

谷氨酸棒杆菌 NAD 激酶的过表达对 L-异亮氨酸合成的促进作用

还晓静^{1,2}, 李坤^{1,2}, 史锋^{1,2}, 王小元^{1,2}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 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

还晓静, 李坤, 史锋, 等. 谷氨酸棒杆菌 NAD 激酶的过表达对 L-异亮氨酸合成的促进作用. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1038-1047.

Huan XJ, Li K, Shi F, et al. Overexpression of *Corynebacterium glutamicum* NAD kinase improves the L-isoleucine biosynthesis. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1038-1047.

摘要: NAD 激酶催化辅酶 I [NAD(H)] 发生磷酸化, 转变成辅酶 II [NADP(H)], 而还原态辅酶 II (NADPH) 是 L-异亮氨酸合成的必要辅因子。为了提高 NADPH 的供应, 首先克隆了谷氨酸棒杆菌 NAD 激酶基因 *ppnK*, 并利用大肠杆菌-棒状杆菌诱导型穿梭表达载体 pDXW-8 和组成型穿梭表达载体 pDXW-9 在 L-异亮氨酸合成菌——乳糖发酵短杆菌 JHI3-156 中进行表达。摇瓶发酵后, *ppnK* 诱导表达菌 JHI3-156/pDXW-8-*ppnK* 的 NAD 激酶酶活 (4.33 ± 0.74 U/g) 比 pDXW-8 空载菌提高了 83.5%, 辅酶 II 与辅酶 I 的比例提高了 63.8%, L-异亮氨酸产量 (3.86 ± 0.12 g/L) 提高了 82.9%; *ppnK* 组成表达菌 JHI3-156/pDXW-9-*ppnK* 的 NAD 激酶酶活 (7.67 ± 0.65 U/g) 比 pDXW-9 空载菌提高了 2.20 倍, 辅酶 II 与辅酶 I 的比例提高了 1.34 倍, NADPH 含量提高了 21.7%, L-异亮氨酸产量 (2.99 ± 0.18 g/L) 提高了 41.7%。这说明 NAD 激酶有助于辅酶 II 的供应和 L-异亮氨酸的生物合成, 这对于其他氨基酸的生产也有一定的参考依据。

关键词: L-异亮氨酸, NAD 激酶, 诱导型表达, 组成型表达, 乳糖发酵短杆菌

Received: December 21, 2011; **Accepted:** March 15, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30870056).

Corresponding author: Feng Shi. Tel/Fax: +86-510-85329236; E-mail: shifeng@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30870056) 资助。

Overexpression of *Corynebacterium glutamicum* NAD kinase improves L-isoleucine biosynthesis

Xiaojing Huan^{1,2}, Kun Li^{1,2}, Feng Shi^{1,2}, and Xiaoyuan Wang^{1,2}

¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: NAD kinase catalyzes the phosphorylation of coenzyme I [NAD(H)] to form coenzyme II [NADP(H)], and NADPH is an important cofactor in L-isoleucine biosynthesis. In order to improve NADPH supply, *ppnK*, the gene encoding NAD kinase in *Corynebacterium glutamicum* was cloned and separately expressed in an L-isoleucine synthetic strain, *Brevibacterium lactofermentum* JHI3-156, by an inducible expression vector pDXW-8 and a constitutive expression vector pDXW-9. Compared with the control strain JHI3-156/pDXW-8, NAD kinase activity of the inducible *ppnK*-expressing strain JHI3-156/pDXW-8-*ppnK* was increased by 83.5%. NADP(H)/NAD(H) ratio was also increased by 63.8%. L-isoleucine biosynthesis was improved by 82.9%. Compared with the control strain JHI3-156/pDXW-9, NAD kinase activity of the constitutive *ppnK*-expressing strain JHI3-156/pDXW-9-*ppnK* was increased by 220%. NADP(H)/NAD(H) ratio and NADPH concentration were increased by 134% and 21.7%, respectively. L-isoleucine biosynthesis was increased by 41.7%. These results demonstrate that NAD kinase can improve the coenzyme II supply and L-isoleucine biosynthesis, which would also be useful for biosynthesis of other amino acids.

Keywords: L-isoleucine, NAD kinase, inducible expression, constitutive expression, *Brevibacterium lactofermentum*

L-异亮氨酸 (L-isoleucine, Ile) 是高等动物的 8 种必需氨基酸之一, 世界卫生组织建议体重为 70 kg 的成年人每日摄取 1.4 g。L-异亮氨酸在饲料^[1]、食品、医药^[2]行业的应用非常广泛, 用量逐年增长^[3]。在国内, 工业上大多采用诱变筛选获得的菌株通过发酵生产 L-异亮氨酸, 产品得率及质量都难以参与国际竞争, 生产水平远远不能满足需求。

应用基因工程手段进行生产菌的定向育种, 能打破种属界限, 集中不同菌株的优点, 从而选育出高产、优质的基因工程菌^[4-5]。L-异亮氨酸的合成从天冬氨酸开始, 涉及 10 步反应。除了可以通过改造合成途径的关键酶^[6-7]之外, 还可以通过调节辅酶的供应来对 L-异亮氨酸的合成

途径进行分子改造。L-异亮氨酸合成所需的关键辅酶是 NADPH, 它是天冬氨酸 β -半醛脱氢酶 (ASD)、高丝氨酸脱氢酶 (HD) 和乙酰羟酸合酶 (AHAIR) 的辅酶。NADPH 还是细胞内最重要的还原力, 在还原性生物合成中起到氢供体的作用, 高效供应 NADPH 有利于发挥菌株的合成潜力^[8-9], 推动 L-异亮氨酸的进一步积累。

细胞内 NADPH 的主要供应渠道是 HMP 途径和 NAD 激酶, 其中 HMP 途径利用氧化态辅酶 II (NADP⁺) 作为电子受体生成还原态辅酶 II (NADPH), NAD 激酶则催化辅酶 I 发生磷酸化生成辅酶 II (图 1)。HMP 途径在产生 NADPH 的同时, 会消耗其他底物, 如葡萄糖^[10-11]; 而 NAD 激酶则只调节辅酶的转变, 不消耗其他碳源底

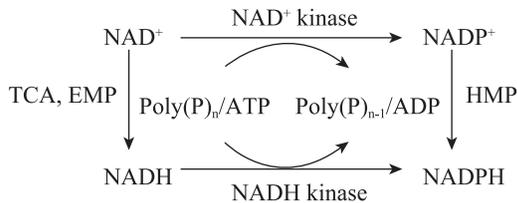


图1 辅酶 I 和辅酶 II 的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of coenzyme I and II.

物。NAD 激酶包括 NAD⁺激酶和 NADH 激酶，NAD⁺激酶利用 ATP 或多聚磷酸盐[poly(P)]作为磷酸供体，催化 NAD⁺发生磷酸化，生成 NADP⁺；而 NADH 激酶则催化 NAD⁺和 NADH 发生磷酸化，生成 NADP⁺和 NADPH^[12]。NAD 激酶催化的反应构成了 NADP⁺生物合成途径的最后一步，是生物细胞内唯一一种催化 NAD(H) 生成 NADP(H) 的反应。近年来，对 NAD 激酶的分子基础研究表明绝大多数生物体内都存在 NAD 激酶^[13]，它具有重要的生理功能。在氨基酸的主要生产菌谷氨酸棒杆菌中，存在一种利用 ATP 和 poly(P) 作为磷酸供体，催化 NAD⁺和 NADH 发生磷酸化的 NAD 激酶，即 poly(P)/ATP-NAD 激酶 (PpnK)。最近 Lindner 等在 L-赖氨酸生成菌中表达 PpnK，研究显示其有利于 L-赖氨酸积累^[14]。

目前国内应用基因工程手段来选育 L-异亮氨酸生成菌的研究已初步开展，但还未研究利用辅酶调控技术来提高其产量。L-异亮氨酸的生产菌株多以亲缘关系相近的谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*^[15]和乳糖发酵短杆菌 *Brevibacterium lactofermentum*^[16]为主。本文通过克隆谷氨酸棒杆菌的 *ppnK* 基因，并在一株 L-异亮氨酸合成菌——乳糖发酵短杆菌 JHI3-156 中表达，研究了它对胞内辅酶供应和对 L-异亮氨酸积累的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本实验中所用到的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 主要培养基

LB 培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母粉 5 g/L，NaCl 10 g/L，pH 7.0，相应的固体培养基中添加 20 g/L 的琼脂粉，需要时，添加 50 mg/L 卡那霉素。

LBG 培养基：在 LB 培养基中添加 50 g/L 葡萄糖，需要时，添加 30 mg/L 卡那霉素。

活化培养基：在 LB 培养基中添加 50 g/L 葡萄糖和 50 g/L 牛肉浸膏，相应的固体培养基中添加 15 g/L 的琼脂粉，需要时，添加 30 mg/L 卡那霉素。

种子培养基：葡萄糖 25 g/L，尿素 1.25 g/L，玉米浆 20 g/L，KH₂PO₄ 1 g/L，MgSO₄ 0.5 g/L，pH 7.0，需要时，添加 30 mg/L 卡那霉素。

发酵培养基：葡萄糖 100 g/L，(NH₄)₂SO₄ 20 g/L，玉米浆 20 g/L，KH₂PO₄ 1 g/L，MgSO₄ 0.5 g/L 和 CaCO₃ 20 g/L，pH 6.7，需要时，添加 30 mg/L 卡那霉素。携带诱导型表达载体的重组菌株，在发酵接种后 10 h 添加 IPTG (终浓度为 1 μmol/L) 诱导。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计和 *ppnK* 基因的扩增

根据 NCBI 中报道的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的 *ppnK* 基因 (GenBank Accession No. Cg1601) 设计上游引物 *ppnK*(F) 和下游引物 *ppnK*(R)，引物序列见表 2。引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> cloning strain	Novagen
DH5 α /pDXW-8- <i>ppnK</i>	<i>E. coli</i> DH5 α carrying pDXW-8- <i>ppnK</i>	This study
DH5 α /pDXW-9- <i>ppnK</i>	<i>E. coli</i> DH5 α carrying pDXW-9- <i>ppnK</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	<i>Corynebacterium</i> type strain	ATCC
<i>B. lactofermentum</i> JHI3-156	The L-isoleucine synthesis <i>B. lactofermentum</i> strain	JALC ^a
JHI3-156/pDXW-8	<i>B. lactofermentum</i> JHI3-156 carrying pDXW-8	This study
JHI3-156/pDXW-9	<i>B. lactofermentum</i> JHI3-156 carrying pDXW-9	This study
JHI3-156/pDXW-8- <i>ppnK</i>	<i>B. lactofermentum</i> JHI3-156 carrying pDXW-8- <i>ppnK</i>	This study
JHI3-156/pDXW-9- <i>ppnK</i>	<i>B. lactofermentum</i> JHI3-156 carrying pDXW-9- <i>ppnK</i>	This study
Plasmids		
pDXW-8	<i>Corynebacterium</i> inductive expression vector, Kan ^r , Amp ^r	[17]
pDXW-9	<i>Corynebacterium</i> constitutive expression vector, Kan ^r , Amp ^r	[18]
pDXW-8- <i>ppnK</i>	pDXW-8 carrying <i>ppnK</i> gene	This study
pDXW-9- <i>ppnK</i>	pDXW-9 carrying <i>ppnK</i> gene	This study

^a: Jinghai Amino Acid Liability Limited Company, Wuxi, China.

表 2 本研究使用的 PCR 引物

Table 2 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
ppnK(F)	CTAGCTAGCAGAAGGAGATATAGG ATG ACTGCACCCACGAACGCTG	46
ppnK(R)	AGAGAAGCTTTCGAA TTA CCCCGCTGACCTG	31

ppnK(F): the start codon is boxed; nt 1 to 22 of the *ppnK* gene are underlined; the ribosomal binding site is italicised; the *Nhe* I restriction site is indicated in bold; ppnK(R): the stop codon boxed; nt 963 to 948 of the *ppnK* gene are underlined; the *Hind* III restriction site is indicated in bold.

将谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 用 LBG 培养基在 37 °C、200 r/min 培养过夜，收集 3 mL 细胞，提取其基因组。以该基因组 DNA 为模板、ppnK(F) 和 ppnK(R) 为引物，通过 PCR 扩增出 *Nhe* I-*ppnK*-*Hind* III 片段。

1.2.2 重组质粒和工程菌株的构建

纯化后的 PCR 产物 *Nhe* I-*ppnK*-*Hind* III 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后，分别定向连接至大肠杆菌/棒状杆菌诱导型表达载体 pDXW-8^[17]和组成型表达载体 pDXW-9^[18]，并转化至大肠杆菌

DH5 α 感受态细胞, 得到阳性转化子 DH5 α /pDXW-8-*ppnK* 和 DH5 α /pDXW-9-*ppnK*。将阳性转化子提交上海生工生物工程有限公司测序。

参照文献方法[17]制备乳糖发酵短杆菌 JHI3-156 感受态细胞。将验证正确的质粒 pDXW-8、pDXW-9、pDXW-8-*ppnK* 和 pDXW-9-*ppnK* 用电转化方法转入 JHI3-156 感受态细胞, 于 LBHIS 培养基^[17]中培养 72 h, 挑取转化子, 得到 *ppnK* 表达菌株和空载菌株。

1.2.3 重组菌株的发酵

取出发菌株 JHI3-156 和重组菌株在活化平板上划线, 于 30 °C 培养 24 h。挑一满环活化平板上的菌体接种至 50 mL 种子培养基 (250 mL 锥形瓶) 中, 在 30 °C、200 r/min 培养 18 h。种子液按终浓度 $OD_{562}=1.0$ 的接种量转接入 50 mL 发酵培养基(500 mL 锥形瓶), 在 30 °C、200 r/min 发酵 72 h。进行了两批发酵, 每批每株菌株设 3 个平行样, 所有结果为这 2 批发酵的平均值。

发酵开始后, 每隔 6 h 取样, 测定发酵液菌体浓度和葡萄糖含量。测定葡萄糖含量时, 取 1 mL 培养液, 12 000 r/min 离心 5 min 得到发酵上清液, 稀释 100 倍后, 用山东省科学院生产的生物传感分析仪测定葡萄糖含量。

1.2.4 NAD 激酶酶活的测定

发酵结束后, 收集菌体, 用 KNDE 缓冲液 (1.0 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , pH 7.0, 0.1 mmol/L NAD^+ , 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA) 洗涤 3 次, 加入 10 mL KNDE 缓冲液重悬细胞, 加入 100 μ L 溶菌酶 (100 g/L) 处理后, 在冰水里超声波破碎 2 h, 在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后, 收集上清。上清中蛋白质含量用 Bradford 法在核酸-蛋白定量仪 (GeneQuant 公司) 上测定。

ATP- NAD^+ 激酶的酶活测定方法参照文献[19], 测定吸光度值 OD_{340} 变化。酶活定义为: 在 30 °C、1 mL 反应体系中, 每分钟催化得到 1 μ mol $NADP^+$ 的酶量为 1 U, 比酶活用 U/mg 或 U/g 表示。

1.2.5 NAD(H)和 NADP(H)浓度的测定

发酵 24 h 时, 取 1 mL 发酵液 2 份, 离心去上清, 菌体置于液氮急速淬灭后存放于 -70 °C 冰箱。测定辅酶含量时, 取出菌体, 置于冰水混合物中用冷的 PBS (pH 7.5) 清洗 1 次, 然后参照文献方法^[20]测定 4 种辅酶 NAD^+ 、 $NADH$ 、 $NADP^+$ 、 $NADPH$ 含量。细胞干重按经验公式计算: Y (g/L DCW) = $0.6495 \times OD_{562} - 2.7925$; 细胞体积按每 mg DCW 为 1.6 μ L 计算。

1.2.6 氨基酸含量的测定

发酵过程中, 每隔 6 h 取 1 mL 培养液, 12 000 r/min 离心 5 min 得到发酵上清液, 用 5% 三氯乙酸稀释 50 倍, 静置 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min 得到上清液, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后, 采用高效液相色谱系统 (Agilent 公司 1200 series 色谱仪) 自动柱前衍生法测定氨基酸含量。色谱柱: Agilent Eclipse-AAA 柱。流动相水相 (1 L): 4.52 g 无水乙酸钠、200 μ L 三乙胺、5 mL 四氢呋喃、pH 7.2; 有机相 (1 L): 4.52 g 无水乙酸钠、400 mL 甲醇、400 mL 乙腈。色谱条件: 柱温 40 °C, 流速 1.0 mL/min, DAD 检测器。

2 结果与分析

2.1 *ppnK* 表达质粒和菌株的构建

以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组为模板, 通过 PCR 扩增得到 1 002 bp 的 *Nhe* I-*ppnK*-*Hind* III 基因片段, 分别连入 9 548 bp 的 pDXW-8 和 8 351 bp 的 pDXW-9 表达载体中构建

ppnK 表达质粒。

pDXW-8 为大肠杆菌-棒状杆菌诱导型穿梭表达载体, 该载体使用 *lacI^{PF104}* 控制的 *tac* 启动子和 *rrnBT1T2* 终止子来控制插入基因的表达^[17]。pDXW-9 是大肠杆菌-棒状杆菌组成型穿梭表达载体, 该载体使用 *tac* 启动子和 *rrnBT1T2* 终止子来控制目的基因的表达^[18]。

将基因片段 *Nhe* I -*ppnK*-*Hind* III 和表达载体 pDXW-8 或 pDXW-9 用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌, 得到 DH5 α /pDXW-8-*ppnK* 和 DH5 α /pDXW-9-*ppnK* 转化子。提取质粒, 经过 *Hind* III 单酶切和 *ppnK* 基因扩增、测序, 证明构建得到 10 488 bp 的 pDXW-8-*ppnK* 和 9 291bp 的 pDXW-9-*ppnK* 重组质粒。

将重组质粒 pDXW-8-*ppnK* 和 pDXW-9-*ppnK* 电转化乳糖发酵短杆菌 JHI3-156, 得到 JHI3-156/pDXW-8-*ppnK* 和 JHI3-156/pDXW-9-*ppnK* 转化子, 提取质粒, 通过 *Hind* III 单酶切和 *ppnK* 基因扩增, 证明构建得到 JHI3-156/pDXW-8-*ppnK* 和 JHI3-156/pDXW-9-*ppnK* 重组菌株。将空载体 pDXW-8 和 pDXW-9 转化 JHI3-156, 得到 JHI3-156/pDXW-8 和 JHI3-156/pDXW-9 空载菌株。

2.2 重组菌的摇瓶发酵

将构建的 4 株重组菌 JHI3-156/pDXW-8、JHI3-156/pDXW-9、JHI3-156/pDXW-8-*ppnK*、JHI3-156/pDXW-9-*ppnK* 与出发菌 JHI3-156 进行摇瓶发酵, 测定发酵过程中菌体的生长状况、NAD 激酶表达情况和 ATP-NAD⁺激酶酶活、辅酶含量以及 L-异亮氨酸产量。通过比较各菌株的发酵性能差异, 分析诱导型和组成型表达 NAD

激酶对 L-异亮氨酸产量的影响。

2.2.1 重组菌的生长情况

摇瓶发酵 72 h, 各菌株的生长情况见图 2。发酵过程中 *ppnK* 表达菌和出发菌生长状态良好, 36 h 后进入稳定期, 之后菌体缓慢增长。出发菌 JHI3-156 在无抗生素和诱导剂的条件下培养, 生长最好, 72 h 时 OD_{562} 值达到 26.8 ± 1.8 , 而 pDXW-8 和 pDXW-9 空载菌则因携带了质粒生长减缓。 *ppnK* 的诱导表达对细胞生长无不良影响, 72 h 时 OD_{562} 为 24.9 ± 0.8 , 比空载菌株 JHI3-156/pDXW-8 (18.9 ± 0.3) 提高了 31.7%。 *ppnK* 组成型表达对菌体的生长也有促进作用, 72 h 时 OD_{562} 为 25.0 ± 0.5 , 比空载菌株 JHI3-156/pDXW-8 (20.4 ± 0.2) 提高了 22.5%, 说明 NAD 激酶的表达有助于细胞生长。

2.2.2 重组菌的胞内 NAD 激酶酶活

谷氨酸棒杆菌的 PpnK 是一种利用 ATP 和 poly(P) 作为磷酸供体, 催化 NAD⁺和 NADH (辅酶 I) 发生磷酸化生成 NADP⁺和 NADPH (辅酶

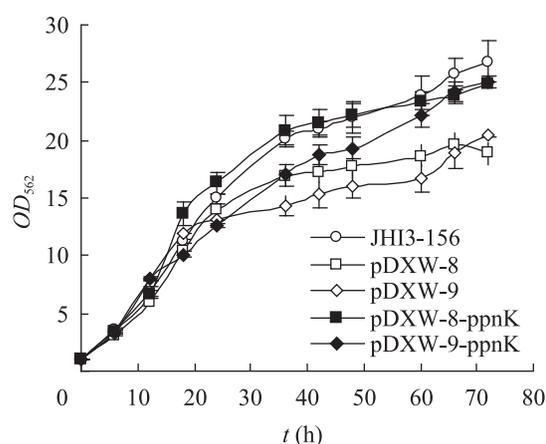


图 2 乳糖发酵短杆菌摇瓶发酵生长曲线

Fig. 2 Cell growth of five *Brevibacterium lactofermentum* strains.

II) 的 NAD 激酶。各菌株发酵 72 h 后细胞破碎液上清中 ATP-NAD⁺激酶的活性如图 3 所示。而它们的 ATP-NADH 激酶活性很低。

在出发菌和两株空载菌中 ATP-NAD⁺激酶的酶活力较低, 而在 *ppnK* 表达菌中, 酶活显著提高, 其中 *ppnK* 组成型表达菌的 ATP-NAD⁺激酶酶活 (7.67 ± 0.65 U/g) 比 pDXW-9 空载菌 (2.40 ± 0.23 U/g) 提高了 2.20 倍, *ppnK* 诱导型表达菌的酶活 (4.33 ± 0.74 U/g) 比 pDXW-8 空载菌 (2.36 ± 0.72 U/g) 提高了 83.5%, 说明 *ppnK* 基因的表达提高了细胞内 NAD 激酶活力。

2.2.3 重组菌的胞内辅酶含量

由于 6~36 h 是菌体的快速生长期 (图 2), 而 JHI3-156/pDXW-8-*ppnK* 在发酵 10 h 进行诱导表

达, 于是我们检测了发酵 24 h 时各菌株胞内的 4 种辅酶含量, 结果见表 3。

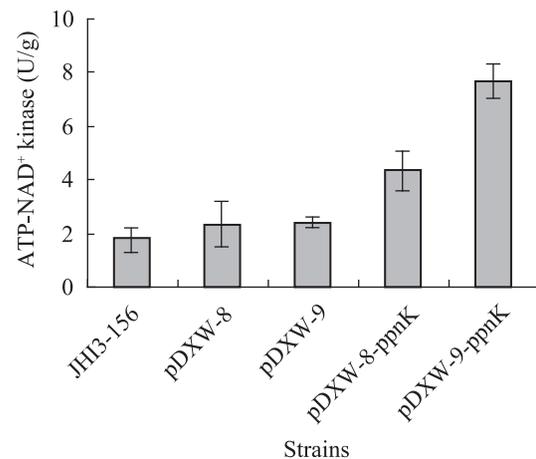


图 3 发酵菌株细胞内的 ATP-NAD⁺激酶活性

Fig. 3 ATP-NAD⁺ kinase activities of five *Brevibacterium lactofermentum* strains.

表 3 乳糖发酵短杆菌发酵 24 h 时的细胞内辅酶含量

Table 3 Intracellular NAD⁺, NADH, NADP⁺, and NADPH concentrations of five *Brevibacterium lactofermentum* strains after fermentation for 24 h

Concentration (mmol/L)	JHI3-156	JHI3-156/pDXW-8	JHI3-156/pDXW-9	JHI3-156/pDXW-8- <i>ppnK</i>	JHI3-156/pDXW-9- <i>ppnK</i>
NAD ⁺	0.555±0.023	0.313±0.026	0.331±0.024	0.250±0.030	0.247±0.031
NADH	0.129±0.005	0.030±0.006	0.089±0.007	0.045±0.011	0.037±0.013
NADP ⁺	0.094±0.003	0.068±0.005	0.083±0.004	0.123±0.005	0.156±0.004
NADPH	0.068±0.003	0.071±0.006	0.069±0.005	0.073±0.006	0.084±0.005
NADP(H)/NAD(H)	0.237	0.406	0.361	0.665	0.845

由表 3 可知: 发酵 24 h, *ppnK* 诱导表达菌的细胞内 NADP⁺浓度比 pDXW-8 空载菌高 80.9%, 辅酶 II (NADP⁺+NADPH) 与辅酶 I (NAD⁺+NADH) 的比例比空载菌高 63.8%, 比出发菌 JHI3-156 高 1.80 倍; *ppnK* 组成型表达菌的细胞内 NADP⁺浓度比 pDXW-9 空载菌高 88.0%, NADPH 浓度比空载菌高 21.7%, 而辅酶 II 与辅酶 I 的比例比空载菌高 1.34 倍, 比 JHI3-156 高

2.56 倍。说明在发酵 24 h 时, 重组菌中 *ppnK* 基因的过量表达和 NAD 激酶酶活的提高促进了胞内辅酶 II 的合成, 其中 *ppnK* 基因的组成型表达更有利于提高细胞内 NADP⁺与 NADPH 的供应。

2.2.4 重组菌发酵后的氨基酸含量

最后我们检测了发酵过程中重组菌和出发菌的发酵液中葡萄糖和 L-异亮氨酸含量变化 (图 4)。

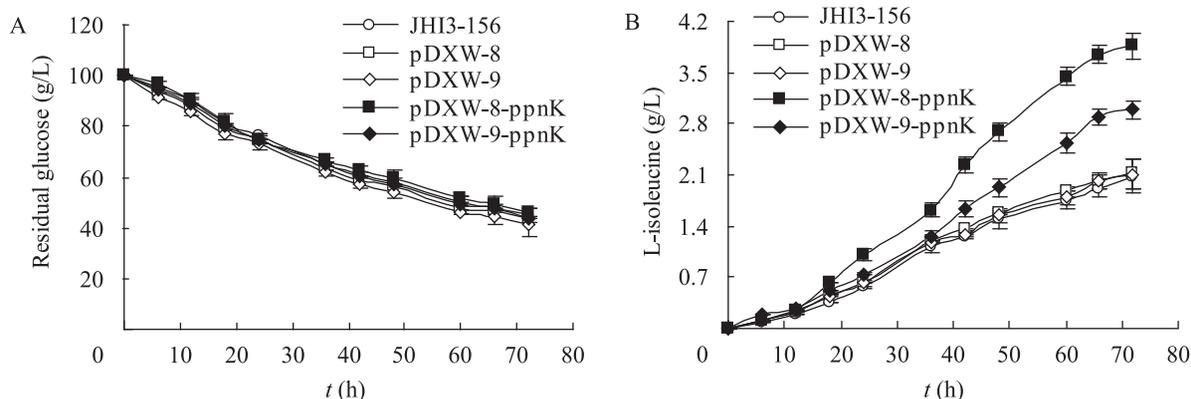


图 4 乳糖发酵短杆菌摇瓶发酵过程曲线

Fig.4 Process curves of five *Brevibacterium lactofermentum* strains. (A) Concentration of glucose. (B) Concentration of L-isoleucine.

从图 4 中可以看出, 5 株菌株消耗葡萄糖的规律是基本一致的, 在发酵过程的 12~48 h 快速消耗葡萄糖; 5 株菌株的 L-异亮氨酸积累进程则存在较大差异, 在发酵 12 h 前各个菌株仅合成少量的 L-异亮氨酸, 在 18 h 后, 添加诱导剂的诱导表达菌的 L-异亮氨酸合成速率开始高于其他菌株, 在 24 h 后产量开始明显增加, 而在 36 h 后组成型表达菌也开始以较快的速度积累 L-异亮氨酸。在发酵 72 h 后, *ppnK* 诱导表达菌的 L-异亮氨酸产量 (3.86 ± 0.12 g/L) 比 pDXW-8 空载菌 (2.11 ± 0.21 g/L) 提高了 82.9%, 而 *ppnK* 组成型表达菌的 L-异亮氨酸产量 (2.99 ± 0.18 g/L) 比 pDXW-9 空载菌 (2.11 ± 0.23 g/L) 提高了 41.7%, 且分别比出发菌 JHI3-156 (2.08 ± 0.20 g/L) 提高了 85.6% 和 43.8%, 说明通过表达 *ppnK* 基因来提高胞内 NADP⁺ 和 NADPH 的供应有利于 L-异亮氨酸的积累。与空载菌和出发菌相比, *ppnK* 表达菌的糖酸转化率也显著提高, 尤其是 *ppnK* 诱导表达菌 (0.0719 g/g) 比出发菌 (0.0377 g/g)

和空载菌 (0.0370 g/g) 分别提高了 90.7% 和 94.3%, 而 *ppnK* 组成表达菌 (0.0534 g/g) 比出发菌和空载菌 (0.0358 g/g) 分别提高了 41.6% 和 49.2%。*ppnK* 表达菌的异亮氨酸产率 (异亮氨酸产量/细胞干重) 也得到一定程度的提高。*ppnK* 诱导表达菌为 0.289 g/g, 组成表达菌为 0.222 g/g, 都比出发菌 JHI3-156 (0.142 g/g) 有了较大的提高, 但与对应的空载菌 JHI3-156/pDXW-8 (0.223 g/g) 和 JHI3-156/pDXW-9 (0.201 g/g) 相比, 提高幅度分别降至 29.6% 和 10.4%, 这与空载菌生长速率较慢有关。

3 结论

本研究构建了 2 个重组质粒 pDXW-8-*ppnK* 和 pDXW-9-*ppnK* 以及 4 株重组乳糖发酵短杆菌 JHI3-156/pDXW-8, JHI3-156/pDXW-9, JHI3-156/pDXW-8-*ppnK* 和 JHI3-156/pDXW-9-*ppnK*。摇瓶发酵时, 虽然 2 株空载菌的生长速率略微降低, 但 2 株 *ppnK* 基因表达菌的菌体生长状态良好,

说明 NAD 激酶的表达有利于细胞的生长。与 JHI3-156/pDXW-8 相比, *ppnK* 诱导表达菌的胞内 ATP-NAD⁺激酶的酶活提高了 83.5%, 发酵 24 h 时胞内 NADP⁺浓度提高了 80.9%, NADPH 浓度提高了 21.7%, 辅酶 II 与辅酶 I 的比例提高了 63.8%, 最终 L-异亮氨酸产量提高了 82.9%。与 JHI3-156/pDXW-9 相比, *ppnK* 组成型表达菌的胞内 ATP-NAD⁺激酶的酶活提高了 2.20 倍, 发酵 24 h 时胞内 NADP⁺浓度提高了 88.0%, 辅酶 II 与辅酶 I 的比例提高了 1.34 倍, 最终 L-异亮氨酸产量提高了 41.7%。2 株重组菌的异亮氨酸产量、产率和得率都高于出发菌株。

这些结果表明, 过量表达谷氨酸棒杆菌 NAD 激酶, 能够提高发酵细胞内辅酶 II 的含量, 为 L-异亮氨酸的合成提供更为充足的必需还原力, 推动 L-异亮氨酸积累, 同时也抵消了负荷载体对细胞生长的不利影响。与 *ppnK* 的诱导表达相比, 虽然 *ppnK* 的组成型表达更有利于辅酶 II 的合成, 但对 L-异亮氨酸合成的促进作用却不如前者, 一部分原因可能在于外源基因的组成型表达对细胞正常代谢造成影响, 因为菌体在不同的生长时期对辅酶 II 的需求量是不同的, 而辅酶 II 与辅酶 I 的比例也对发酵进程产生影响, 组成型表达所产生的辅酶影响了菌体各个时期胞内辅酶含量平衡, 影响了细胞内的代谢流向。

而本研究证明在细胞快速生长到一定程度后再过量表达 NAD 激酶, 有助于产生的辅酶 II 更多地被 L-异亮氨酸合成途径所利用, 从而达到更好的辅酶供应调控效果。说明在 L-异亮氨酸合成时, 虽然辅酶 II 的积累有利于产量提高, 但也应根据代谢途径对辅酶的形式和含量的动态需求, 通过调整 NAD 激酶表达的强度和表达的阶

段性等方面, 来满足 L-异亮氨酸积累时所需要的辅酶量。对此, 未来将进行小试发酵罐的实验, 测定在良好的发酵环境下, 两株重组菌及对照菌株生长、糖耗和产酸的情况, 并进行全面分析, 希望能得到更有价值的结论。

本文报道了利用 NAD 激酶来提高乳糖发酵短杆菌的 L-异亮氨酸产量。分析了诱导型和组成型表达 NAD 激酶对发酵菌株的生长, NAD 激酶酶活, 辅酶含量和氨基酸产量的影响。结果表明, 通过过量表达辅酶 II 合成关键酶, 有助于提高 NADP(H) 的供应, 从而提高 L-异亮氨酸产量, 本研究为通过辅酶调控手段来提高合成途径中 NADPH 的供应, 进而运用于氨基酸生产提供了一定的参考。

REFERENCES

- [1] Ahmed I, Khan MA. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Br J Nutr*, 2006, 96(3): 450-460.
- [2] Murata K, Moriyama M. Isoleucine, an essential amino acid, prevents liver metastases of colon cancer by antiangiogenesis. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3263-3268.
- [3] Yoshizawa F. New therapeutic strategy for amino acid medicine: notable functions of branched chain amino acids as biological regulators. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118(2): 149-155.
- [4] Park JH, Lee SY. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(3): 491-506.
- [5] Guillouet S, Rodal AA, An G-H, et al. Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on isoleucine production. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(7): 3100-3107.

- [6] Hashiguchi K, Takesada H, Suzuki E, et al. Construction of an L-isoleucine overproducing strain of *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(4): 672–679.
- [7] Guillouet S, Rodal AA, An GH, et al. Metabolic redirection of carbon flow toward isoleucine by expressing a catabolic threonine dehydratase in a threonine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(5): 667–673.
- [8] Takeno S, Murata R, Kobayashi R, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(21): 7154–7160.
- [9] Lee HC, Kim JS, Jang W, et al. High NADPH/NADP⁺ ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *J Biotechnol*, 2010, 149(1/2): 24–32.
- [10] Bartek T, Blombach B, Zönnchen E, et al. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(2): 361–371.
- [11] Wang Z, Chen T, Ma X, et al. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour Technol*, 2011, 102(4): 3934–3940.
- [12] Shi F, Li YF, Li Y, et al. Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 41(5): 352–361.
- [13] Kawai S, Fukuda C, Murata K. Function and structure of NAD kinase: the key enzyme for biosynthesis of NADP(H)]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2007, 52(3): 243–248.
- [14] Lindner SN, Niederholtmeyer H, Schmitz K, et al. Polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase of *Corynebacterium glutamicum*: biochemical properties and impact of *ppnK* overexpression on lysine production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(2): 583–593.
- [15] Krömer JO, Heinzle E, Schröder H, et al. Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. *J Bacteriol*, 2006, 188(2): 609–618.
- [16] Peng ZJ, Fang J, Li JH, et al. Combined dissolved oxygen and pH control strategy to improve the fermentative production of L-isoleucine by *Brevibacterium lactofermentum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33(3): 339–345.
- [17] Xu DQ, Tan YZ, Huan XJ, et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(1): 86–92.
- [18] Xu DQ, Tan YZ, Shi F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2010, 64(2): 85–91.
- [19] Shi F, Kawai S, Mori S, et al. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 2005, 272(13): 3337–3349.
- [20] Li ZJ, Cai L, Wu Q, et al. Overexpression of NAD kinase in recombinant *Escherichia coli* harboring the *phbCAB* operon improves poly (3-hydroxybutyrate) production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(5): 939–947.