

北京棒杆菌芳香族氨基酸转运蛋白基因敲除对 L-色氨酸积累的影响

马温华^{1,2}, 赵智¹, 王宇¹, 张英姿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】为了减少北京棒杆菌 PD-67 (*Corynebacterium pекinense* PD-67) 从细胞外吸收色氨酸, 降低细胞内色氨酸库的浓度, 从而使色氨酸的反馈控制作用减弱, 增加胞外 L-色氨酸的积累量, 构建北京棒杆菌 PD-67 的芳香族氨基酸转运蛋白基因 *aroP* 敲除的菌株, 研究 *aroP* 基因敲除对菌株 L-色氨酸积累的影响。并进一步研究在 *aroP* 敲除菌株中表达邻氨基苯甲酸合成酶 (AS) 基因对 L-色氨酸积累的影响。【方法】运用 PCR 技术扩增 *aroP* 基因, 与整合质粒连接后, 用限制性内切酶法构建带有内部片段缺失的 *aroP* 基因的敲除载体。利用同源重组技术, 敲除北京棒杆菌 PD-67 的 *aroP* 基因, 构建菌株 PD-67 Δ *aroP*, 并用带有 *aroP* 基因的表达载体对 PD-67 Δ *aroP* 进行互补验证。采用 PCR 技术扩增 AS 基因, 与表达载体连接构建重组质粒。将重组质粒转入菌株 PD-67 Δ *aroP*, 构建工程菌株 PD-67 Δ *aroP*/pXAS。通过摇瓶发酵研究 PD-67 Δ *aroP* 和 PD-67 Δ *aroP*/pXAS 的发酵特性。【结果】经 PCR 验证获得了 *aroP* 基因缺陷的菌株。摇瓶发酵结果表明, 与出发菌株相比, PD-67 Δ *aroP* 的 L-色氨酸的积累量提高了 65%。酶活分析结果表明, AS 基因在菌株 PD-67 Δ *aroP* 中得到表达。AS 基因表达使工程菌单位菌体产酸率提高了 25.6%。【结论】北京棒杆菌 PD-67 中芳香族氨基酸转运蛋白基因 *aroP* 的敲除能够提高胞外 L-色氨酸的积累量。在 *aroP* 基因敲除菌中表达 AS 基因, 可以进一步提高工程菌的产酸率。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 转运蛋白, 基因敲除, L-色氨酸

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 11-1344-08

L-色氨酸是一种重要的芳香族氨基酸, 在医药、食品和饲料等方面具有广泛的应用^[1], 市场需求量很大。为了提高 L-色氨酸的产量, 已对色氨酸的生物合成途径和代谢调节等方面开展了大量研究, 并取得了一定的进展^[2-5]。然而色氨酸的合成途径较长, 调控复杂, 通过代谢工程的手段去除所有的调节控制尚有一定难度。以糖为碳源的发酵中, 色氨酸

的糖酸转化率比其他的氨基酸低得多^[6]。

除了合成途径和代谢调节之外, 对于氨基酸生产菌的转运系统的研究也很重要^[7]。通过改造氨基酸的转运系统, 降低细胞内氨基酸库的浓度, 从而使反馈抑制和反馈阻遏作用减弱, 是提高氨基酸产量的另一重要策略。减少细胞内氨基酸库浓度可以通过增加氨基酸的分泌来达到, 谷氨酸棒杆菌中的

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

作者简介: 马温华 (1987-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: mawenhua052@126.com

收稿日期: 2012-05-09; 修回日期: 2012-06-27

L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸的分泌系统已经得到鉴定^[8-10], 但是至今还没有发现 L-色氨酸的分泌系统。细胞内氨基酸库的浓度与吸收系统也有很大关系, 因此减弱氨基酸的吸收功能, 也是改善色氨酸生产菌株的重要方法。1995 年, Wehrmann 等人鉴定了第一个谷氨酸棒杆菌中芳香族氨基酸共同的吸收系统 *aroP*^[11]。这也是目前为止谷氨酸棒杆菌中发现的唯一的色氨酸吸收系统。此后, 关于谷氨酸棒杆菌中色氨酸转运蛋白的研究一直鲜有报道, 国内在此方面的研究尚属空白。

北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) PD-67 是具有一定 L-色氨酸积累能力的突变株, 我们已经

对其色氨酸合成途径中邻氨基苯甲酸合成酶^[12]、DAHP 合成酶^[13], 回补途径中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶^[14], 以及非氧化磷酸戊糖途径中的转酮酶^[15]进行了研究。本工作以芳香族氨基酸转运蛋白的基因 *aroP* 为靶点, 研究转运蛋白基因的敲除对 PD-67 产色氨酸的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 表 1 为本实验所用菌株和质粒。

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> DH5 α	ϕ 80 LacZ Δ M15, <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>aroP</i>	<i>C. pekinense</i> PD-67 with <i>aroP</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 ^[16]
pT- <i>aroP</i>	pMD19-T containing 1.4 kb PCR fragment of PD-67 <i>aroP</i> gene	This study
pT-KaroP	pMD19-T containing 2.2 kb PCR fragment of PD-67 <i>aroP</i> gene	This study
pT-AS	pMD19-T containing 2.2 kb PCR fragment of PD-67 AS gene	This study
pK18- Δ <i>aroP</i>	pK18 <i>mobsacB</i> containing <i>aroP</i> in-frame deletion fragment Δ <i>aroP</i> from PD-67	This study
pXMJ19	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector; Cam ^R Ptac lacI ⁿ pBL1 <i>oriV_{Cg}</i> pK18 <i>oriV_{Ec}</i>	Jakoby M ^[17]
pXAROP	pXMJ19 containing 1.4 kb PCR fragment of PD-67 <i>aroP</i> gene, to generate <i>aroP</i> expression or complementation for Δ <i>aroP</i>	This study
pXAS	pXMJ19 containing 2.2 kb PCR fragment of PD-67 AS gene, to generate <i>as</i> gene intracellular expression	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; 分支酸购自 Sigma 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-450 型基因扩增仪; BIO-RAD MicroPulserTM 电击仪; Unico 7200 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: ① LB 培养基用于培养大肠杆菌 (*Escherichia coli*); ② LB 培养基加入 1% 葡萄糖和 0.2% 的尿素用于培养 *C. pekinense*; ③ LB 培养基加入 1% 葡萄糖、0.2% 的尿素和 4% 甘氨酸用于制备电击转化用 *C. pekinense* 细胞; ④ LB 培养基加入 10% 的蔗糖作为第二次重组的筛选培养基; ⑤

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, (NH₄)₂SO₄ 10 g, KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 7 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g, FeSO₄ · 7H₂O 20 mg, MnSO₄ · H₂O 20 mg, NaCl 10 g, 酵母粉 5 g, 生物素 50 μ g, 硫胺素 200 μ g, pH7.2。⑥ 发酵培养基 I: 每升含葡萄糖 80 g, 酵母粉 1 g, (NH₄)₂SO₄ 40 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 μ g, 硫胺素 200 μ g, CaCO₃ 30 g, pH7.2。⑦ 发酵培养基 II: 在发酵培养基 I 的基础上加入 10 g/L 莽草酸。若要制备固体培养基, 按 1.2% 的量加入琼脂粉。 *E. coli* 在 37 $^{\circ}$ C 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, 氯霉素 10 μg/mL。

1.2 DNA 操作

E. coli 质粒提取参照文献 [18], *E. coli* 转化采用 CaCl₂ 法, *C. pekinense* 转化采用电击转化法 [19]。

1.3 *aroP* 及构建敲除载体的片段的 PCR 扩增

根据同源性, 参照 *C. glutamicum* ATCC13032 的 *aroP* (*ncgl1062*) 基因及其上下游, 设计三对引物用于扩增 *C. pekinense* PD-67*aroP* (*ncgl1062*) 结构基因和敲除用的片段以及进行 *aroP* 基因敲除菌株的验证。

表 2 实验所用引物序列

Table 2 Primers for gene amplification and disruption

Primers	Sequences (5'→3')	Size / bp	Restriction site
P1	CGCTCTAGAAAGGAGGACAACCATGGCTAAATCTAATGAAGGGC	44	<i>Xba</i> I
P2	GTAGAGCTCCGGCCTATCAGTTCAAAGT	27	<i>Sac</i> I
P3	AATGCATGCTGAGTTCGGGTGTGGT	25	<i>Sph</i> I
P4	ATACCCGGGAACCACATAGTCGACCAT	27	<i>Sma</i> I
P5	AGCGTGCCAGCGTTGAAGTT	20	
P6	GCTGCGTGAAGGTTTCGTGT	20	
P7	GTTGTCGACTCTAGAAAGGAGGACAACCATGAGCAGGAATCCCCAT	46	<i>Sal</i> I <i>Xba</i> I
P8	CACGGATCCCCGGGTTATTATTAGTTCGCGAGAAGCTGTT	41	<i>Bam</i> H I, <i>Sma</i> I

Underlined bases indicate restriction sites; bold bases indicate Shine-Dalgarno sequence.

引物 P1 和 P2 用于扩增 *aroP* 结构基因, 引物 P3 和 P4 用于扩增构建敲除载体所用的片段, 引物 P5 和 P6 是根据引物 P3 和 P4 所对应序列的外侧序列设计的, 用于进行 *aroP* 基因敲除菌株的 PCR 验证。引物 P7 和 P8 用于扩增邻氨基苯甲酸合成酶 (AS) 的结构基因。

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: 扩增 *aroP* 结构基因, 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增敲除载体用的片段, 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min 20 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 验证 *aroP* 基因敲除, 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增 AS 结构基因, 98℃ 4 min; 98℃ 10 s, 68℃ 2 min 20 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。反应完毕后, 体系加入 0.5 μL EasyTaq 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 粗酶液制备: 将 PD-67Δ*aroP*/pXMJ19 和 PD-

67Δ*aroP*/pXAS 接种于测酶活化基本培养基, 培养 12 h 后添加 IPTG 至 1 mmol/L 诱导表达, 2 h 后离心收集菌体。用 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗涤两次, 悬浮, 置冰浴中超声波破碎细胞, 离心, 上清液用于酶活测定。

1.4.2 邻氨基苯甲酸合成酶活性测定: 参考文献 [12]。

1.5 发酵实验

1.5.1 摇瓶发酵: 将 *C. pekinense* PD-67, *C. pekinense* PD-67-Δ*aroP* 和 *C. pekinense* PD-67-Δ*aroP*/pXAROP 分别接种于培养基⑤中, 在摇床培养 20 h 后, 按照 10% 的接种量接种于发酵培养基 I 中。于摇床培养, 每隔 12 h 取样分析。

PD-67Δ*aroP*/pXMJ19 和 PD-67Δ*aroP*/pXAS 用发酵培养基 II 培养, 其余操作相同。

1.5.2 生物量的测定: 发酵液用适量 2 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 L-色氨酸的测定: 发酵液经 12000 r/min 离心 5 min 后, 取上清, 稀释适当倍数, 用 0.22 μm 微孔膜过滤后, 采用高效液相色谱仪 Agilent 1200 测定色氨酸 [20]。

2 结果和分析

2.1 *aroP* 基因克隆和序列同源性

以北京棒杆菌 PD-67 染色体 DNA 为模板, 用引物 P1 和 P2, 经 PCR 扩增得到一条约 1.4 kb 的片段。纯化后连接 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *aroP* 基因的重组子, 重组质粒命名 pT-*aroP*。插入片段经测序分析, 长度为 1430 bp, 包含一个长度为 1392 bp 的 ORF, 起始密码子为 ATG, 编码一条 463 个氨基酸的多肽链。PD-67 和 ATCC13032 中 *aroP* 基因编码区比对: 核酸序列同源性为 99.93%, 有 1 个碱基突变; 氨基酸序列同源性为 99.78%, 有一个氨基酸突变: Thr335Ile。

用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切质粒 pT-*aroP*, 回收 *aroP* 片段。同时用 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切表达载体 pXMJ19, 回收大片段, 与上述 *aroP* 片段连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在含有氯霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *aroP* 基因的表达载体, 命名为 pXAROP。

2.2 *aroP* 敲除载体的构建

以北京棒杆菌 PD-67 染色体 DNA 为模板, 用引物 P3 和 P4, 经 PCR 扩增得到一条约 2.2 kb 的片段。纯化后连接 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *aroP* 基因的重组子, 重组质粒命名 pT-K Δ *aroP*。用 *Sph*I 和 *Sma*I 双酶切 pT-K Δ *aroP*, 回收含有 *aroP* 基因的片段。同时用 *Sph*I 和 *Sma*I 双酶切质粒 pK18*mobsacB*, 回收大片段, 与上述 *aroP* 片段连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上, 筛选阳性克隆; *aroP* 中有两个 *Sca* I 酶切位点, 用 *Sca* I 酶切 pK18-*aroP*, 回收大片段, 自连, 转化 *E. coli* DH5 α , 得到敲除载体 pK18- Δ *aroP*, 用于 *aroP* 基因敲除。

2.3 *aroP* 基因敲除菌株的筛选与验证

将敲除载体 pK18- Δ *aroP* 经电击转化 PD-67 后, 涂布于含有卡那霉素的②号培养基的平板上, 筛选重组子。pK18- Δ *aroP* 在 PD-67 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- Δ *aroP* 与染色体 DNA 已经完成第一次同源重组, 载体 DNA 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含 10% 蔗糖的②号培养基

的平板上, 进行第二次筛选。在该培养基上, *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的转化子方可存活, 这类转化子同时失去卡那霉素抗性。

为了验证 PD-67 Δ *aroP* 染色体上的 *aroP* 基因已被敲除, 分别以 PD-67 和 PD-67 Δ *aroP* 染色体 DNA 为模板, 用引物 P5 和 P6 进行 PCR 扩增, 对得到的 PCR 产物进行凝胶电泳。从 PD-67 Δ *aroP* 扩增得到的 PCR 产物长度比从出发菌株 PD-67 得到的小 600bp 左右 (图 1), 与预期结果一致。

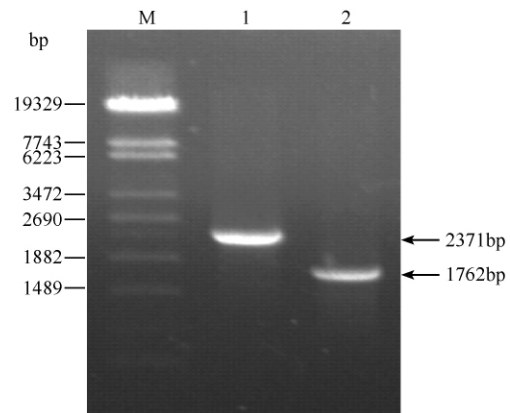


图 1 *aroP* 基因敲除菌株的 PCR 鉴定

Fig. 1 Characterization of defined *aroP* knock-out mutant by PCR analysis. M. DNA marker (λ -*Eco*T14 I digested DNA); 1. PCR fragment of *aroP* of PD-67; 2. PCR fragment of *aroP* of PD-67 Δ *aroP*.

2.4 *aroP* 基因敲除对 PD-67 生理特性及色氨酸积累的影响

为了研究 *aroP* 基因敲除后对 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。

PD-67 Δ *aroP* 的最终生物量比 PD-67 的稍低 (图 2-A)。葡萄糖利用和 L-色氨酸积累的测定结果表明, 二者葡萄糖利用速率相差不大, PD-67 Δ *aroP* 细胞外 L-色氨酸的积累量一直高于 PD-67, 最终积累浓度为 4.27g/L, 比出发菌株提高了 65% (图 2-B)。

2.5 敲除菌株中 *aroP* 基因的互补

将 2.1 得到的表达载体 pXAROP 经电击法转入 *aroP* 基因敲除的菌株 PD-67 Δ *aroP*, 在含有氯霉素的②号培养基的平板上挑选重组子。对重组子进行质粒提取和酶切验证, 确认获得了互补菌株 PD-67 Δ *aroP*/pXAROP。

对互补菌株进行了摇瓶发酵, 结果表明, 互补菌株

中色氨酸的积累能力以及单位菌体色氨酸的积累能力均基本恢复到了出发菌株的水平(图 2-B、2-C)。说明

北京棒杆菌 PD-67 中的 *aroP* 是有功能的, PD-67 Δ *aroP* 的产酸量的提高确实是由于 *aroP* 的敲除导致的。

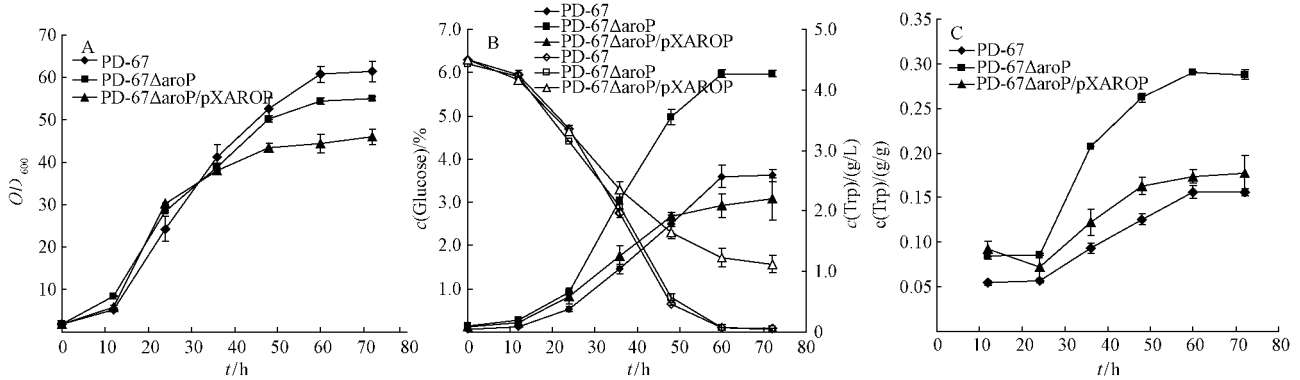


图 2 PD-67, PD-67 Δ *aroP* 和 PD-67 Δ *aroP*/pXAROP 的发酵过程

Fig. 2 Time course of PD-67, PD-67 Δ *aroP* and PD-67 Δ *aroP*/pXAROP fermentation. A: cell growth profiles; B: glucose consumption and L-tryptophan production profiles; C: Tryptophan yield on biomass.

2.6 带邻氨基苯甲酸合成酶基因的重组质粒 pXAS 构建

为了进一步研究将改造色氨酸转运系统与途径工程相结合,提高菌株 L-色氨酸积累能力的可行性,我们在 PD-67 Δ *aroP* 中表达 AS 基因。该酶是色氨酸合成途径中的第一个酶,也是关键酶,受 L-色氨酸的反馈调节。

提取 *C. pекinense* PD-67 的基因组 DNA 为模板,用引物 P7 和 P8 扩增一条约 2.2 kb 的 AS 基因的片段。回收 PCR 产物与 pMD19-T simple 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 。随机挑取阳性克隆提取质粒,经酶切鉴定后测序,插入片段序列正确,重组质粒命名为 pT-AS。用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切质粒 pT-AS,回收 AS 片段;同时用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切质粒 pXMJ19,回收大片段后与上述 AS 片段连接,转化 *E. coli* DH5 α ,得到 pXAS。提取重组质粒 pXAS,酶切电泳验证。

2.7 *C. pекinense* 重组菌的 AS 活性

将质粒 pXAS 电击转化 PD-67 Δ *aroP* 中,得到重组菌 PD-67 Δ *aroP*/pXAS。对重组菌和对照菌的 AS 活性分别进行了测定,PD-67 Δ *aroP* 的酶比活力为 32.99 U/mg, PD-67 Δ *aroP*/pXAS 的酶比活力为 99.66 U/mg,重组菌相对于宿主菌的酶活提高了 2 倍。说明 AS 基因在 PD-67 Δ *aroP* 中实现了表达。

2.8 过表达 AS 基因对重组菌生长和 L-色氨酸积累的影响

为研究 AS 活性的增加对重组菌株生长以及 L-

色氨酸积累的影响,我们用发酵培养基 II 进行了摇瓶发酵实验。

发酵中后期重组菌 PD-67 Δ *aroP*/pXAS 的生长速率低于对照菌,并且最终生物量也低于对照菌(图 3-A)。发酵后期,PD-67 Δ *aroP*/pXAS 的葡萄糖利用速率略慢于对照菌,L-色氨酸的积累速率略高于对照菌(图 3-B)。结果表明,重组菌株 PD-67 Δ *aroP*/pXAS 的单位菌体的 L-色氨酸积累量一直高于 PD-67 Δ *aroP*/pXMJ19(图 3-C),与对照菌株相比提高了 25.6%。

3 讨论

本工作用同源重组的方法将北京棒杆菌 PD-67 中与芳香族氨基酸吸收系统相关的基因 *aroP* 敲除,减小了细胞吸收 L-色氨酸的能力,发酵实验结果表明,敲除菌株中 L-色氨酸的积累量有了大幅提高。

1994 年, Ikeda 等人用诱变的方法得到一个谷氨酸棒杆菌芳香族氨基酸吸收系统受损的菌株,3 种芳香族氨基酸的吸收能力大大降低,将带有一段用鸟枪法从谷氨酸棒杆菌中获得的 6 Kb 长的 DNA 片段的质粒转入该菌株,可以增加重组菌对 3 种芳香族氨基酸的吸收活性^[21]。他们又进行了进一步研究,通过诱变得到 3 株 L-色氨酸生产菌株来源的吸收系统缺陷株,色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸的转运活性皆明显降低。在分批发酵试验中,L-色氨酸产量提高 10% - 20%^[22]。但该研究中的缺陷菌株是

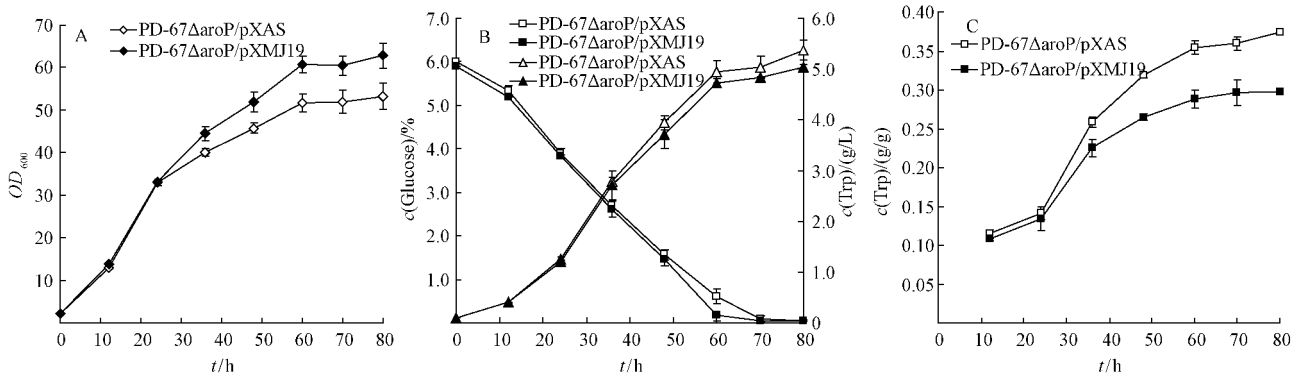


图3 PD-67ΔaroP/pXAS 和 PD-67ΔaroP/pXMJ19 的发酵过程

Fig.3 Time course of PD-67ΔaroP/pXAS and PD-67ΔaroP/pXMJ19 fermentation. A: cell growth profiles; B: glucose consumption and L-tryptophan production profiles; C: Tryptophan yield on biomass.

通过诱变的方法得到的, 诱变过程中产生的次级突变也可能影响菌体的色氨酸合成。鸟枪法所得片段除了可能带有与芳香族氨基酸吸收相关的基因以外还有其它基因存在。本研究首次以基因敲除的方法对谷氨酸棒杆菌色氨酸吸收系统定向改造, 克服了传统诱变方法的盲目性和偶然性, 以及鸟枪法所得片段上多基因带来的不确定性, 使得实验结果更加明确。本实验结果表明, 色氨酸吸收系统的定向敲除可以有效地提高 L-色氨酸的积累。阻止色氨酸的吸收是规避残余调控作用、提高 L-色氨酸产量的有效方法。该结果对工业上应用谷氨酸棒杆菌发酵生产 L-色氨酸具有重要的指导意义。

已经发现的大肠杆菌中与芳香族氨基酸吸收系统相关的基因有 5 个, 分别是 *mtr*、*tnaB*、*aroP*、*tyrP* 和 *pheP*, 其中色氨酸吸收系统的基因有 3 个, *mtr*、*tnaB* 和 *aroP*。赵志军等人通过对这 3 个基因分别进行单敲除, 证明 *mtr* 对大肠杆菌中 L-色氨酸的吸收以及产量的影响是最大的^[23]。他们又构建了 *mtr*、*tnaB* 和 *mtr*、*aroP* 双基因敲除菌以及 *mtr*、*tnaB*、*aroP* 三基因敲除菌株, 其中 *mtr*、*tnaB* 双基因缺失对 L-色氨酸的产量贡献最大, *mtr*、*tnaB*、*aroP* 三基因缺失后菌株的生长明显受到抑制, 因而 L-色氨酸的产量下降^[24]。目前, 谷氨酸棒杆菌中已经发现的芳香族氨基酸吸收系统的基因有两个: *aroP*^[11] 和 *pheP*^[25], 与色氨酸吸收系统相关的基因只有 *aroP*。Ikeda 预测在谷氨酸棒杆菌中可能存在一个低亲和力的转运蛋白 NCgl0464, 该基因产物与大肠杆菌的 TyrP 具有 26% 的同源性^[6]。但本实验室的研究表明, 该基因编码的蛋白主要具有转运 γ -氨基

丁酸的功能^[26], 其对色氨酸的转运能力, 本实验室也正在研究中。但是, 至今尚未在微生物中发现芳香族氨基酸的外运载体系统。可以预计, 随着对谷氨酸棒杆菌 L-色氨酸转运系统研究的不断深入, 可能会发现其他的 L-色氨酸转运系统。

对谷氨酸棒杆菌产 L-色氨酸菌株进行代谢工程改造已经有一些报道, 通过对多个靶点进行遗传修饰, 使菌株的产酸性能有了显著改善^[27-28]。本工作结果表明, 将对代谢途径进行理性改造与对转运系统进行改造相结合, 可以更好地改善菌株的产酸性能。

参考文献

- [1] Kocabaş P, Çalik P, Özdamar T H. Fermentation characteristics of L-tryptophan production by thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* in a defined medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39 (5) :1077-1088.
- [2] Ikeda M, Nakanishi K, Kino K, Katsumata R. Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58 (4) : 674-678.
- [3] Kamada N, Yasuhara A, Takano Y, Nakano T, Ikeda M. Effect of transketolase modifications on carbon flow to the purine-nucleotide pathway in *Corynebacterium ammoniagenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56 (5-6) :710-717.
- [4] Tatarko M, Romeo T. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine

- biosynthesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 2001, 43 (1) :26-32.
- [5] Peters-Wendisch P, Netzer R, Eggeling L, Sahm H. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60 (4) :437-441.
- [6] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69 (6) : 615-626.
- [7] Marin K, Krämer R. Amino acid transport systems in biotechnologically relevant bacteria. *Microbiology Monographs*, 2007, 5:289-325.
- [8] Krämer R. Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 1994, 162 (1-2) :1-13.
- [9] Krämer R, Boles E, Eggeling L, Erdmann A, Gutmann M, Kronmeyer W, Palmieri L, Zittrich S. Mechanism and energetics of amino-acid transport in coryneform bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1187 (2) :245-249.
- [10] Eggeling L, Sahm H. The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92 (3) : 201-213.
- [11] Wehrmann A, Morakkabati S, Kramer R, Sahm H, Eggeling L. Functional analysis of sequences adjacent to *dapE* of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of *aroP*, which encodes aromatic amino acid transporter. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (20) :5991-5993.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 陆敏涛, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 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. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2010, 50 (10) :1334-1340.
- [15] 季维克, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 北京棒杆菌转酮酶: 基因克隆、序列分析与表达. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2010, 50 (11) :1474-1480.
- [16] 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.
- [17] Jakoby M, Nguoto-Nkili C-E, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13 (6) :437-441.
- [18] 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.
- [19] Jang KH, Britz ML. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 539-545.
- [20] 杨昭鹏, 吕英英, 廖海明, 徐康森. 多波长 RP-HPLC 法测定复方氨基酸注射液芳香族氨基酸的含量. 药物分析杂志 (*Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*), 2003, 23 (6) :473-474.
- [21] Ikeda M, Katsumata R. Transport of aromatic amino acid and its influence on overproduction of the amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, 78 (6) : 420-425.
- [22] Ikeda M, Katsumata R. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59 (8) :1600-1602.
- [23] Zhao ZJ, Chen S, Wu D, Wu J, Chen J. Effect of gene knockouts of L-tryptophan uptake system on the production of L-tryptophan in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 2010, doi: 10.1016/j.procbio.2011.11.009.
- [24] 赵志军, 陈晟, 吴丹, 吴敬, 陈坚. 大肠杆菌色氨酸转运系统多基因敲除对色氨酸生产的影响. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2011, 27 (12) : 1765-1772.
- [25] Zhao Z, Ding JY, Li T, Zhou NY, Liu SJ. The *ncgl1108* (*PheP_{cg}*) gene encodes a new L-Phe transporter in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90 (6) :2005-2013.
- [26] Zhao Z, Ding JY, Ma WH, Zhou NY, Liu SJ. Identification and characterization of γ -aminobutyric acid uptake system *GabP_{cg}* (*NCgl0464*) in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environment Microbiology*, 2012, 78 (8) :2596-2601.

- [27] Katsumata R, Ikeda M. Hyperproduction of tryptophan in *Corynebacterium glutamicum* by pathway engineering. *Nature Biotechnology*, 1993, 11 (8) : 921-925.
- [28] Ikeda M, Katsumata R. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (6) : 2497-2502.

Effect of aromatic amino acid transport gene knock-out on L-tryptophan accumulation in *Corynebacterium pekinense* PD-67

Wenhua Ma^{1,2}, Zhi Zhao¹, Yu Wang¹, Yingzi Zhang¹, 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] A *Corynebacterium pekinense* PD-67 mutant with aromatic amino acid transport system gene (*aroP*) in-frame deletion was constructed to decrease the uptake of L-tryptophan and reduce the intracellular pool of L-tryptophan, further to deregulate the feedback regulation of L-tryptophan and increase the extracellular accumulation. The effects of *aroP* knock-out as well as anthranilate synthetase (EC4.1.3.27; AS) gene overexpression on L-tryptophan accumulation of the mutant were investigated. [Methods] The *aroP* gene was cloned from *C. pekinense* PD-67 chromosome and ligated to integration vector, and then deleted about 600bp fragment by restriction endonuclease digestion. The mutant *C. pekinense* PD-67- Δ *aroP* was screened by homologous recombination. The mutant phenotype can be reversed by complementation with *aroP* gene from the expression vector. AS gene was cloned and ligated to expression vector to construct a recombinant plasmid. The plasmid was transformed into PD-67 Δ *aroP* to generate the engineering strain PD-67 Δ *aroP*/pXAS. The fermentation characteristics of the mutant and the engineering strain were investigated. [Results] The *aroP* gene in-frame deletion was screened and confirmed by PCR analysis and the AS gene expression was confirmed by determination of enzyme activity. The *aroP* knock-out resulted in increase of L-tryptophan accumulation by 65% compared with that of the parent strain, while the expression of AS gene resulted in increase of L-tryptophan yield on cell mass by 25.6% in engineered strain. [Conclusion] The *aroP* gene knock-out of the strain PD-67 improved L-tryptophan accumulation. The expression of AS gene could further improve L-tryptophan yield on cell mass in engineered strain.

Keywords: *Corynebacterium pekinense*, transport system, gene knock-out, L-tryptophan

(本文责编:王晋芳)

* Corresponding author. Tel /Fax: +86-40-64807303; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

Received: 9 May 2012 / Revised: 27 June 2012