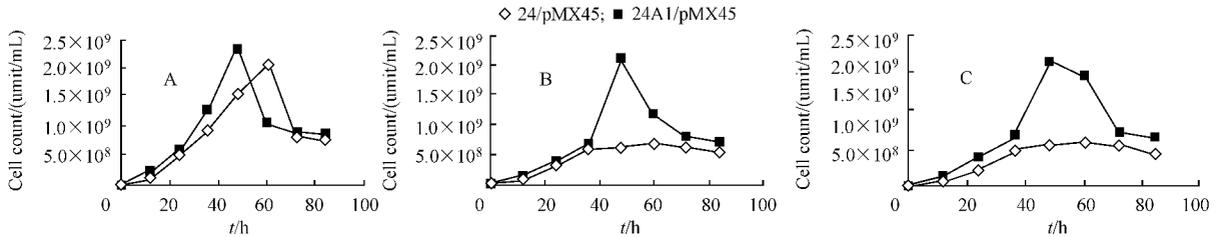


图 1 24A1/pMX45 与 24/pMX45 生物量对比

Fig.1 Comparison of biomass of 24A1/pMX45 and 24/pMX45

A: 5% glucose; B: 8% glucose; C: 10% glucose.

### 2.4 CcpA 缺陷菌株发酵过程 pH 值的变化

上述发酵过程中,发酵液 pH 值的变化显示(图 2)在 8% 和 10% 葡萄糖浓度下,24/pMX45 发酵液 pH 值始终低于 24A1/pMX45 菌株 0.3 ~ 0.5 个单位,并且大部分时间低于 6.5。发酵液 pH 值的降低,与

酸性发酵产物的积累有一定的关系,与 CCR 效应的强弱有关。结果显示,*ccpA* 基因的敲除确实减少了溢流代谢强度,与预测相一致。因此,CcpA 的缺陷,对于维持发酵过程 pH 稳定,促进菌体生长和得到较大的生物量具有积极作用。

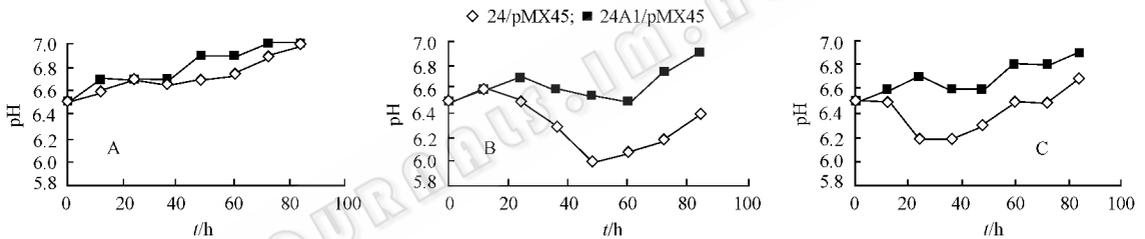


图 2 24A1/pMX45 与 24/pMX45 发酵液 pH 值对比

Fig.2 Comparison of pH in fermentation of 24A1/pMX45 and 24/pMX45

A: 5% glucose; B: 8% glucose; C: 10% glucose.

### 2.5 CcpA 缺陷菌株溢流代谢产物积累量的变化

在上述发酵实验中,每隔 12h 取样,测定发酵液中溢流代谢产物的含量(图 3)。在 8% 和 10% 的葡萄糖浓度下,24A1/pMX45 菌株的乳酸、乙酸和羟基丁酮积累量,都明显低于 24/pMX45 菌株。这一现象与 pH 值及生长曲线所显示的变化规律十分吻合。说明 CcpA 的缺陷,降低了溢流代谢的强度,减少了酸性发酵产物的积累,维持了 pH 值的稳定,对细胞生长有利;同时,改变了碳代谢流的分布,有利于提高底物的利用率。

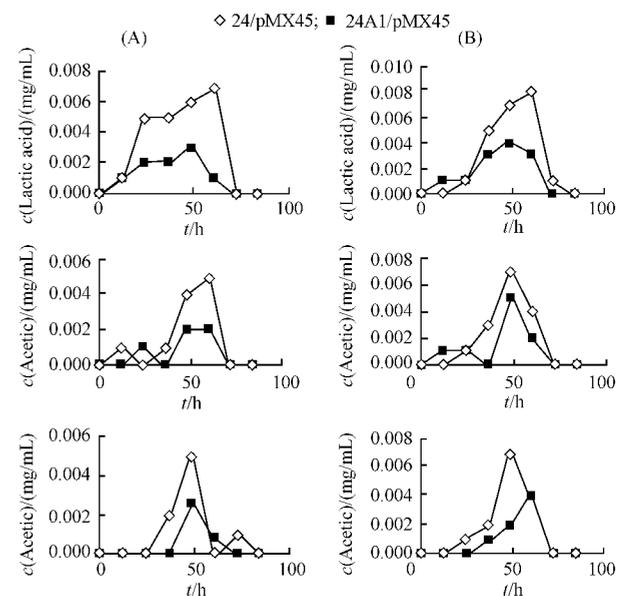


图 3 溢流代谢产物积累量

Fig.3 Comparison of overflow metabolite of during fermentation

### 2.6 CcpA 缺陷菌株对葡萄糖消耗和核黄素产量的影响

在以上发酵条件下,观察两株菌对葡萄糖的吸收,以及核黄素合成的差异(图 4)。在所有葡萄糖浓度下,24/pMX45 的核黄素合成速率和产量上都明显低于 24A1/pMX45,而且随着葡萄糖浓度增加,呈现迅速下降趋势。24A1/pMX45 的核黄素产量及合

成速率,在8%的葡萄糖浓度下,基本不受葡萄糖浓度影响。同时,24A1/pMX45的葡萄糖消耗速率要快

于24/pMX45,5%、8%的葡萄糖在60h前能够基本上耗尽,10%葡萄糖在70h也基本被耗尽。

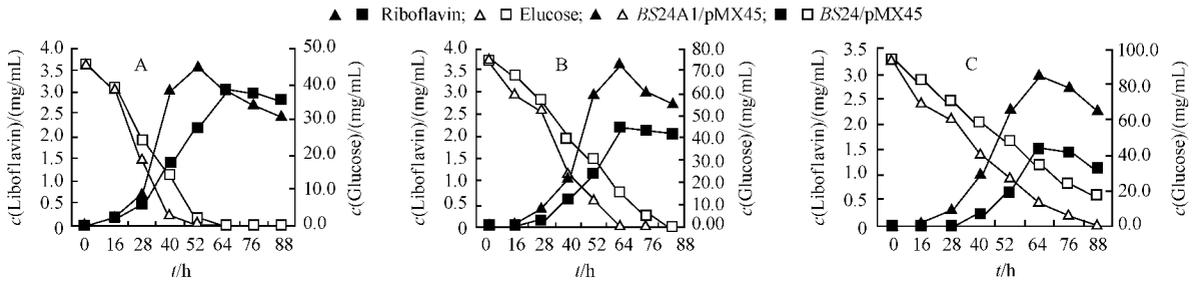


图4 核黄素合成与糖消耗曲线

Fig.4 Comparison of glucose absorption and riboflavin forming

A 5% glucose ;B 8% glucose ;C 10% glucose.

### 3 讨论

利用基因重组技术敲除 *B. subtilis*24/pMX45 的 *ccpA* 基因,得到 CcpA 缺陷的 *B. subtilis*24A1/pMX45。在5%~10%的葡萄糖浓度下进行的对比发酵显示,*B. subtilis*24A1/pMX45 的生物量提高了一个数量级,但发酵过程 pH 的下降和溢流代谢产物的积累量明显减少,5%和8%的葡萄糖能够在发酵60h前被耗尽,10%葡萄糖也能在70h内基本耗尽,说明 CcpA 的缺陷确实在一定程度上缓解了葡萄糖所引起的 CCR 效应,提高了菌株对葡萄糖的耐受力。由于糖代谢的改善,在以8%和10%葡萄糖为碳源的发酵过程中,*B. subtilis*24A1/pMX45 的核黄素产量分别比 *B. subtilis*24/pMX45 提高了62%和95%。因此,敲除 *ccpA* 基因在一定程度上缓解葡萄糖所引起的 CCR 效应,能够提高了菌株对葡萄糖的耐受力,进而显著提高菌株的核黄素发酵产量。

### 参 考 文 献

- [1] Stilke J, Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2: 195-201.
- [2] Blencke HM, Homuth G, Ludwig H, et al. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering*, 2003, 5: 133-149.
- [3] Matthew SM, Barbara LS, Randal RM, et al. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(5): 1366-1381.
- [4] Galinier A, Haiech J, Kilhoffer MC. The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in catabolite repression. *Proc*

*Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 8439-8444.

- [5] Kraus A, Hueck C, Gartner D. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *xyl* operon involves a cis element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. *J Bacteriol*, 1994, 176: 1738-1745.
- [6] Brückner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 209: 141-148.
- [7] Grundy FJ, Waters DA, Allen SH. Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J Bacteriol*, 1993, 175(22): 7348-7355.
- [8] Kim H, Roux A, Sonenshein AL. Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Mol Microbiol*, 2002, 45: 179-190.
- [9] Kova'rova'-Kovar K, Gehlen S, Kunze A, et al. Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production. *J Biotechnology*, 2000, 79: 39-52.
- [10] Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, 53: 509-516.
- [11] Zamboni N, Mouncey N, Sauer U. Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 2003, 5: 49-55.
- [12] Harwood CR, Cutting SM. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. 1st Ed. London: Wiley-Interscience Publication, 1990.
- [13] 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.
- [14] 杜连祥. 工业微生物学实验技术. 第一版. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [15] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 (第二部). 北京: 化学工业出版社, 1995: 818.

## Knockout of the *ccpA* gene in *Bacillus subtilis* and influence on riboflavin production

YING Ming , BAN Rui\*

( School of Chemical Engineering and Technology , Tianjin University , Tianjin 300072 , China )

**Abstract :** *Bacillus subtilis* uses glucose as preferred source of carbon and energy , but expression of many genes involved in central pathways is often repressed or activated in the presence of glucose. This phenomenon is called carbon catabolite repression ( CCR ) in *B. subtilis* , which is mainly mediated by the global regulator CcpA encoded by *ccpA* gene. In the present of glucose , the genes encoding glycolytic enzymes are induced ; the genes responsible for the production of acetate from pyruvate are induced also , however , the genes required for Krebs cycle are repressed. Sometimes , this leads to lower production in fed-batch fermentation. In this study , *ccpA* gene of the riboflavin producing strain *B. subtilis*24/pMX45 was disrupted using homologous recombination technology and a *ccpA* mutant *B. subtilis*24A1/pMX45 was constructed. The comparison of shake-flask fermentation indicates *B. subtilis*24A1/pMX45 could grow normally in culture medium containing excess glucose ; and the ratio of glucose consumption increased remarkably , for example , 10% glucose can be consumed within 70 hours , biomass increased to  $1.5 \times 10^9$  cell/mL ; at the same time the accumulation amount of overflow metabolite decreases. Especially , when fermenting with culture medium containing 8% and 10% glucose respectively , the yields of riboflavin increase 62% and 95% than *B. subtilis*24/pMX45. These results demonstrate knockout of *ccpA* gene can relieve carbon catabolite repression and lead to the alteration of central catabolite flux in favor of synthesis of riboflavin , so the yield of riboflavin can be enhanced significantly.

**Keywords :** Riboflavin carbon catabolite repression ; Global regulator CcpA ; *Bacillus subtilis*

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-22-27409493 ; E-mail banrui@eyou.com