



双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD 在谷氨酸棒杆菌 JNR 中的功能

李静¹, 徐美娟^{1,2*}, 舒群峰¹, 赵雅雯¹, 唐蜜¹, 张显¹, 杨套伟¹, 许正宏¹, 饶志明^{1*}

¹江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

²江南大学(如皋)食品生物技术研究所, 江苏 如皋 226500

摘要:【目的】通过改造谷氨酸棒杆菌 JNR 中双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD, 减弱尿苷酰去除酶的活性, 增强 NH_4^+ 的转运和利用, 提高 L-精氨酸的合成。【方法】本文对来源于谷氨酸棒杆菌的突变菌株 JNR 中的双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD 进行整合突变, 采用同源重组的方法将 H₄₁₄ 和 D₄₁₅ 位点突变为两个丙氨酸 AA, 在此菌株的基础上过量表达 PII 蛋白 GlnK, 并对其尿苷酰化研究, 离子色谱检测摇瓶发酵过程中 NH_4^+ 的浓度, 并对最终的改造菌株进行连续流加发酵分析。【结果】该双功能尿苷酰转移/去除酶在谷氨酸棒杆菌中成功进行整合突变, 有效减弱了尿苷酰去除酶的活性; 同时过表达 PII 蛋白 GlnK, 其酰基化程度明显增强。摇瓶发酵结果表明菌株 L4 消耗 NH_4^+ 增加, L-精氨酸产量为 36.2 ± 1.2 g/L, 比对照菌株 L3 高出 22.7%。5-L 发酵罐实验结果显示改造菌株 L4 的 L-精氨酸的产量为 52.2 g/L, 较野生型菌株 L0 提高了 25.3%。【结论】谷氨酸棒杆菌合成 L-精氨酸的过程中氮源是必不可少的。减弱 GlnD 尿苷酰去除酶的活性后, 胞内尿苷酰化的 GlnK-UMP 增加, GlnK-UMP 与氮转录调控因子 AmtR 结合, 转运至胞内的 NH_4^+ 浓度提高, 促使 L-精氨酸产量显著提高。

关键词: 谷氨酸棒杆菌 JNR, 双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD, NH_4^+ , L-精氨酸, 整合突变

氮元素是构成生物体大分子核酸、蛋白质及其他含氮化合物的材料, 是各类微生物最基本的生长因子之一^[1-2]。经过长期的进化, 微生物形成了非常精细的全局氮调控网络, 以应对不同环境下的生存压力^[3-5]。 NH_4^+ 是绝大多数微生物最优先

利用的氮源。

谷氨酸棒杆菌作为革兰氏阳性菌, 被广泛应用于氨基酸的生产。在谷氨酸棒杆菌中, 氮代谢受到全局氮转录调控因子 AmtR 的调控, 据报道谷氨酸棒杆菌 AmtR 可调控至少 35 个基因的转

基金项目: 国家自然科学基金(31770058, 31570085); 江苏省自然科学基金(BK20181205); 教育部重点研究项目(113033A); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51708A); 国家双一流轻工业技术与工程一级学科计划(LITE2018-06)

*通信作者。徐美娟, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; 饶志明, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-01-12; 修回日期: 2019-02-26; 网络出版日期: 2019-03-07

录, 包括编码铵吸收相关的转运子和酶的基因 (*amtA*, *amtB*, *glnA*, *gltBD*, *dapA*)、肌酐(*codA*, *crnT*)和尿素(*urtABCDE*, *ureABCEFG*)代谢相关基因; 信号转导蛋白及其修饰酶(*glnK*, *glnD*)等氮代谢相关的基因^[6]。如图 1-A 所示, 当胞内 NH_4^+ 限量时, PII 信号转导蛋白 GlnK 被双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD (UTase/UR, *glnD*)尿苷酰化后形成 GlnK-UMP^[7], GlnK-UMP 可与氮转录调控因子 AmtR 结合, AmtR 对铵吸收利用途径的阻遏作用解除, 相关基因的转录正常进行^[8]。同时, 尿苷酰化的 GlnK-UMP 不能与膜上的铵转运蛋白 AmtB 结合形成复合物, 因此激活了铵转运通道, NH_4^+ 可通过 AmtB 铵转运通道进入细胞内。相反如图 1-B 所示, 当胞内 NH_4^+ 充足时, GlnD 蛋白将 GlnK-UMP 蛋白去尿苷酰化为 GlnK, 此时 GlnK 处于激活状态, 被激活的 GlnK 会与细胞膜上的靶

蛋白 AmtB 结合为复合物 AmtB-GlnK, 阻碍 AmtB 对铵的转运。激活后的 GlnK 不与氮转录调控因子 AmtR 结合, AmtR 结合到相关基因的启动子区, 阻遏了胞内氮代谢相关基因转录反应的发生, 细胞内代谢活动减弱^[9-10]。

L-精氨酸($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$)作为半必需氨基酸, 具有多种生理功能, 是一种重要的工业氨基酸, 广泛应用于医药、食品、化工等行业, 是氨基酸工业研究与开发的热点之一^[11]。在 L-精氨酸形成过程中, 需要大量的氮源供给^[12]。高氮源的环境中, 为了减少 AmtR 的抑制, 增加胞内 NH_4^+ 的浓度, 提高 L-精氨酸的产量, 我们通过改造双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD, 减弱尿苷酰去除酶 UR 的活性。棒杆菌中, 双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD 中的 HD 区域控制尿苷酰去除酶的活性^[13]。通过同源比对谷氨酸棒杆菌与钝齿棒杆菌中的基因

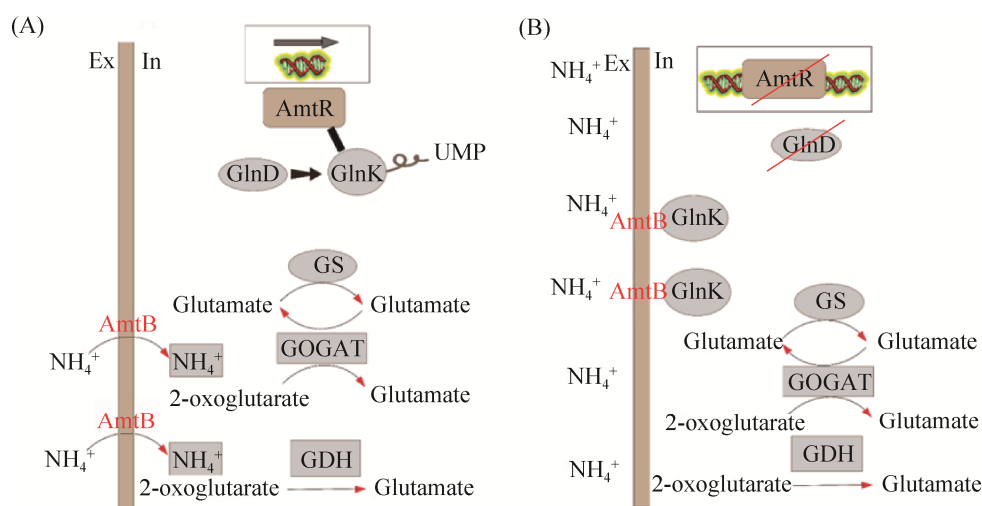


图 1. 棒杆菌中 GlnK, GlnD, AmtB 和 AmtR 之间的关系

Figure 1. Relationship of GlnK, GlnD, AmtB and AmtR in *Corynebacterium*. A: Under conditions of intracellular ammonium starvation, GlnK is modified by GlnD, and the resulting adenylylated-GlnK (GlnK-UMP) subsequently interacts with AmtR, which causes the transcriptional upregulation of nitrogen-regulated genes, thereby activating the intracellular transport of ammonium. B: under conditions of nitrogen surplus, de-adenylylated GlnK interacts with the ammonium transporter AmtB, blocking the ammonium flux into the cell and therefore resulting in a GlnK-free state, allowing AmtR to be reactivated and bind to the promoter regions of nitrogen-controlled genes, repressing their transcription.

1.3 培养基

1.3.1 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, LB 平板, 琼脂 15。

1.3.2 LBG 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 7。

1.3.3 LBGS 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 10, 蔗糖 100。

1.3.4 种子培养基(g/L): 葡萄糖 50, 酵母抽提物 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 1。

1.3.5 摇瓶发酵培养基(g/L): 葡萄糖 120, 酵母抽提物 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, KH_2PO_4 1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, MnSO_4 0.02, CaCO_3 20。

1.3.6 5-L 发酵罐培养基(g/L): 葡萄糖 100, 酵母抽提物 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, KH_2PO_4 1.50, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, MnSO_4 0.02。

1.4 菌株培养

大肠杆菌 BL21(DE3)采用 LB 液体培养基在 37 °C 下进行培养, 转速 180 r/min; 谷氨酸棒杆菌 JNR 在 LBG 培养基中培养, 培养温度为 30 °C, 转速 180 r/min。

谷氨酸棒杆菌 JNR 摇瓶发酵的培养方法: 保藏的甘油冻管菌种在 LBG 平板上划线活化, 接一环活化后的菌种于种子培养基中, 装液量 50/250 mL, 往复式摇床 140 r/min, 培养 48 h; 将种子培养液以 10% 的接种量转接到摇瓶发酵培养基中, 规格为 250 mL 装液量 25 mL, 于 30 °C、220 r/min 的往复式摇床培养 72 h。5 L 发酵方法参照文献[12], 发酵过程中, 每隔 8 h 取 5 mL 样品检测相关指标。

1.5 离子色谱检测 NH_4^+ 的浓度

采用赛默飞 ICS-5000⁺ 离子色谱检测 NH_4^+ 的浓度, IonPac CS12A 分离柱(4 mm×250 mm)与

IonPac CG12A 保护柱(4 mm×50 mm), 流动相 20 mmol/L 甲基磺酸, 流速 1 mL/min, 时间 15 min, 柱箱温度 30 °C, 进样体积 25 μL 。样品处理如下: 分别取 1 mL 摇瓶发酵 12、24、36、48、60 和 72 h 后的发酵液, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用 0.22 μm 滤膜过滤, 数据分析参照 Zhu 的方法^[14]。

1.6 生长量 OD_{562} 的测定

采用分光光度计 UNICOTM-UV2000 测定细胞的生长量, 1 OD_{562} =0.375 g/L 细胞干重。测定方法: 收集发酵液, 加入 0.1 mol/L 稀盐酸将发酵液稀释至适当倍数, 同时也可以去除 CaCO_3 , 排除干扰, 测定稀释后的发酵液在 562 nm 处的吸光值^[15]。

1.7 L-精氨酸产量的测定

取 1 mL 摇瓶发酵 72 h 后的发酵液, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 1:1 加入 10% 的三氯乙酸反应 2 h, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液备用。采用改良坂口反应测定 L-精氨酸产量, 反应液的配方为(g/L): NaOH 40, 甲萘酚-正丙醇 80, 双乙酰溶液 0.5 mL, 将以上三种试剂各加 1 mL 至 10 mL 离心管中作为显色液, 加入适当稀释的发酵液 100 μL 。30 °C 水浴加热 20 min 后测定 OD_{521} 值。

2 结果和分析

2.1 谷氨酸棒杆菌 JNR 中过表达 *GlnD*

以谷氨酸棒杆菌 13032 的基因组 DNA 为模板, 引物 P1 F/R 进行 PCR 扩增, 得到大小 2079 bp 基因片段。将 *glnD* 基因用 *Xba* I 和 *EcoR* I 双酶切, 回收 *glnD* 片段后, 与线性化质粒 pXMJ19 连接后转化, 阳性转化子提取质粒经 *Xba* I 和 *EcoR* I 酶

切验证, 释放 6601 bp 和 2127 bp 大小的片段, 分别对应 pXMJ19 和 *glnD* 的大小, 结果表明质粒 pXMJ19-*glnD* 构建成功, 如图 2 所示。

将 BL21 中构建好的质粒 pXMJ19-*glnD* 电转到谷氨酸棒杆菌 JNR(L0)中, 挑选阳性转化子 L1 菌株进行诱导表达, 菌液经过超声破碎后离心取上清, 处理样品对其进行 SDS-PAGE 分析。如图 3 所示, 可以清晰地看见分子量约为 76.23 kDa 的特异性条带, 说明尿苷酰转移/去除酶能够在谷氨酸棒杆菌 JNR 中表达。

2.2 同源比对分析 GlnD 的位点

据报道, 在棒杆菌中, 双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD (UTase/UR) 中 HD 区域控制尿苷酰去除

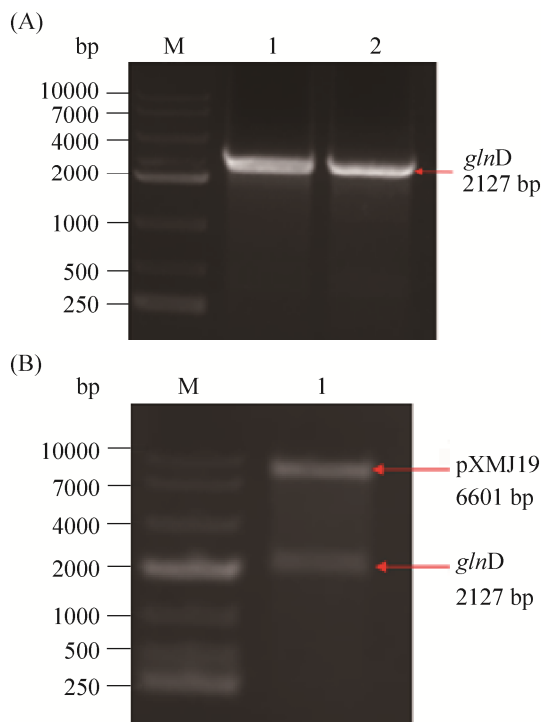


图 2. 基因 PCR 结果及质粒 pXMJ19-*glnD* 酶切验证
Figure 2. PCR results of *glnD* genes and identification of pXMJ19-*glnD* plasmids by double enzyme digestion. A: M: DL10000 marker; lane 1,2: *glnD*. B: M: DL10000 marker; lane 1: result of double enzyme digestion of empty pXMJ19-*glnD*.

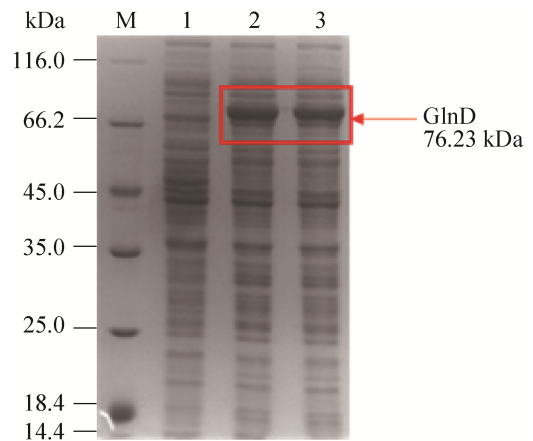


图 3. 重组菌株 L1 的 GlnD 粗蛋白 SDS-PAGE 分析
Figure 3. SDS-PAGE analysis of GlnD crude proteins. M: Unstained protein Ladder; lane 1: crude enzyme of *C. glutamicum* JNR with plasmid pXMJ19; lane 2,3: crude enzyme of L1 strain with plasmid pXMJ19-*glnD*.

酶 UR 的活性。我们通过 DNAMAN 软件对谷氨酸棒杆菌 13032 (Cg)、钝齿棒杆菌(Cc)、分枝杆菌 (Mt) 和大肠杆菌(Ec)中的 *glnD* 基因进行比对分析, 如图 4 所示。通过同源比对, 我们可以发现四株菌在 414 和 415 位点同时存在 HD 的位点。为了减弱尿苷酰去除酶的活性, 增加 GlnK-UMP, 所以将 414 和 415 位点作为突变的位点, 突变为两个丙氨酸 AA, 软件分析结果见图 4。

2.3 整合突变

采用同源重组的方法进行整合突变, pK18*mobsacB* 质粒作为载体^[16]。首先通过融合 PCR 的方法, 将编码双功能尿苷酰转移/去除酶的 *glnD* 基因中的 H₄₁₄ 与 D₄₁₅ 位点分别替换为编码丙氨酸(A)的序列。以 pXMJ19-*glnD* 质粒为模板, 利用引物 P2F1 和 P2R1、P2F2 和 P2R2 进行单片段 PCR 扩增。PCR 结束后将获得的两段同源臂 arm1 和 arm2 进行融合 PCR^[17], 得到大小为 2079 bp 的 *glnD*_{AA} 片段, 如图 5 所示。

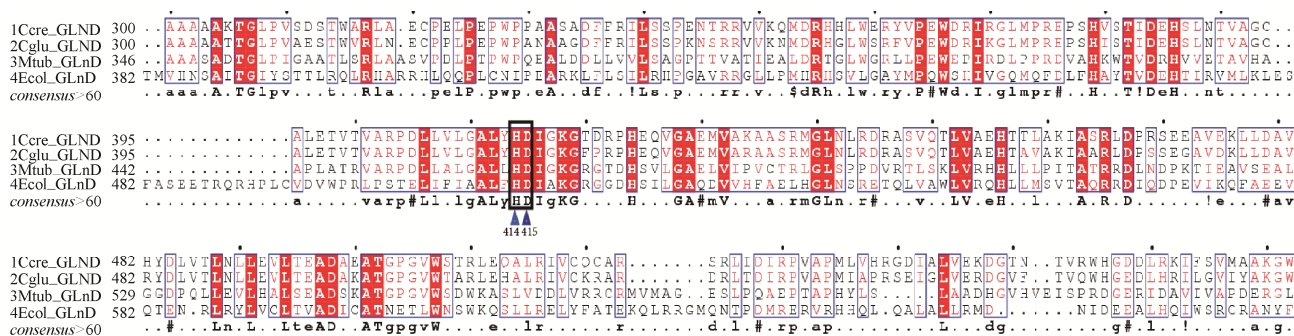


图 4. GlnD 蛋白的同源序列比对

Figure 4. Homologous sequence alignment of GlnD protein.

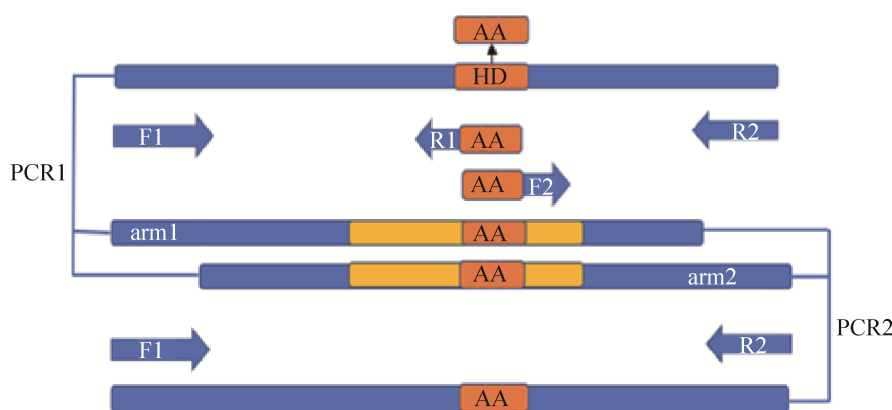


图 5. 融合 PCR 示意图

Figure 5. Fusion PCR for the *glnD_{AA}* gene.

采用 *EcoR* I 和 *Xba* I 两个酶同时酶切获得的 *glnD_{AA}* 片段和 pK18*mobsacB* 载体, 16 °C 过夜连接, 将连接后的质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态中, 挑取阳性转化子, 如图 6 所示。

将构建成功的质粒 pK18-*glnD_{AA}* 电转到 L0 的感受态中, 筛选第一次同源重组后的菌株转接至 10% 的 LBGS 培养基中进行第二次同源重组筛选, 分别划线无抗性的 LBG 平板和含有卡那霉素抗性的平板, 挑选在无抗性平板上生长但在卡那抗性平板上不生长的菌株进行测序。测序结果表明整合突变成功, *glnD_{AA}* 成功替换到基因组上, 菌株命名为 L1。

2.4 比较整合突变前后 GlnD 对 GlnK 的修饰作用

分别将 PII 信号转导蛋白 GlnK 在原始菌株 L0

和整合突变成功的菌株 L2 中进行过量表达, 形成菌株 L3 和 L4, 如图 7 所示。

为了验证整合突变的效果, 我们采用验证 GlnK 蛋白酰基化的强弱来反映整合突变的效果。首先在大肠杆菌 BL21(DE3)中构建质粒 pXMJ19-*glnK*, 构建方法参考 2.1。将构建好的质粒 pXMJ19-*glnK* 分别电转到菌株 L0 和 L2 中, 挑取转化子进行诱导表达。经超声波破碎, 将获得的上清液于镍柱纯化并 SDS-PAGE 分析。如图 8 所示, 泳道 2 中 GlnK 蛋白呈现两条表达带, 上面的条带为尿苷酰化条带, 即 GlnK-UMP; 下面的条带为未修饰的 GlnK 蛋白。泳道 1 是没有进行整合突变的单纯表达 GlnK 的菌株, GlnK 也是呈现出两条带, 但是我们对泳道 1 和泳道 2、3 可以明显发现, 泳道 2

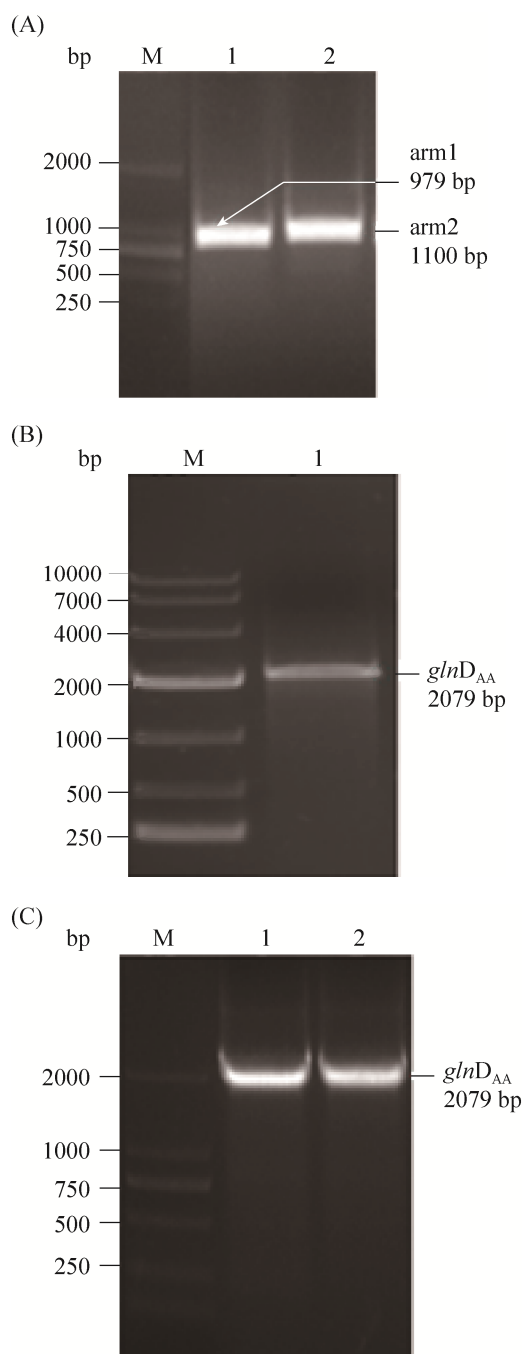


图 6. 同源臂 PCR, 融合 PCR 和菌落 PCR 验证 pK18-*glnD_{AA}* 质粒

Figure 6. Fragment and fusion PCR and identification of pK18-*glnD_{HD}* plasmids double enzyme digestion. A: M: DL2000 Maker; lane 1: homologous arm1; lane 2: homologous arm2; B: M: DL10000 maker; lane 1: *glnD_{AA}*; C: M: DL2000 maker; lane 1,2: results of colony PCR of pK18-*glnD_{AA}* in L3 strain.

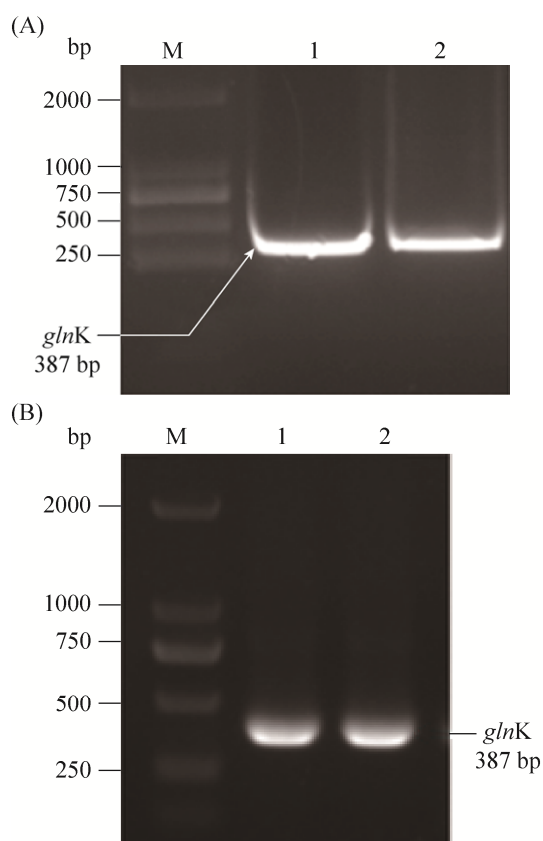


图 7. 基因 PCR 结果及菌落 PCR 验证 pXMJ19-*glnK*
Figure 7. PCR results of *glnK* genes and identification of pXMJ19-*glnK* plasmids by colony PCR. A: M: DL2000 maker; lane 1,2: *glnK*. B: M: DL2000 maker; lane 1,2: result of pXMJ19-*glnK* plasmids by colony PCR.

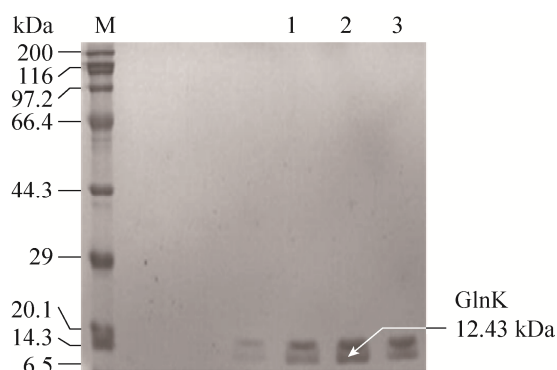


图 8. 重组谷氨酸棒杆菌 L3 及 L4 的 GlnK 蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 8. SDS-PAGE analysis of the overexpression of GlnK in recombinant L3 and L4 strain. M: unstained protein ladder; lane 1: L3; lane 2,3: L4.

和 3 的上面一条带要比通道 1 中的条带粗, 说明菌株 L4 中 GlnK 蛋白多数为 GlnK-UMP 状态, 说明双功能尿苷酰化转移/去除酶的去尿苷酰化酶活被钝化而降低。

2.5 重组菌发酵 L-精氨酸性能测定

前面的实验证明, 对双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD 进行整合突变有效地减弱了去尿苷酰化酶的活力, 胞内的 GlnK 蛋白多呈尿苷酰化状态。通过检测胞外 NH_4^+ 的残留量和 L-精氨酸的产量验证我们的猜想, 胞内的 GlnK 蛋白更多呈现尿苷酰化有助于铵通道的打开, 将改造后的 L3 和 L4 菌株以及野生型 L0 菌株分别进行摇瓶发酵, 收集发酵 12、24、36、48、60 和 72 h 的发酵液。比较各时间段 3 株菌的生长量、葡萄糖浓度和 L-精氨酸的产量, 如图 9-A 所示, 随着发酵时间的增加, 菌株的生长量逐渐积累, 基本上同步生长, 说明分子改造没有对菌体造成伤害。将上述各时间段的样品进行 L-精氨酸产量检测, 结果表明 L-精氨酸的产量逐渐增加, 前 36 h, L-精氨酸基本上没有产生, 发酵 36 h 以后, L-精氨酸呈指数增长。比较 L3 和 L4 菌株, L4 菌株最终产量高于 L3 菌株, 达到 (36.2 ± 1.2) g/L, 比 L3 菌株提高了 22.7%, 比野生型菌株 L0 高出 31%。同时, L4 菌株最终剩余葡萄糖明显低于 L3 菌株, 浓度约为 (10.2 ± 0.6) g/L, 由此可以证明整合突变的效果显著。

检测不同发酵时间段内 NH_4^+ 的残留量, 如图 9-B 所示, 随着发酵时间的增加, NH_4^+ 的浓度逐渐降低, 对比 L3 和 L4 菌株, 可以明显看出 L4 菌株对 NH_4^+ 的消耗要高于 L3 菌株, 发酵 72 h 后, NH_4^+ 残留量远远低于 L3 菌株。结果表明对 GlnD 蛋白进行的改造有效地加强了 GlnK 蛋白的尿苷

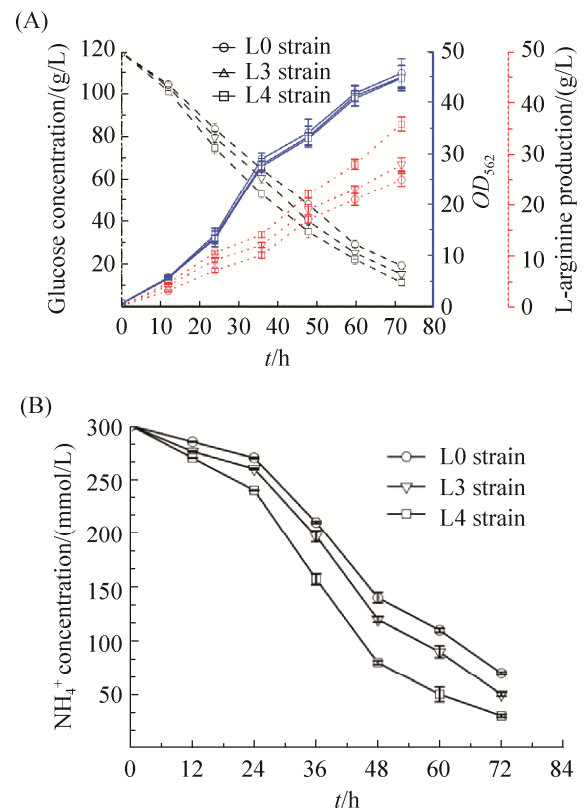


图 9. 不同菌株在摇瓶发酵中的生长量、葡萄糖消耗、L-精氨酸的产量和 NH_4^+ 浓度

Figure 9. The OD_{562} , glucose concentration, L-arginine production and NH_4^+ concentration of strains. A: Comparison of OD_{562} , glucose concentration and L-arginine production in the L3, L4 and L0 strains under shake flask fermentation. B: Detection of NH_4^+ concentration by ion chromatography, comparison of NH_4^+ concentration in the L3, L4 and L0 strains under shake flask fermentation. The empty circle represents L0 strain, the empty triangle represents L3 strain, the empty square represents L4 strain. The data represent the mean values and standard deviations obtained from at least three independent experiments.

酰化, 使得铵转运蛋白处于活性状态, 更多的 NH_4^+ 转运到胞内, 进一步证明了整合突变效果显著。

对菌株 L4 和野生型菌株 L0 进行 5-L 发酵罐研究, 并考察发酵过程中的参数的变化。每隔 8 h 取一次样检测发酵液的 OD_{562} 、残糖及 L-精氨酸

的产量。根据发酵结果可以分析出重组菌株 L4 产酸能力较出发菌株 L0 强, 且消耗了更多的葡萄糖, 共进行了 3 次葡萄糖的流加, 每次流加 15 g。如图 10-A 所示, 发酵前期, 重组菌株的 OD 不及出发菌株, 但是稳定期后两者相差甚微; 40 至 72 h 为菌体积累精氨酸的重要时期, 此时重组菌株 L4 发酵产酸能力相对出发菌株 L0 来说优势较为明显, L-精氨酸的生成率明显提升。发酵 72 h 后, L4 的 L-精氨酸的产量为 52.2 g/L, 产率为 0.73 g/(L·h),

出发菌株 L0 的 L-精氨酸的产量为 39 g/L, 产率为 0.54 g/(L·h), L4 比 L0 菌株提高了 25.3%。另外, L4 共消耗了 137 g 葡萄糖, L0 消耗了 120 g 葡萄糖, 说明更多的葡萄糖消耗用于 L-精氨酸的产生。

3 讨论

L-精氨酸具有多种生理功能, 是合成蛋白质和肌酸的重要原料, 是人类和动物的半必需氨基酸, 在工业上应用广泛^[18-19]。关于 L-精氨酸的研究, 目前报道基本都以谷氨酸棒杆菌及其变种作为出发菌株, 从 L-精氨酸的合成途径入手。Ikeda 等通过敲除 *argR* 和弱化 N-乙酰谷氨酸激酶反馈抑制使得 L-精氨酸产量达到 52 g/L^[20]。Park SH 和 Shin JH 团队系统地优化 NADPH 水平及发酵优化, L-精氨酸产量达到 92.5 g/L, 目前为 L-精氨酸的最高水平^[21-22]。总的来看, 国内外关于 L-精氨酸的研究基本上都是从碳源的角度^[23-24]和 L-精氨酸本身的合成途径入手^[25-26], 几乎没有涉及到氮代谢对 L-精氨酸合成的影响。L-精氨酸的分子式中含有 4 个氮原子, 氮占到分子量的 32.1%, 在其发酵过程中需要大量的氮源供给, 因此提高胞内氮源的浓度, 有助于 L-精氨酸产量的增加^[27]。

本研究的主旨主要是通过提高胞内氮源的浓度从而增加 L-精氨酸的产量。结合前人关于棒杆菌中氮调节网络的研究, 如图 1 所示, 氮转录调控因子 *AmtR* 在不同的氮源环境下对胞内的转录运行存在调控^[28]。以产 L-精氨酸的谷氨酸棒杆菌 JNR 为出发菌株, 探究尿苷酰转移/去除酶 *GlnD*(UTase, UR)与信号转导蛋白 *GlnK* 之间的修饰关系。尿苷酰转移/去除酶是一个双功能的酶, 具有尿苷酰转移酶(UTase)和尿苷酰去除酶(UR)两种活性^[29]。L-精氨酸的发酵过程是一个高氮源

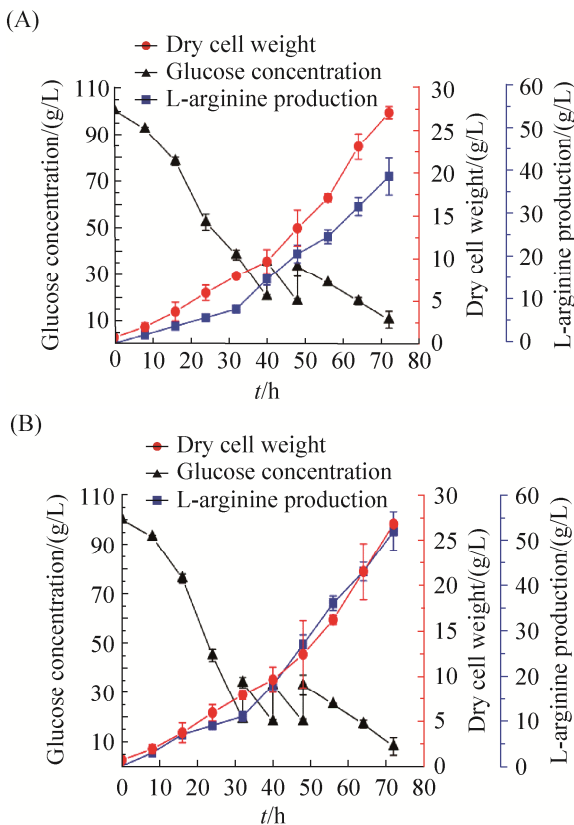


图 10. L0 和 L4 菌株在 5-L 发酵罐中的生长量、葡萄糖消耗以及 L-精氨酸的产量

Figure 10. The OD_{562} , glucose concentration and L-arginine production of strains in 5-L fermentation. Comparison of OD_{562} , glucose concentration and L-arginine production in the L4 and L0 strains under 5-L fermentation. A: L0 strain. B: L4 strain. The data represent the mean values and standard deviations obtained from at least three independent experiments.

的环境, 高氮源环境下尿苷酰去除酶的活力较强, 未被修饰的 GlnK 蛋白处于激活状态, 会结合膜上的铵转运的蛋白 AmtB, 胞外的 NH_4^+ 不能被运输进胞内, 激活状态下的 GlnK 蛋白不与 AmtR 结合, AmtR 结合在启动子 DNA 上, 抑制胞内的转录进行。

通过整合突变改造双功能尿苷酰转移/去除酶, 减弱尿苷酰去除酶的活性, 有助于胞内形成 GlnK-UMP, 更多的 NH_4^+ 进入胞内, L-精氨酸的产量增加。如图 8 所示, 在完全培养基中, L4 菌株 GlnK-UMP 明显高于 L3 菌株。最终, 改造菌株 L4 在摇瓶发酵时 L-精氨酸产量达到 (36.2 ± 1.2) g/L, 比对照菌株 L3 提高了 22.7%, 同时, 改造菌株消耗了更多的 NH_4^+ , 发酵结束胞外 NH_4^+ 浓度为 25 ± 1 mmol/L。实验结果说明研究的切入点是无误的, 有效地提高了胞内的 NH_4^+ 和 L-精氨酸的产量, 5-L 发酵罐流加发酵, 最终 L-精氨酸的产量为 52.2 g/L, 比野生型菌株提高了 25.3%。后期我们会从 NH_4^+ 的吸收和利用以及氮源固定的角度去开展实验, 进一步地将氮代谢与提高 L-精氨酸的产量结合起来。本研究扩宽了对 L-精氨酸研究的角度, 从碳代谢转到氮代谢, 为改造谷氨酸棒杆菌产 L-精氨酸的深入研究以及应用开发提供指导。

参考文献

- [1] Rehm N, Burkovski A. Engineering of nitrogen metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: influence on amino acid pools and production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(2): 239–248.
- [2] Chen QH, Han YL, Ma Y, Yan YL, Ping SZ, Lu W. Research progress on structure and evolution of biological nitrogen-fixation gene cluster. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(4): 129–138. (in Chinese)
陈清华, 韩云蕾, 马尧, 燕永亮, 平淑珍, 陆伟. 生物固氮基因簇结构与进化研究进展. 中国农业科技导报, 2013, 15(4): 129–138.
- [3] Merrick MJ, Edwards RA. Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(4): 604–622.
- [4] Hodgson DA. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 2000, 42: 47–238.
- [5] Martín JF. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(16): 5197–5201.
- [6] Jakoby M, Krämer R, Burkovski A. Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 173(2): 303–310.
- [7] Nolden L, Ngouoto-Nkili CE, Bendt AK, Krämer R, Burkovski A. Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: the role of *glnK* and *glnD*. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(5): 1281–1295.
- [8] Meier-Wagner J, Nolden L, Jakoby M, Siewe R, Krämer R, Burkovski A. Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB. *Microbiology*, 2001, 147(1): 135–143.
- [9] Beckers G, Strösser J, Hildebrandt U, Kalinowski J, Farwick M, Krämer R, Burkovski A. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(2): 580–595.
- [10] Buchinger S, Strösser J, Rehm N, Hänßler E, Hans S, Bathe B, Schomburg D, Krämer R, Burkovski A. A combination of metabolome and transcriptome analyses reveals new targets of the *Corynebacterium glutamicum* nitrogen regulator AmtR. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1/2): 68–74.
- [11] Mels CMC, Loots I, Schwedhelm E, Atzler D, Böger RH, Schutte AE. Nitric oxide synthesis capacity, ambulatory blood pressure and end organ damage in a black and white population: the SABPA study. *Amino Acids*, 2016, 48(3): 801–810.
- [12] Xu ZH, Dou WF, Wang X, Tao WY. Effects of nitrogen source and its supply manner on production of L-arginine by *Corynebacterium crenatum* JDN28-75. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(3): 381–385. (in Chinese)
许正宏, 窦文芳, 王霞, 陶文沂. 氮源及其添加模式对钝齿棒杆菌 JDN28-75 合成 L-精氨酸的影响. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 381–385.

- [13] Zhang YP, Pohlmann EL, Serate J, Conrad MC, Roberts GP. Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(11): 2711–2721.
- [14] Zhu Y, Guo YY, Ye ML, James FS. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1085(1): 143–146.
- [15] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, Yang J, Jin J, Xu ZH. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 255–266.
- [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] Wang HL, Postier BL, Burnap RL. Optimization of fusion PCR for in vitro construction of gene knockout fragments. *Biotechniques*, 2002, 33(1): 26–32.
- [18] Lu ZQ, Gong JH, Ding JY, Chen Q. Studies on the breeding of L-arginine-producing strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 1988, 28(2): 131–135. (in Chinese)
路志强, 龚建华, 丁久元, 陈琦. L-精氨酸产生菌诱变育种的研究. *微生物学报*, 1988, 28(2): 131–135.
- [19] Chen XL, Tang L, Jiao HT, Xu F, Xiong YH. Construction of *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 $\Delta argR$ and analysis of transcriptional levels of the related genes of arginine biosynthetic pathway. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(1): 92–98. (in Chinese)
陈雪岚, 汤立, 焦海涛, 徐峰, 熊勇华. 钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株构建及其缺失对精氨酸生物合成途径相关基因转录水平的影响. *微生物学报*, 2013, 53(1): 92–98.
- [20] Ikeda M, Mitsuhashi S, Tanaka K, Hayashi M. Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(6): 1635–1641.
- [21] Park SH, Kim HU, Kim TY, Park JS, Kim SS, Lee SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nature Communications*, 2014, 5: 4618.
- [22] Shin JH, Lee SY. Metabolic engineering of microorganisms for the production of L-arginine and its derivatives. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 166.
- [23] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(4): 631–640.
- [24] Jensen JVK, Eberhardt D, Wendisch VF. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the glutamate-derived compounds ornithine, proline, putrescine, citrulline, and arginine. *Journal of Biotechnology*, 2015, 214: 85–94.
- [25] Zhao QQ, Luo YC, Dou WF, Zhang X, Zhang XM, Zhang WW, Xu MJ, Geng Y, Rao ZM, Xu ZH. Controlling the transcription levels of *argGH* redistributed L-arginine metabolic flux in N-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2016, 43(1): 55–66.
- [26] Zhang JJ, Xu MJ, Ge XX, Zhang X, Yang TW, Xu ZH, Rao ZM. Reengineering of the feedback-inhibition enzyme N-acetyl-L-glutamate kinase to enhance L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, 44(2): 271–283.
- [27] Guo J, Man ZW, Rao ZM, Xu MJ, Yang TW, Zhang X, Xu ZH. Improvement of the ammonia assimilation for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, 44(3): 443–451.
- [28] Jakoby M, Nolden L, Meier-Wagner J, Krämer R, Burkovski A. AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 2000, 37(4): 964–977.
- [29] Zhang YP, Pohlmann EL, Roberts GP. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(3): 342–348.

Function of uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme GlnD in *Corynebacterium glutamicum* JNR

Jing Li¹, Meijuan Xu^{1,2*}, Qunfeng Shu¹, Yawen Zhao¹, Mi Tang¹, Xian Zhang¹, Taowei Yang¹, Zhenghong Xu¹, Zhiming Rao^{1*}

¹The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

²Institute of Food Biotechnology, Jiangnan University (Rugao), Rugao 226500, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We modified the bifunctional uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme GlnD to reduce the activity of uridylyl-removing enzyme, thus, increasing the NH_4^+ transition and application, to improve L-arginine production. [Methods] PII protein GlnK was overexpressed and its uridylation was studied. A *glnD*_{AA} (including H₄₁₄A and D₄₁₅A) mutant was generated from *C. glutamicum* JNR using the double-crossover chromosome replacement technique. The concentration of NH_4^+ in the fermentation medium was measured by ion chromatography. Then the resulting strain was cultivated in a 5-L stirring bioreactor to performed a fed-batch fermentation. [Results] The bifunctional uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme was successfully mutated in *C. glutamicum* JNR and the resulting strain L4 showed a weakened activity of uridylyl-removing enzyme. The shaking flask fermentation showed that the L4 strain consumed more NH_4^+ , and the L-arginine yield was 36.2 ± 1.2 g/L, 22.7% higher than the control strain. The production of L-arginine of L4 strain was 52.2 g/L, which was 25.3% higher than that of L0 strain in 5-L fermentation. [Conclusion] In *C. glutamicum*, nitrogen is necessary for the L-arginine biosynthesis. We conclude that reducing uridylyl-removing activity resulted in more intracellular GlnK-UMP. The GlnK-UMP interacts with the nitrogen regulator AmtR and enhances the intracellular consumption of NH_4^+ . Subsequently, the increased uptake of NH_4^+ could promote the L-arginine production in *C. glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum* JNR, uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme GlnD, NH_4^+ , L-arginine, integration mutation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770058, 31570085), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20181205), by the Research Project of the Chinese Ministry of Education (113033A), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51708A), and by the Thenational First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-06)

*Corresponding authors. Meijuan Xu, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; Zhiming Rao, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 12 January 2019; Revised: 26 February 2019; Published online: 7 March 2019