

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (1) :24 - 32; 4 January 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.004

## 过表达 *pps* 基因和 *aroG<sup>fbr</sup>* 基因对北京棒杆菌 L-色氨酸合成的影响

臧传刚<sup>1,2</sup>, 赵智<sup>1</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 张英姿<sup>1</sup>, 丁久元<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>2</sup> 中国科学院大学研究生院, 北京 100049

**摘要:** 【目的】通过增加北京棒杆菌 (*Corynebacterium pectinense*) PD-67 芳香族氨基酸合成的前体物质磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的供应, 解除终产物对芳香族氨基酸合成途径中第一个酶同时也是关键酶 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶 (DS) 的反馈抑制并提高抗反馈抑制的 DS 的活力, 使碳流更多地流向芳香族氨基酸合成途径, 从而积累更多 L-色氨酸。【方法】运用 PCR 技术扩增北京棒杆菌 PD-67 磷酸烯醇式丙酮酸合酶基因 *pps*, 与表达载体连接构建重组质粒 pXPS; 运用重叠 PCR 技术定点突变大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 受苯丙氨酸调控的 DS 基因 *aroG*, 使相应的编码氨基酸序列发生突变: Leu175Asp, 新的基因命名为 *aroG<sup>fbr</sup>*, 与表达载体连接构建重组质粒 pXA; 构建 *pps* 和 *aroG<sup>fbr</sup>* 的共表达重组质粒 pXAPS。将 3 个重组质粒分别转入菌株 PD-67, 构建工程菌株 PD-67/pXPS、PD-67/pXA 和 PD-67/pXAPS。通过摇瓶发酵研究工程菌株的发酵特性。【结果】酶活分析结果表明, *pps* 基因和 *aroG<sup>fbr</sup>* 基因在北京棒杆菌 PD-67 中均实现了表达。工程菌株 PD-67/pXA 粗酶液 DS 抗反馈抑制分析表明, AroG<sup>fbr</sup> 已解除酪氨酸和苯丙氨酸的反馈抑制。过表达 *pps* 基因和 *aroG<sup>fbr</sup>* 基因分别使工程菌 L-色氨酸产量提高 12.1% 和 26.8%, 双基因共表达可使工程菌的产酸量提高 35.9%。【结论】北京棒杆菌 PD-67 *pps* 基因的过表达以及大肠杆菌来源的解除反馈抑制的 *aroG<sup>fbr</sup>* 的过表达均有助于增加 PD-67 L-色氨酸的合成, 而双基因的共表达可以进一步提高 L-色氨酸的积累量。

**关键词:** 北京棒杆菌, 磷酸烯醇式丙酮酸合酶, 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶, 反馈抑制, 过表达, L-色氨酸

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 01-0024-09

L-色氨酸是人体必需的芳香族氨基酸, 由于其在食品、饲料和医药等领域都具有重要的应用价值<sup>[1]</sup>, 关于 L-色氨酸的微生物代谢调控和对生产菌株改造的研究一直受到广泛关注<sup>[2-4]</sup>。在微生物中, 芳香族氨基酸合成的共同途径莽草酸途径起始于 DAHP 合酶 (EC2.5.1.54, 3-deoxy-D-arabino-

heptulosonate-7-phosphate synthase, DS) 催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 之间的醛缩反应生成 DAHP, 而后再经过 6 步反应生成分支酸, 在分支酸处产生分支, 最终合成 3 种不同的芳香族氨基酸<sup>[2]</sup>。解除合成途径中关键酶的反馈抑制以及过表达重要的限速酶, 均能提高 L-色氨酸的产

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

作者简介: 臧传刚 (1987 -), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: windboy86@163.com

收稿日期: 2013-05-02; 修回日期: 2013-06-09

量,但与其他氨基酸相比,糖酸转化率相对较低<sup>[2]</sup>。

在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中,碳流在 PEP 节点处被多个反应竞争而分流<sup>[5]</sup>: 磷酸转移酶系统在转运葡萄糖的过程中,PEP 常被用来作为磷酸基团的供体;另外,PEP 也可以被丙酮酸激酶催化转变成丙酮酸或者被磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化转变成草酰乙酸。由于 PEP 被催化变成丙酮酸的过程是一个放能的过程,因此被消耗的 PEP 很难被回复。从而限制了一部分碳流进入芳香族氨基酸合成途径。过表达磷酸烯醇式丙酮酸合酶基因 *pps*,有可能使碳流从丙酮酸回流到 PEP 节点,从而为芳香族氨基酸的合成提供更多的前体物质。在大肠杆菌中表达 *pps* 基因可以提高 DAHP 的产量<sup>[6]</sup>。除了 PEP 节点之外,整个芳香族氨基酸合成的起始点 DAHP 以及与该物质的合成直接相关的酶 DS 对于终产物色氨酸的积累也至关重要。DS 是芳香族氨基酸合成途径的第一个酶,也是该途径的关键酶。谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中该酶的类型和调节方式有明显的差异。谷氨酸棒杆菌的 DAHP 合酶有 I 型和 II 型两种类型,分别受到酪氨酸和苯丙氨酸的单独反馈抑制或者协同反馈抑制<sup>[2]</sup>。谷氨酸棒杆菌酪氨酸敏感型 DS 多肽链中的第 187 位丝氨酸残基是一个重要的别构调节位点,对该位点的突变虽然可以解除酪氨酸对 DS 的反馈抑制,但是同时酶的催化活力也降低了<sup>[7]</sup>。

而其它关于谷氨酸棒杆菌 DS 别构调节位点的研究以及通过对该酶理性改造解除反馈抑制的研究未见有文献报道。在大肠杆菌中存在 3 种 DAHP 合酶的同工酶:AroF、AroG 和 AroH,分别受到酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的单独反馈抑制调节<sup>[8]</sup>,调节方式相对比较简单。其中,在胞内发挥主要作用的为 AroG (大约占总酶活性 80%),氨基酸序列 Leu175 突变为 Asp 之后,AroG<sup>br</sup>可以解除苯丙氨酸的反馈抑制而且基本不影响酶的催化活力<sup>[9]</sup>,这样 AroG<sup>br</sup>在细胞内将不再受到 3 种芳香族氨基酸终产物的反馈抑制,进入芳香族氨基酸合成途径的碳代谢流在 DAHP 这一关键节点将不再受阻,有可能使得更多的碳流进入色氨酸合成支路,提高 L-色氨酸的积累量和转化率。

北京棒杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) PD-67 是能够积累 L-色氨酸的突变株。本工作以磷酸烯醇式丙酮酸合酶基因 *pps* 和大肠杆菌来源的抗反馈抑制调节 *aroG<sup>br</sup>* 基因为靶点,研究过表达这两个基因对 PD-67 色氨酸合成代谢的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**表 1 为本实验所用的菌株和质粒。

表 1. 实验所用的菌株和质粒

Table 1. The strains and plasmids used in this study

strains or plasmids	characteristics	source
strains		
<i>E. coli</i> W3110	Wild type	stored in this lab
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 LacZ $\Delta$ 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<sup>-</sup> tyr<sup>s</sup></i>	this lab
plasmids		
pMD19-T	T-vector, 2.7kb, Amp <sup>R</sup> , lacZ	TaKaRa Co
pT-pps	same as pMD19-T but <i>pps<sup>+</sup></i>	this study
pT-aroG <sup>br</sup>	as pMD19-T but <i>aroG<sup>br+</sup></i>	this study
pXMJ19	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vctor; Cam <sup>R</sup> P <sub>lac</sub> lacI <sup>q</sup> pBL1 <i>oriV<sub>Cg</sub></i> pK18 <i>oriV<sub>Ec</sub></i>	Jackoby M <sup>[10]</sup>
pXPS	as pXMJ19 but <i>pps<sup>+</sup></i>	this study
pXA	as pXMJ19 but <i>aroG<sup>br+</sup></i>	this study
pXAPS	as pXMJ19 but <i>aroG<sup>br+</sup>, pps<sup>+</sup></i>	this study

*phe<sup>-</sup>*: no cell growth without phenylalanine addition in minimal medium, *tyr<sup>s</sup>*: meager cell growth without tyrosine addition in minimal medium.

**1.1.2 主要试剂:**所有分子生物学工具酶均购自 TaKaRa 公司;磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P)购自 Sigma 公司;丙酮酸钠购自

Ameresco 公司;ATP 购自 Bio Basic Inc 公司;其余生化药品为进口或国产分析纯试剂。

**1.1.3 培养基和培养条件:**①LB 培养基用于培养

*E. coli*; ②LB 培养基加入 1% 葡萄糖和 0.2% 的尿素用于培养 *C. pekinense*; ③LB 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* 感受态细胞; ④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,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  7 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20 mg, NaCl 10 g, 酵母粉 5 g, 生物素 50  $\mu\text{g}$ , 硫酸素 200  $\mu\text{g}$ , pH 7.2; ⑤发酵培养基: 每升含葡萄糖 80 g, 酵母粉 1 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20 mg, 生物素 50  $\mu\text{g}$ , 硫酸素 200  $\mu\text{g}$ , 酪氨酸 50 mg, 苯丙氨酸 50 mg, 精氨酸 600 mg, 丝氨酸 100 mg,  $\text{CaCO}_3$  30 g, pH 7.2。制备固体培养基时, 按 1.2% 的量加入琼脂粉。*E. coli* 在 37°C 培养, *C. pekinense* 在 30°C 培养。抗生素使用浓度为: 氨苄青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 氯霉素 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 1.2 DNA 操作

*E. coli* 质粒提取参照文献 [11], *E. coli* 转化采用  $\text{CaCl}_2$  法, *C. pekinense* 转化采用电击转化法 [12]。

## 1.3 *pps* 基因和 *aroG<sup>fbr</sup>* 基因的克隆

根据同源性, 参照 *C. glutamicum* ATCC13032 的

*pps* (*ncgl0529*) 基因及其上下游序列, 设计 1 对引物: P1 和 P2。以 *C. pekinense* PD-67 染色体 DNA 为模板, 用引物 P1 和 P2, 经 PCR 扩增得到含有 *pps* 基因的片段, 纯化后连接 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *pps* 基因的重组子, 重组质粒命名为 pT-*pps*。

在 *E. coli* AroG 多肽链的 N 端和内部区域存在 DS 的反馈抑制位点 [9], 多肽链的第 175 位 Leu 突变为 Asp 后, 可以部分解除 Phe 的反馈抑制作用而且基本不影响酶的催化活力。参照 *E. coli* W3110 的 *aroG* 的基因及其上下游序列, 设计两对引物: P3, P4 和 P5, P6。以 *E. coli* W3110 的染色体 DNA 为模版, 用引物 P3、P4、P5 和 P6, 经重叠 PCR 的方法对野生型基因引入点突变。扩增片段纯化后连接 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *aroG<sup>fbr</sup>* 基因的重组子, 重组质粒命名为 pT-*aroG<sup>fbr</sup>*。

实验所用引物见表 2, 引物设计采用软件 Primer premier 5.0, 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成, PCR 扩增片段的序列测定由华大基因科技服务有限公司完成。

表 2. 实验所用引物

Table 2. Primers used in this study

primers	sequences (5' → 3')	size/bp	restriction site
P1	GTCGCTACCA <u>AAAGGAGG</u> ACAACCATGACCAACAGTTTGAAC	41	<i>Kpn</i> I
P2	GTCGAGCTCCCTTTTAGATGCTTTTCGAC	29	<i>Sac</i> I
P3	GCGAAGCTTAAAGGAGGACAACCATGAATTATCAGAACGACG	42	<i>Hind</i> III
P4	AGCCCTGATGC <u>ATC</u> TTCGCGGTGCAC	26	
P5	GTGCACCGCGAA <u>GAT</u> GCATCAGGGCT	26	
P6	TGATCTAGATTACCCGCGACGCGCTTTTACTGC	33	<i>Xba</i> I

Underlined bases indicate restriction sites; bold bases indicate Shine-Dalgarno sequence; framed bases indicate site-directed mutagenesis sequence.

## 1.4 酶活分析

**1.4.1 粗酶液制备:** 将菌株 PD-67/pXMJ19、PD-67/pXPS、PD-67/pXA 和 PD-67/pXAPS 接种于测酶活基本培养基, 培养 12 h 后添加 IPTG 至 1 mmol/L 诱导表达, 4 h 后离心收集菌体。用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 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 磷酸烯醇式丙酮酸合酶 (PPS) 活性测定:** 参考文献 [13] 测定。一个单位磷酸烯醇式丙酮酸合酶活力定义为: 反应体系中每分钟催化消耗 1 nmol 丙酮酸钠所需要的酶量。

**1.4.3 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶 (DS) 活性测定:** 参考文献 [14] 测定。一个单位 DS 活力定义为: 反应体系中每分钟催化生成 1 nmol DAHP 所需要的酶量。

**1.4.4 AroG<sup>fbr</sup> 抗反馈抑制分析:** 在 DS 酶活测定的反应体系中分别加入不同浓度 (0–4 mmol/L) 的 3 种芳香族氨基酸 (Tyr、Phe 和 Trp), 在不同浓度的芳香族氨基酸存在条件下, 测定菌株 PD-67/pXMJ19 和 PD-67/pXA 的粗酶液中 DS 活性。

**1.4.5 粗酶液中蛋白含量的测定:** 采用考马斯亮蓝法 [15] 测定。

## 1.5 发酵实验

**1.5.1 摇瓶发酵:** 将 PD-67/pXMJ19、PD-67/pXPS、PD-67/pXA 和 PD-67/pXAPS 分别接种于培养基④中, 30℃培养20 h后, 按照 10% 的接种量分别接种于发酵培养基⑤中。于 30℃摇床培养, 每隔12 h取样分析。

**1.5.2 生物量的测定:** 发酵液用适量2 mmol/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-色氨酸和副产物氨基酸的测定:** 发酵液经 12000 × g 离心10 min后, 取上清, 稀释适当倍数, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 采用高效液相色谱仪 Agilent 1200 进行分析。

L-色氨酸分析条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18; 流动相: MeOH: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.7 g/L) (20: 80, V/V), pH3.5, 等度洗脱; 流速1.0 ml/min; 柱温 30℃; 程序进样; 检测器: DAD, 280 nm。

副产物氨基酸分析条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse-AAA; 流动相 A: 40 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.8; B: ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O (45: 45: 10, v/v/v), 梯度洗脱; 流速2.0 mL/min; 柱温 40℃; 程序进样; 检测器: DAD, 338 nm和262 nm。

## 2 结果和分析

### 2.1 *pps* 基因和 *aroG<sup>fbt</sup>* 基因单基因表达对 *C. pekinense* PD-67 L-色氨酸合成代谢的影响

**2.1.1 *pps* 基因的序列分析以及表达载体的构建:** 重组质粒 pT-*pps* 的插入片段经测序分析, 长度为 1147 bp, 包含 1 个长度为 1095 bp 的 ORF, 起始密码子为 ATG, 编码 1 条 364 个氨基酸的多肽链。PD-67 和 ATCC13032 中 *pps* 基因编码区比对: 核酸序列同源率为 97.81%, 有 23 个碱基差异; 氨基酸序列同源率为 99.73%, 有 1 个氨基酸差异: Thr348Ile。

用 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切质粒 pT-*pps*, 回收 *pps* 片段, 同时用 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切表达载体 pXMJ19, 回收大片段, 与上述 *pps* 片段连接, 转化 *E. coli* DH5α, 涂布在含有氯霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *pps* 基因的表达载体, 命名为 pXPS。

**2.1.2 *aroG<sup>fbt</sup>* 基因的序列点突变验证以及表达载体的构建:** 重组质粒 pT-*aroG<sup>fbt</sup>* 的插入片段经测序分

析, 长度为 1067 bp, 包含 1 个长度为 1053 bp 的 ORF, 起始密码子为 ATG, 编码 1 条 350 个氨基酸的多肽链。*aroG<sup>fbt</sup>* 和 *E. coli* W3110 中 *aroG* 基因编码区比对分析表明定点突变被成功引入, 相应的编码氨基酸序列发生改变: Leu175Asp, 其余核苷酸序列以及相应的编码氨基酸序列均未发生改变。

用 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切质粒 pT-*aroG<sup>fbt</sup>*, 回收 *aroG<sup>fbt</sup>* 片段, 同时用 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切表达载体 pXMJ19, 回收大片段, 与上述 *aroG<sup>fbt</sup>* 片段连接, 转化 *E. coli* DH5α, 涂布在含有氯霉素的 LB 平板上, 筛选得到带有 *aroG<sup>fbt</sup>* 基因的表达载体, 命名为 pXA。

**2.1.3 *C. pekinense* 重组菌的 PPS 和 DS 活性:** 将质粒 pXPS 和 pXA 分别电击转化 PD-67, 得到重组菌 PD-67/pXPS 和 PD-67/pXA。同时将空质粒 pXMJ19 电击转化 PD-67, 得到 PD-67/pXMJ19, 作为对照。对重组菌和对照菌的粗酶液中的 PPS 活性和 DS 活性分别进行测定, 结果见表 3。重组菌 PD-67/pXPS 和 PD-67/pXA 相应的酶活力分别提高了 3.6 倍和 2 倍, 表明 *pps* 基因和 *aroG<sup>fbt</sup>* 基因在 PD-67 中分别获得了表达。

表 3. *C. pekinense* PD-67 重组菌株的酶活性

Table 3. The activity of enzymes in crude extract of the engineering strains

strains	specific activity / (U/mg)	
	PPS	DS
PD-67/pXMJ19	2.46 ± 0.24	11.1 ± 0.98
PD-67/pXPS	11.32 ± 0.92	ND
PD-67/pXA	ND	34.7 ± 1.25

ND: the activity of the enzyme was not determined. Data were averages of the results from three parallel determinations.

**2.1.4 *AroG<sup>fbt</sup>* 抗反馈抑制效应:** 为验证定点突变的 *aroG<sup>fbt</sup>* 基因编码的 DS 已解除了 Phe 的反馈抑制作用, 同时为了验证 *AroG<sup>fbt</sup>* 是否受到另外两种芳香族氨基酸 Tyr 和 Trp 的反馈抑制, 在 PD-67/pXMJ19 和 PD-67/pXA 粗酶液 DS 活性测定反应体系中分别加入 0 mmol/L - 4 mmol/L 不等的 3 种芳香族氨基酸, 并考察不同浓度的芳香族氨基酸对 DS 活性的影响 (图 1)。结果显示, Phe 和 Tyr 对 PD-67/pXMJ19 DS 活性影响比较明显: Phe 浓度为 2 mmol/L 时, DS 的活性几乎完全被抑制; Tyr 浓度为 0.5 mmol/L 时, 可以抑制 DS 大约 80% 活性。而工程菌 PD-67/pXA, Phe 浓度为 2 mmol/L 时, DS 仍有接近 80% 的活性; Tyr 浓度为 1 mmol/L 时, DS 还有

90%的活性。另外,4 mmol/L的 Trp 对两菌株的 DS 活性都没有明显的影响。

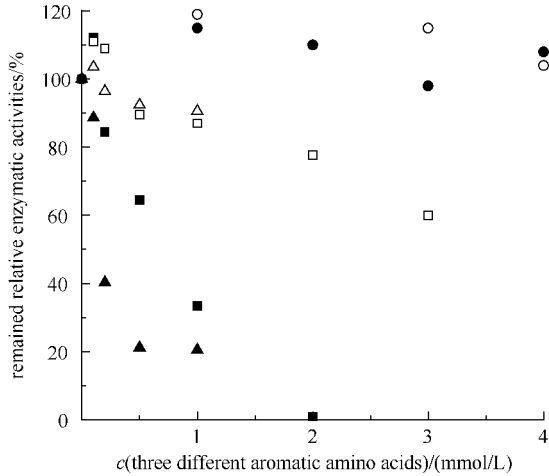


图 1.3 种芳香族氨基酸 (Phe、Tyr、Trp) 对 PD-67/pXMJ19 和 PD-67/pXA 粗酶液中 DS 活性的影响

Figure 1. Feedback inhibition to DS in the crude enzyme extracts of PD-67/pXMJ19 and PD-67/pXA by three amino acids. DS of PD-67/pXMJ19 inhibited by Phe (■); DS of PD-67/pXA inhibited by Phe (□); DS of PD-67/pXMJ19 inhibited by Tyr (▲); DS of PD-67/pXA inhibited by Tyr (△); DS of PD-67/pXMJ19 inhibited by Trp (●); DS of PD-67/pXA inhibited by Trp (○). Data were averages of the results from three parallel determinations.

### 2.1.5 过表达 *pps* 基因对重组菌生理代谢的影响:

为了研究 *pps* 基因过表达对 PD-67 代谢的影响,我们用基本培养基对重组菌 PD-67/pXPS 和对照菌 PD-67/pXMJ19 进行了摇瓶发酵实验,考察了细胞生长,葡萄糖利用和色氨酸积累的变化。

重组菌 PD-67/pXPS 与对照菌 PD-67/pXMJ19 相比,进入对数生长期的时间较晚,因此整个发酵过程中,重组菌 PD-67/pXPS 的 *OD* 值一直低于对照菌,但最终发酵结束阶段,二者的生物量相当(图 2-A)。葡萄糖的利用和发酵液中 L-色氨酸积累的测定结果表明,发酵前期 PD-67/pXMJ19 糖耗速率稍快,发酵中后期二者葡萄糖利用速率相差不大;在培养 24h 添加 IPTG 诱导基因表达之后,PD-67/pXPS 胞外 L-色氨酸的积累量迅速增加,最终积累浓度为 5.02 g/L,比对照菌株提高了 12.1% (图 2-B)。

2.1.6 过表达 *aroG<sup>fb</sup>* 基因对重组菌生理代谢的影响: 同样地,对重组菌 PD-67/pXA 和对照菌 PD-67/pXMJ19 进行摇瓶发酵实验,考察过表达 *aroG<sup>fb</sup>* 基因对 PD-67 生长和色氨酸积累的影响。

重组菌 PD-67/pXA 发酵前期生长速率与对照

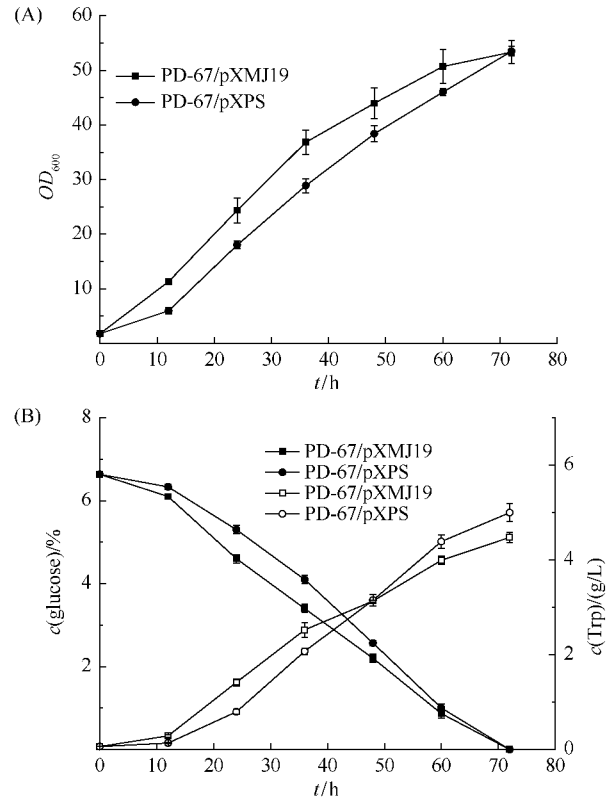


图 2. PD-67/pXMJ19 和 PD-67/pXPS 的发酵过程

Figure 2. Time course of PD-67/pXMJ19 and PD-67/pXPS fermentation. A: cell growth profiles; B: glucose consumption and L-tryptophan production profiles.

菌 PD-67/pXMJ19 相比基本一致,发酵 36h 后,对照菌生长开始减缓,而重组菌这一情况在 48 h 后才出现,最终重组菌生物量略高于对照菌(图 3-A)。相应的,二者葡萄糖利用速率前期相差不大,而在中后期重组菌 PD-67/pXA 糖耗速率快于对照菌;在培养 24 h 添加 IPTG 诱导基因表达之后,PD-67/pXA 胞外 L-色氨酸的积累量明显高于 PD-67/pXMJ19,最终积累浓度为 5.68 g/L,比对照菌株提高了 26.8% (图 3-B)。

### 2.2 双基因共表达对 *C. pectinosa* PD-67 L-色氨酸合成代谢的影响

以上结果表明,*pps* 基因的过表达,可以使部分丙酮酸回复到 PEP,为芳香族氨基酸的合成提供更多的前体物质;而解除反馈抑制调节的 DS (*AroG<sup>fb</sup>*) 可以加强碳代谢流进入芳香族氨基酸合成途径。因此,*pps* 基因和 *aroG<sup>fb</sup>* 基因单独表达均能不同程度的提高 PD-67 胞外色氨酸的积累量。为了组合这两个基因的效果,我们构建了 *pps* 和 *aroG<sup>fb</sup>* 双基因共表达

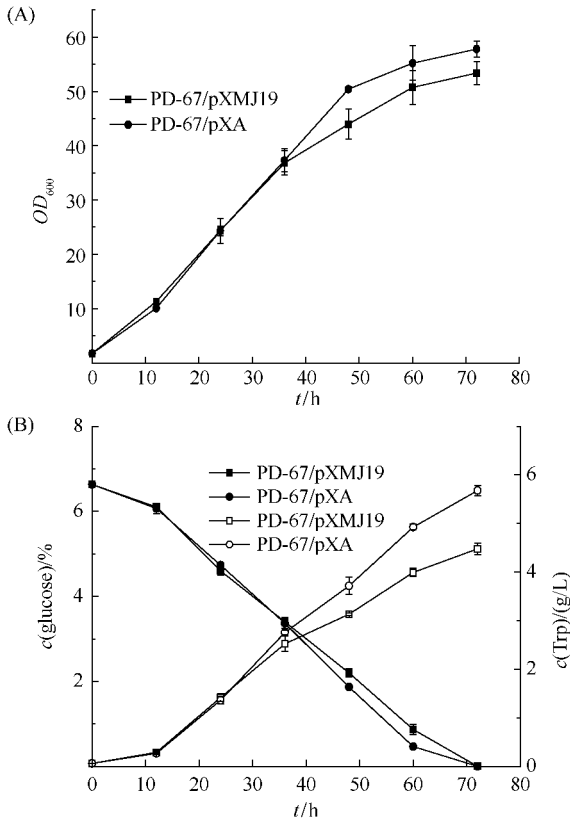


图 3. PD-67/pXMJ19 和 PD-67/pXA 的发酵过程

Figure 3. Time course of PD-67/pXMJ19 and PD-67/pXA fermentation. A: cell growth profiles; B: glucose consumption and L-tryptophan production profiles.

载体,以期双基因的共表达可以进一步提高 *C. pekinense* PD-67 L-色氨酸的积累量。

**2.2.1 *pps* 基因和 *aroG<sup>fb</sup>* 基因双基因共表达载体的构建:**用 *Kpn*I 和 *Sac* I 双酶切表达载体 pXPS,回收 *pps* 片段,同时用 *Kpn*I 和 *Sac* I 双酶切表达载体 pXA,回收大片段,与上述 *pps* 片段连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在含有氯霉素的 LB 平板上,筛选得到带有 *pps* 基因和 *aroG<sup>fb</sup>* 基因双基因的表达载体,命名为 pXAPS。

**2.2.2 *C. pekinense* PD-67/pXAPS 重组菌中 PPS 和 DS 活性测定:**将质粒 pXAPS 电击转化 PD-67,得到重组菌 PD-67/pXAPS。对重组菌 PD-67/pXAPS 和对照菌 PD-67/pXMJ19 的酶粗提物中的 PPS 和 DS 活性分别进行了测定,取 3 次测量的平均值。对照菌粗酶液中 PPS 和 DS 的比活力分别为 2.46 U/mg、11.1 U/mg,而在重组菌 PD-67/pXAPS 中相应的酶比活力分别为 10.08 U/mg 和 26.7 U/mg。表明 *pps* 基因和 *aroG<sup>fb</sup>* 基因在 PD-67

中实现了共表达。

**2.2.3 *pps* 和 *aroG<sup>fb</sup>* 双基因共表达对 PD-67 生理特性的影响:**为了考察 *pps* 和 *aroG<sup>fb</sup>* 双基因共表达对 PD-67 L-色氨酸积累的影响,我们用基本培养基分别对菌株 PD-67/pXAPS 和 PD-67/pXMJ19 进行了摇瓶发酵实验,并且同时与单基因表达菌株 PD-67/pXA 和 PD-67/pXPS 的生长、葡萄糖利用以及色氨酸的积累情况进行了比较。

重组菌 PD-67/pXAPS 和对照菌 PD-67/pXMJ19 的生长状况基本一致;由于较早进入对数生长期,重组菌 PD-67/pXAPS 在 12h 之后 OD 值均高于菌株 PD-67/pXPS,但二者的生长速率相差不大,最终生物量 PD-67/pXAPS 略高于 PD-67/pXPS;与 PD-67/pXA 相比,PD-67/pXAPS 进入对数生长期稍慢,最

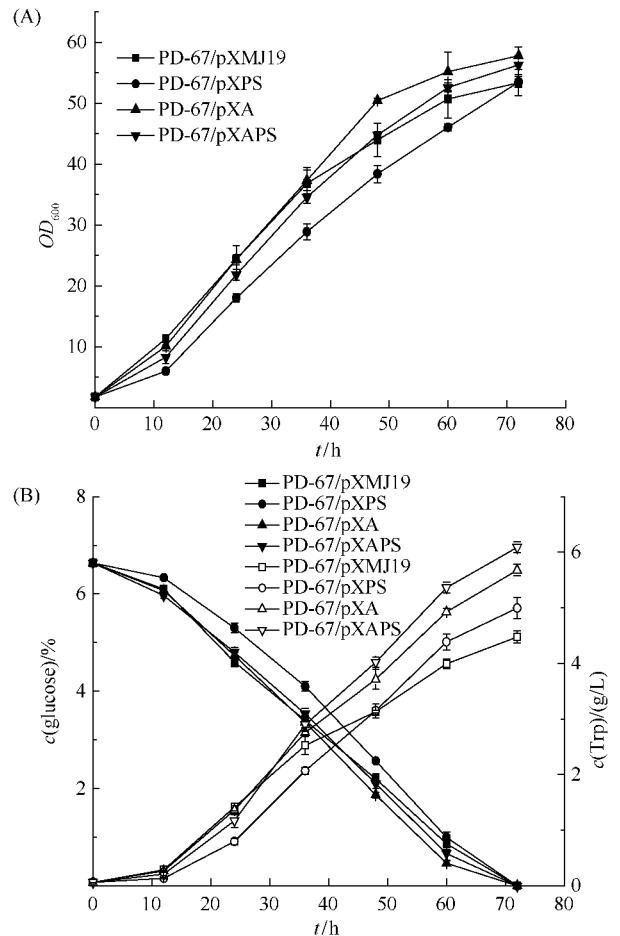


图 4. PD-67/pXAPS、PD-67/pXA、PD-67/pXPS 和 PD-67/pXMJ19 的发酵过程

Figure 4. Time course of PD-67/pXAPS, PD-67/pXA, PD-67/pXPS and PD-67/pXMJ19 fermentation. A: cell growth profiles; B: glucose consumption and L-tryptophan production profiles.

终生物量略低于 PD-67/pXA (图 4-A)。重组菌 PD-67/pXAPS 葡萄糖利用速率快于 PD-67/pXPS, 而与 PD-67/pXA 和 PD-67/pXMJ19 的葡萄糖利用速率相差不大。在发酵 24 h 添加 IPTG 诱导培养之后, PD-67/pXAPS 的胞外色氨酸浓度一直高于菌株 PD-67/pXA、PD-67/pXPS 和对照菌 PD-67/pXMJ19, 最终色氨酸的浓度为 6.09 g/L, 相应提高量分别为 7.1%、21.8% 和 35.9% (图 4-B)。

对 4 株菌的发酵参数进行了分析。结果表明, *pps* 基因和 *aroG<sup>br</sup>* 基因的过表达对 *C. pекinense* PD-67 的 L-色氨酸的合成代谢产生了影响。色氨酸的积累量和转化率都有明显提高 (表 4)。

表 4. 各菌株的发酵参数比较

Table 4. Comparison of fermentation parameters of the different strains

strains	parameters					
	$P_{TTP} /$ (g/L)	$X_{max} /$ (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$\Phi$ [g/(L·h)]
PD-67/pXMJ19	4.48	14.41	0.067	0.217	0.311	0.062
PD-67/pXPS	5.02	14.45	0.075	0.218	0.347	0.069
PD-67/pXA	5.68	15.61	0.086	0.235	0.364	0.079
PD-67/pXAPS	6.09	15.20	0.092	0.229	0.401	0.085

$P_{TTP}$ : Tryptophan Production;  $X_{max}$ : The maximum Cell Dry Weight;  $Y_{P/S}$ : Tryptophan yield on Glucose;  $Y_{X/S}$ : Biomass yield on Glucose;  $Y_{P/X}$ : Tryptophan yield on Biomass;  $\Phi$ : Tryptophan productivity.

我们也对发酵液中的副产物氨基酸进行了测定 (表 5)。重组菌发酵液中丙氨酸浓度有明显的下降; 谷氨酸和缬氨酸浓度有不同程度的提高; 异亮氨

表 5. 各菌株发酵液中的副产物氨基酸

Table 5. The by-products amino acids in fermentation broth

strains	c (amino acid) / (mg/L)						
	glutamate	glycine	alanine	valine	isoleucine	leucine	lysine
PD-67/pXMJ19	107.69 ± 7.85	103.53 ± 2.56	2473.62 ± 21.92	1281.89 ± 54.23	589.59 ± 26.44	110.82 ± 10.45	74.31 ± 0.98
PD-67/pXPS	161.98 ± 16.57	167.04 ± 4.44	1791.80 ± 22.66	1443.49 ± 69.45	475.98 ± 14.23	126.98 ± 18.94	55.06 ± 1.97
PD-67/pXA	332.84 ± 28.83	83.63 ± 3.19	1600.30 ± 105.38	1445.84 ± 42.61	483.18 ± 18.31	118.67 ± 8.48	52.12 ± 3.06
PD-67/pXAPS	126.82 ± 33.15	95.61 ± 7.35	1265.72 ± 20.02	1879.40 ± 36.68	484.61 ± 12.23	115.31 ± 9.13	50.88 ± 5.69

Data were averages from three parallel determinations and excluded interference from the yeast extract in the culture medium by minusing the quality of relevant amino acids in the control fermentation broth.

酸和赖氨酸浓度略有下降; 另外, 重组菌 PD-67/pXPS 甘氨酸浓度有明显提高, 而 PD-67/pXA 和 PD-67/pXAPS 发酵液中甘氨酸浓度略有下降。

### 3 讨论

PEP 是 L-色氨酸合成的重要前体物质之一。本工作通过过表达 *pps* 基因, 使丙酮酸回流到 PEP, 从而增加 L-色氨酸合成中 PEP 的供应, 提高了 PD-67 的 L-色氨酸积累量。此外, 通过表达抗反馈抑制 *aroG<sup>br</sup>* 基因, 增加 DS 在胞内的催化活性, 进一步加强碳代谢流进入芳香族氨基酸合成途径。最终使 L-色氨酸的积累量和转化率都有明显提高。

Patnaik 等<sup>[16]</sup> 利用 *E. coli* AB2847 *aroB* 突变株 (该菌株不能进一步代谢 DAHP), 将在丰富培养基中培养好的细胞收集之后重新悬浮在基本培养基中进行发酵 (避免 *pps* 的过表达造成细胞生长受抑制), 在碳源基本不再向生物量转化的情况下, 诱导表达 PEP 合酶基因、转酮酶基因以及抗反馈抑制的 DAHP 合酶基因可以提高 DAHP 的产量两倍, 几乎达到理论最大值。两个前体物 PEP 和 E4P 的供应

以及 DS 的活性直接制约流向莽草酸途径的碳代谢流<sup>[17]</sup>。与之不同的是, 我们研究了在分批发酵的整个过程中过表达 PEP 合酶基因 *pps* 和抗反馈抑制的 DAHP 合酶基因 *aroG<sup>br</sup>* 对 L-色氨酸合成代谢的影响。单独表达 *pps* 基因, L-色氨酸的积累提高幅度比较低。发酵液副产物氨基酸分析显示, 重组菌 PD-67/pXPS 的丙氨酸量减少 20.3%, 而甘氨酸量增加 62.1%。这很可能是因为芳香族氨基酸合成途径存在瓶颈, 由丙酮酸回复而来的过多的 PEP 只有很少量进入莽草酸途径, 还有一部分进入糖异生途径, 生成甘油酸-3-磷酸, 进而转化为甘氨酸, 另外大部分 PEP 又回到丙酮酸或者通过回补途径合成草酰乙酸, 并最终进入 TCA 循环<sup>[18]</sup>。这也可以解释为什么重组菌 PD-67/pXP 发酵过程中生长速率和最终生物量并没有受到太大的影响。异源表达 *aroG<sup>br</sup>* 基因, 对于 PD-67 L-色氨酸的积累有明显的提高。这说明莽草酸途径的第一步反应是 PD-67 L-色氨酸合成的重要瓶颈之一, 而异源表达大肠杆菌 *aroG<sup>br</sup>* 基因有助于解除这一瓶颈。当协同表达 *pps* 基因和 *aroG<sup>br</sup>* 基因时, 在高活性的 AroG<sup>br</sup> 催化下, 由丙酮酸回复而来的 PEP 可以更多的进入芳香族氨

氨酸合成途径, 表现为菌株 PD-67/pXAPS 色氨酸的积累量和转化率较单基因表达时有了进一步的提高, 而副产物氨基酸中丙氨酸的量与对照菌和单基因表达菌株相比都有明显的降低。

本工作通过过表达 *pps* 基因和 *aroG<sup>br</sup>* 基因的方法提高了北京棒杆菌 PD-67 L-色氨酸的积累能力。但研究表明, 色氨酸合成的另一前体物质赤藓糖-4-磷酸的供应也至关重要, 而磷酸戊糖途径中的转酮酶与该物质的合成紧密相关<sup>[19-20]</sup>。另外北京棒杆菌 PD-67 丙氨酸、缬氨酸的合成能力比较强, 这两种氨基酸也与色氨酸的合成竞争碳代谢流。在本工作的基础之上, 阻断或者减弱丙氨酸、缬氨酸的合成途径, 过表达转酮酶基因, 将有可能进一步提高菌株的色氨酸合成能力。

## 参考文献

[1] Bongaerts J, Krämer M, Müller U, Raeven L, Wubbolts M. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metabolic Engineering*, 2001, 3 (4): 289-300.

[2] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69 (6): 615-626.

[3] 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.

[4] Liu YJ, Li PP, Zhao KX, Wang BJ, Jiang CY, Drake HL, Liu SJ. *Corynebacterium glutamicum* contains 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases that display novel biochemical features. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (17): 5497-5503.

[5] Dominguez H, Lindley ND. Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (10): 3878-3880.

[6] Li Y, Liu Y, Wang S, Tong Z, Xu Q. Co-expressions of phosphoenolpyruvate synthetase A (*ppsA*) and transketolase A (*tktA*) genes of *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, 19 (3): 301-306. (in Chinese)  
李永辉, 刘云, 王世春, 童朝阳, 徐琪寿. 大肠杆菌

*ppsA* 和 *tktA* 基因的串联表达. 生物工程学报, 2003 (03): 301-306.

[7] Liao HF, Lin LL, Chien HR, Hsu WH. Serine 187 is a crucial residue for allosteric regulation of *Corynebacterium glutamicum* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 194 (1): 59-64.

[8] Umbarger HE. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 1978, 47: 532-606.

[9] Hu C, Jiang P, Xu J, Wu Y, Huang W. Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*, 2003, 43 (5): 399-406.

[10] Jakoby M, Ngouoto-Nkili C-E, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13 (6): 437-441.

[11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[12] Jang KH, Britz M. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnology Letters*, 2000, 22 (7): 539-545.

[13] Cooper RA, Kornberg HL. The direct synthesis of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 1967, 168 (12): 263-280.

[14] Roe RM, Burtan JD, Kuhr RJ. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. Netherlands: IOS, 1997.

[15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.

[16] Patnaik R, Liao JC. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60 (11): 3903-3908.

[17] Patnaik R, Spitzer RG, Liao JC. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnology and*



Bioengineering, 1995, 46 (4) : 361-370.

- [18] Park SM, Shaw-Reid C, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and GC-MS. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47 (4) : 430-440.
- [19] 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.

- [20] Ji W, Zhao Z, Zhang Y, Wang Y, Ding J. *Corynebacterium pekinense* transketolase: gene cloning, sequence analysis and expression. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (11) : 1474-1480. (in Chinese)
- 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*, 2010 (11) : 1474-1480.

## Effect of *pps* and *aroG<sup>fbr</sup>* overexpression on L-tryptophan production in *Corynebacterium pekinense*

Chuangang Zang<sup>1,2</sup>, Zhi Zhao<sup>1</sup>, Yu Wang<sup>1</sup>, Yingzi Zhang<sup>1</sup>, Jiuyuan Ding<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>Graduate School of the University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] In order to redirect carbon flows into aromatic amino acids biosynthesis pathway and further improve the production of L-tryptophan in *Corynebacterium pekinense* PD-67, two schemes were implemented. First, the supply of phosphoenolpyruvate (PEP), one of precursors of L-tryptophan biosynthesis, was increased. Second, the feedback inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DS), a key enzyme in the aromatic amino acids biosynthesis, was relieved and the activity of DS was increased. [Methods] The phosphoenolpyruvate synthase gene (*pps*) was cloned from *C. pekinense* PD-67 chromosome by PCR and inserted into expression vector to construct a recombinant plasmid pXPPS; the *aroG* gene encoding DS isozymes was cloned from *Escherichia coli* chromosome by PCR and the mutation of Leu175Asp was introduced by site-directed mutagenesis using sequence-overlap extension PCR. The mutated gene named as *aroG<sup>fbr</sup>* was cloned to expression vector to construct a recombinant plasmid pXA; and the recombinant plasmid pXAPS co-expressing *pps* and *aroG<sup>fbr</sup>* was constructed. The three recombinant plasmids were transformed into PD-67 to generate the engineering strains PD-67/pXPS, PD-67/pXA and PD-67/pXAPS, respectively. The fermentation characteristics of the three engineering strains were investigated. [Results] The expression of *pps* and *aroG<sup>fbr</sup>* was confirmed by enzyme activity assays. The deregulation of feedback inhibition of AroG<sup>fbr</sup> was confirmed by determining DS activity in the presence of three aromatic amino acids. The overexpression of *pps* and *aroG<sup>fbr</sup>* resulted in an increase of L-tryptophan biosynthesis by 12.1% and 26.8%, respectively, while the co-expression of two genes increased the production of L-tryptophan by 35.9% in the engineering strain PD-67/pXAPS. [Conclusion] Both of the overexpressions of the *pps* gene and *aroG<sup>fbr</sup>* gene can increase L-tryptophan biosynthesis, while the production was further improved by the co-expression of the two genes.

**Keywords:** *Corynebacterium pekinense*, phosphoenolpyruvate synthase, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, feedback inhibition, overexpression, L-tryptophan

(本文责编:王晋芳)

\* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-40-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn