



过量表达苏氨酸脱水酶对谷氨酸棒杆菌合成 *L*-异亮氨酸的影响

史建明, 徐兰兰, 谢希贤, 陈 宁

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 考察过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶对谷氨酸棒杆菌发酵生产 *L*-异亮氨酸的影响. 将解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶基因 *ilvA* (F383V) 连接大肠杆菌/谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pXMJ19, 过量表达于 *L*-异亮氨酸生产菌株 *Corynebacterium glutamicum* YILW. 经 5 L 发酵罐分批补料发酵产酸实验, 与出发菌株 *C. glutamicum* YILW 相比, 耗糖高峰期滞后, *L*-异亮氨酸产量增加了 10.3%, 副产物 *L*-蛋氨酸、*L*-赖氨酸含量分别降低了 33.3%、26.5%, 发酵液中没有 *L*-苏氨酸的累积, 乳酸的累积量增加了 41.7%. 对发酵稳定期的代谢流分布研究表明, 过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶使 HMP 途径流量增加了 31.7%, *L*-异亮氨酸生物合成途径的代谢流提高了 8.5%.

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 解除反馈抑制; 苏氨酸脱水酶; 过量表达; 代谢流量

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)03-0006-06

Effect of Overexpression of Feedback-Resistant Threonine Dehydratases on *L*-Isoleucine Production in *Corynebacterium glutamicum*

SHI Jian-ming, XU Lan-lan, XIE Xi-xian, CHEN Ning

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effect of overexpressing *ilvA* (F383V) gene encoding feedback-resistant threonine dehydratase in a *L*-isoleucine producing strain *C. glutamicum* YILW was studied. A fragment of *ilvA* (F383V) gene was proliferated by polymerase chain reaction using chromosomal DNA of *C. glutamicum* YILW as the template. The obtained fragment was inserted into *E. coli/C. glutamicum* shuttle vector pXMJ19 to construct an expression plasmid pXMJ19-*ilvA* (F383V). The recombinant plasmid pXMJ19-*ilvA* (F383V) and empty plasmid pXMJ19 were respectively transformed into *C. glutamicum* YILW by electroporation. Fed-batch cultures of *C. glutamicum* YIMJ383 were carried out in 5 L fermentor. The results showed that the yield of *L*-isoleucine by the recombinant was increased by 10.3% without any *L*-threonine as a by-product. The concentrations of *L*-methionine and *L*-lysine were decreased by 33.3% and 26.5%, respectively. The accumulation of lactic acid was 41.7% higher than that of the parent strain. In order to study the effects of overexpressing *ilvA* (F383V) gene on the metabolic flux distributions, the metabolic flux analysis of the *L*-isoleucine production at pseudo steady state was conducted. The research indicated that HMP pathway flux increased by 31.7%, *L*-isoleucine biosynthesis pathway flux increased by 8.5%.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; feedback-resistant; threonine dehydratase; overexpression; metabolic flux

L-异亮氨酸 (*L*-isoleucine, Ile) 是人体八种必需氨基酸之一, 是合成人体激素与酶类的原料^[1-2]. *L*-异亮氨酸主要用于配制营养型复合氨基酸输液和要

素膳, 特别是以 *L*-异亮氨酸为主要原料生产的肝安干糖浆、治肝灵口服液^[3], 对治疗各种肝脏疾病具有显著疗效, 因此在食品和医药行业具有广泛的应用及

收稿日期: 2010-11-24; 修回日期: 2011-01-19

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划(08JCZDJC15400)

作者简介: 史建明(1984—), 男, 河北省沧县人, 硕士研究生; 通信作者: 陈 宁, 教授, ningch@tust.edu.cn.

商业价值。

苏氨酸脱水酶 (threonine dehydratase, EC 4.3.1.19) 是 L-异亮氨酸生物合成途径中第一个限速酶^[4-5], 其活性受终产物 L-异亮氨酸的反馈抑制。大量实验表明, 协调地表达途径中解除反馈抑制的关键酶可以提高目的产物的代谢流量, 减少中间产物的积累及副产物形成^[6]。Guillouet 等^[7]通过在 L-赖氨酸生产菌中表达 L-异亮氨酸合成途径中同型丝氨酸激酶、苏氨酸合成酶、乙酰羧基合酶及解除反馈抑制的高丝氨酸脱氢酶和苏氨酸脱水酶, 成功构建了 L-异亮氨酸产生菌。

本实验是在文献[8]的基础上, 通过过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶, 考察其对 L-异亮氨酸发酵与代谢流分布的影响, 以期为 YILW 的进一步改造提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株 L-异亮氨酸产生菌 *C. glutamicum* YILW, 质粒为大肠杆菌谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pXMJ19。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Xba* I、*Hind*III 和 T4DNA 连接酶, TaKaRa 公司; 细菌基因组提取试剂盒、质粒快速提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒, 北京博迈德公司; 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基及培养方法

培养基成分与配制见参考文献[9]。

斜面菌种活化培养: 取斜面保藏菌种划线接种于活化斜面, 31 °C 恒温培养 24 h。

种子培养: 接 1 环生长良好的斜面种子于装有 30 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于旋转式摇床, 31 °C、200 r/min 振荡培养 14~15 h。

5 L 发酵罐培养: 装液量 3 L, 10% 接种量, 通气量 3 L/min, 根据溶解氧需要调节搅拌转速 300~800 r/min, 通过自动流加 25% 氨水控制 pH (7.0 ± 0.2), 培养温度 31 °C, 以泡敌消泡, 发酵到一定时间流加 80% 葡萄糖溶液, 发酵培养 60 h。

1.2 *ilvA*(F383V) 基因的 PCR 扩增

根据 *C. glutamicum* YILW 苏氨酸脱水酶基因测序结果设计用于构建重组质粒引物, 上游 P1: 5'-GCGAAGCTTATAGCATTGTTCTACAAAGAGCT-3'

(划线处为 *Hind*III 酶切位点), 下游 P2: 5'-GCGTCTAGACGATCCTGACCCGAACTAG-3', (划线处为 *Xba* I 酶切位点)。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。细菌基因组提取、酶切、DNA 片段回收、纯化、与载体连接及转化等操作参见参考文献[10]。

1.3 表达载体 pXMJ19-*ilvA*(F383V) 的构建及鉴定

使用 *Xba* I 和 *Hind*III 对 *ilvA* (F383V) 基因 PCR 产物及质粒 pXMJ19 分别进行双酶切, 连接产物化学法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含 12.5 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板上 37 °C 培养, 挑选阳性克隆使用双酶切对重组质粒 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 进行验证。

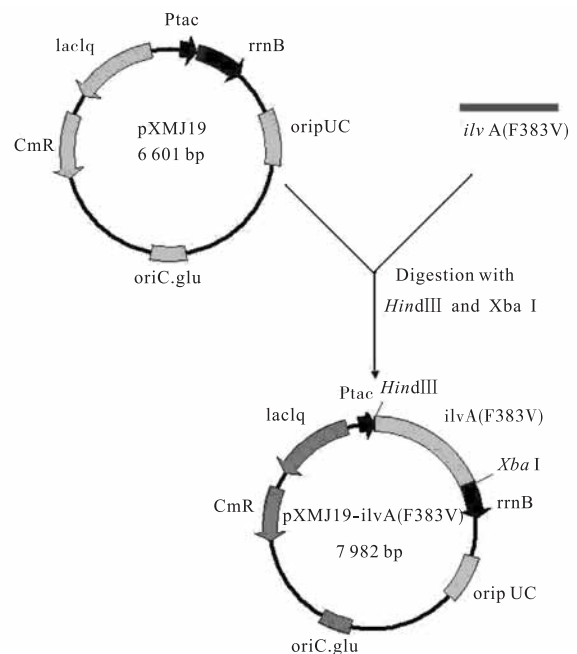


图1 质粒 pXMJ19-*ilvA*(F383V) 的构建
Fig.1 Construction of plasmid pXMJ19-*ilvA*(F383V)

1.4 *C. glutamicum* 感受态细胞的制备、电击转化和筛选

C. glutamicum 感受态细胞的制备与电击转化方法参考文献[11], 取适量菌液涂布含有 12.5 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板, 32 °C 培养, 挑选阳性克隆。

1.5 SDS-PAGE 分析

采用 5% 浓缩胶及 12% 分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白分离, 以 *C. glutamicum* ATCC13032 作为对照, 比较 YILW 及 YIMJ383 蛋白表达情况。

1.6 质粒稳定性

取一定量发酵液用生理盐水梯度稀释到合适浓度, 取适量菌悬液涂布到 LB 平板上, 31 °C 培养

48 h. 挑取单菌落分别转接到 LB 平板和含有氯霉素抗性的 LB 平板上, 培养 48 h, 记录各平皿菌落数. 以在抗性平板上长出菌落数与在非抗性平板上长出菌落数的百分比表示质粒稳定性.

1.7 参数测定

生物量测定: 以菌体干质量表示. 取 10 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 2 次, 置于 80 °C 真空干燥箱中烘干至恒质量, 使用分析天平称量.

葡萄糖浓度: 采用 SBA-40C 型生物传感仪(山东科学院生物研究所)测定.

氨基酸含量测定: 按文献[12]的方法测定.

1.8 代谢流量的分析

据文献[13-14]报道建立代谢网络, 在 L-异亮氨酸发酵中后期离线测定葡萄糖、异亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、缬氨酸及乳酸的浓度, 对其进行数值微分求得各种副产物和目的产物的积累速率, 利用 Matlab 软件 linprog 函数^[15]求得代谢流分布.

2 结果与分析

2.1 *ilvA*(F383V)基因的扩增及表达质粒 pXMJ19-*ilvA*(F383V)的构建

以 *C. glutamicum* YILW 基因组为模板, 以 P1 与 P2 为引物, 通过 PCR 扩增得到大小约 1 400 bp 的苏氨酸脱水酶基因片段, 如图 2(a) 所示.

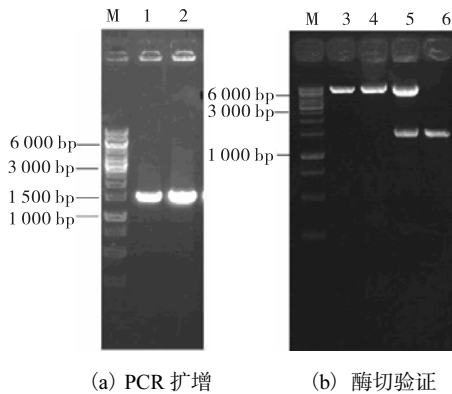


图2 *ilvA* (F383V)基因的 PCR 扩增及重组质粒的酶切验证
Fig.2 PCR amplification of *ilvA* (F383V) gene and restriction confirmation of recombinant plasmid

经限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind*III 双酶切消化后, 通过琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 同样对穿梭质粒 pXMJ19 进行双酶切, 在 T4DNA 连接酶作用下, *ilvA* (F383V) 基因定向克隆到穿梭质粒 pXMJ19 中, 得到重组表达质粒 pXMJ19-*ilvA* (F383V).

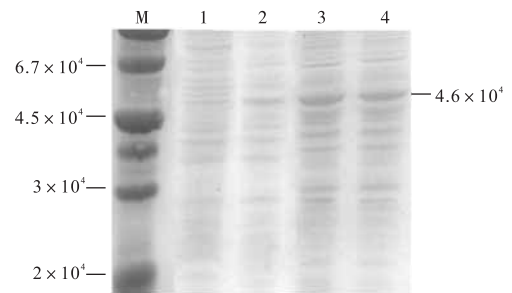
对重组质粒 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 进行双酶切验证和 PCR 验证, 结果如图 2(b) 所示, pXMJ19-*ilvA* (F383V) 经 *Xba* I 和 *Hind*III 双酶切得到两条特异性条带, 大小分别约为 6 800 bp 和 1 400 bp, 以 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 为模板, 使用引物 P1、P2 进行扩增, 可得到大小约 1 400 bp 的特异性条带; pXMJ19 经 *Xba* I 和 *Hind*III 双酶切后仅有 1 条特异性条带. 从而证明重组质粒 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 构建正确.

2.2 *C. glutamicum* 感受态细胞的制备、电击转化和筛选

分别将质粒 pXMJ19 和 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 电击转化 *C. glutamicum* YILW 感受态细胞, 利用氯霉素抗性筛选阳性克隆子, 从平板挑取单菌落接种到含氯霉素的 LB 液体培养基, 32 °C 过夜培养, 提取质粒进行双酶切验证, 结果与图 2 一致, 并获得重组菌 *C. glutamicum* YIMJ19 和 *C. glutamicum* YIMJ383.

2.3 SDS-PAGE 分析

为了检测 *ilvA* (F383V) 基因在 *C. glutamicum* YILW 中的表达水平, 实验对粗酶液进行了 SDS-PAGE 分析. 以 *C. glutamicum* ATCC13032 为对照, 比较 *C. glutamicum* YILW 和重组菌 *C. glutamicum* YIMJ383 的蛋白表达情况. 从蛋白电泳图谱上可以看出重组菌有相对分子质量约为 4.6×10^4 的蛋白表达带(图 3). 这进一步证明了表达载体 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 构建成功, 苏氨酸脱水酶得到过量表达.



M. protein marker; 1. *C. glutamicum* ATCC13032; 2. *C. glutamicum* YILW; 3, 4. *C. glutamicum* YIMJ383

图3 粗酶液 SDS-PAGE 分析
Fig.3 SDS-PAGE analysis of crude cell extracts

2.4 质粒稳定性

质粒不稳定性是重组基因工程菌培养过程中的常见问题, 也是影响外源基因高效表达的限制因素之一^[16-17]. 分别在摇瓶发酵培养 0、10、20、30、40、50 h, 测定质粒稳定性, 并比较质粒 pXMJ19 和 pXMJ19-*ilvA* (F383V) 稳定性的差异, 结果如图 4 所示.

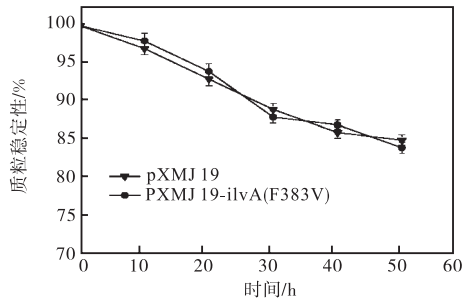


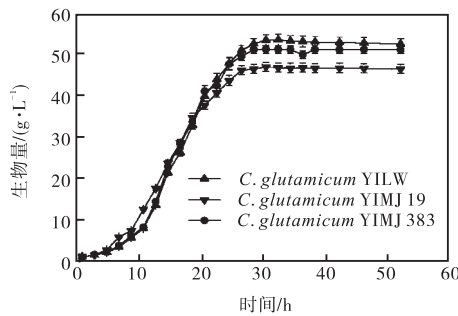
图4 质粒稳定性比较

Fig.4 Comparison of the plasmid stability

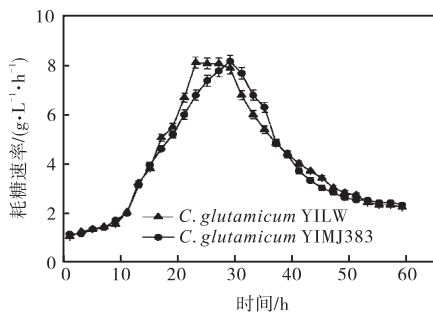
摇瓶发酵培养 30 h, 约有 10% 的菌株丢失质粒; 培养至 50 h, 质粒丢失率约为 15%, 且质粒 pXMJ19 和 pXMJ19-ilvA(F383V) 的稳定性差异不大, 说明 *ilvA*(F383V) 基因的插入不会影响质粒 pXMJ19 的稳定性. 同时在发酵生长期质粒的丢失率高于中后期, 推测分裂不稳定是此质粒丢失的主要原因.

2.5 质粒pXMJ19和pXMJ19-ilvA(F383V)对C. glutamicum YILW发酵的影响

比较 YILW 与重组菌 YIMJ19、YIMJ383 的生长情况, 5 L 发酵罐分批补料发酵 60 h. 结果如图 5 所示, YIMJ383 与 YILW 生长差异不大, 而 YIMJ19 在培养 20 h 后生长速度开始减缓, 最终两重组菌的生物量分别为 YILW 生物量的 96.4% 和 91.3%.



(a) 生物量



(b) 耗糖速率

图5 重组质粒对生物量及耗糖速率的影响

Fig.5 Effect of recombinant plasmid on sugar consumption rate and biomass

在耗糖速率方面, YILW 与重组菌 YIMJ383 有显著差异. 重组菌 YIMJ383 随着比生长速率的增大菌体的耗糖速率逐步增加, 30 h 时其耗糖速率达到最大为 8.2 g/(L·h), 随后耗糖速率缓慢下降; YILW 在 24 ~ 30 h 期间耗糖速度达到最大, 约为 8.1 g/(L·h), 随后其耗糖速度迅速下降, 需氧量也相应降低. 在 20 ~ 30 h 对数生长期后期, YILW 的耗糖速率高于重组菌 YIMJ383, 且有较高的需氧量; 而在 30 ~ 40 h 重组菌 YIMJ383 有较高耗糖速率, 这与其产酸期滞后相吻合.

对重组菌 YIMJ383 及 YILW 发酵液中 L-异亮氨酸产量及各种副产物的含量比较发现, L-异亮氨酸产量达到了 32 g/L, 较出发菌株的产量增加了 10.3%, 副产物 L-蛋氨酸、L-赖氨酸含量分别降低了 33.3%、26.5%, 其中重组菌 YIMJ383 发酵液中检测不到 L-苏氨酸的累积. 重组质粒 pXMJ19-ilvA(F383V) 的导入导致乳酸的累积量增加了 41.7%, 达到 1.2 g/L(表 1).

表1 L-异亮氨酸及各种副产物终质量浓度

Tab.1 Concentrations of L-isoleucine and byproducts

产物名称	质量浓度/(g·L ⁻¹)	
	<i>C. glutamicum</i> YILW	<i>C. glutamicum</i> YIMJ383
乳酸	0.7	1.2
L-丙氨酸	5.4	5.6
L-蛋氨酸	2.7	1.8
L-赖氨酸	3.4	2.5
L-苏氨酸	0.8	-
L-异亮氨酸	29	32

2.6 过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶对代谢流分布的影响

假设细胞内的中间代谢物均处于拟稳态, 即其浓度变化速率为 0. 根据物料质量守恒定律计算代谢物的积累速率, 代谢节点处反应速率方程如下:

$$\begin{aligned}
 \text{Glc6P} & \quad r_1 - r_2 - r_6 = 0 \\
 \text{F6P} & \quad r_2 - r_3 + r_{10} + r_{11} = 0 \\
 \text{GAP} & \quad 2r_3 - r_4 + r_9 - r_{10} + r_{11} = 0 \\
 \alpha\text{-Kiv} & \quad r_{15} - r_{16} = 0 \\
 \text{PEP} & \quad r_4 - r_1 - r_5 - r_{20} = 0 \\
 \text{Pyr} & \quad r_1 + r_5 - r_{12} - r_{13} - r_{14} - r_{15} - r_{17} - r_{25} = 0 \\
 \text{AcCoA} & \quad r_{17} - r_{19} = 0 \\
 \alpha\text{-KG} & \quad r_{16} + r_{19} - r_{20} - r_{21} + r_{23} + r_{25} + r_{28} = 0 \\
 \text{OAA} & \quad r_{18} - r_{19} + r_{22} - r_{23} = 0 \\
 \text{Ru5P} & \quad r_6 - r_7 - r_8 = 0 \\
 \text{X5P} & \quad r_7 - r_9 - r_{11} = 0 \\
 \text{R5P} & \quad r_8 - r_9 = 0 \\
 \text{S7P} & \quad r_9 - r_{10} = 0
 \end{aligned}$$

E4P $r_{10} - r_{11} = 0$
 HE-TTP $r_{12} - r_{13} - r_{25} = 0$
 GLU $r_{17} - r_{14} - r_{21} - r_{22} - r_{25} - r_{27} = 0$
 THR $r_{24} - r_{25} = 0$
 ASA $r_{24} - r_{25} - r_{26} - r_{27} = 0$
 SucCoA $r_{18} - r_{19} - r_{22} = 0$

NADPH $2r_6 + r_{16} - r_{17} - r_{21} - r_{22} - r_{23} - r_{24} - r_{25} = 0$

为便于计算,葡萄糖摩尔消耗速率假定为 100 mmol/(L·h). 利用 Matlab 软件 linprog 函数计算得到 *L*-异亮氨酸生产菌 YILW 及重组菌 YIMJ383 发酵中后期(34~38 h)代谢流分布,结果见图 6.

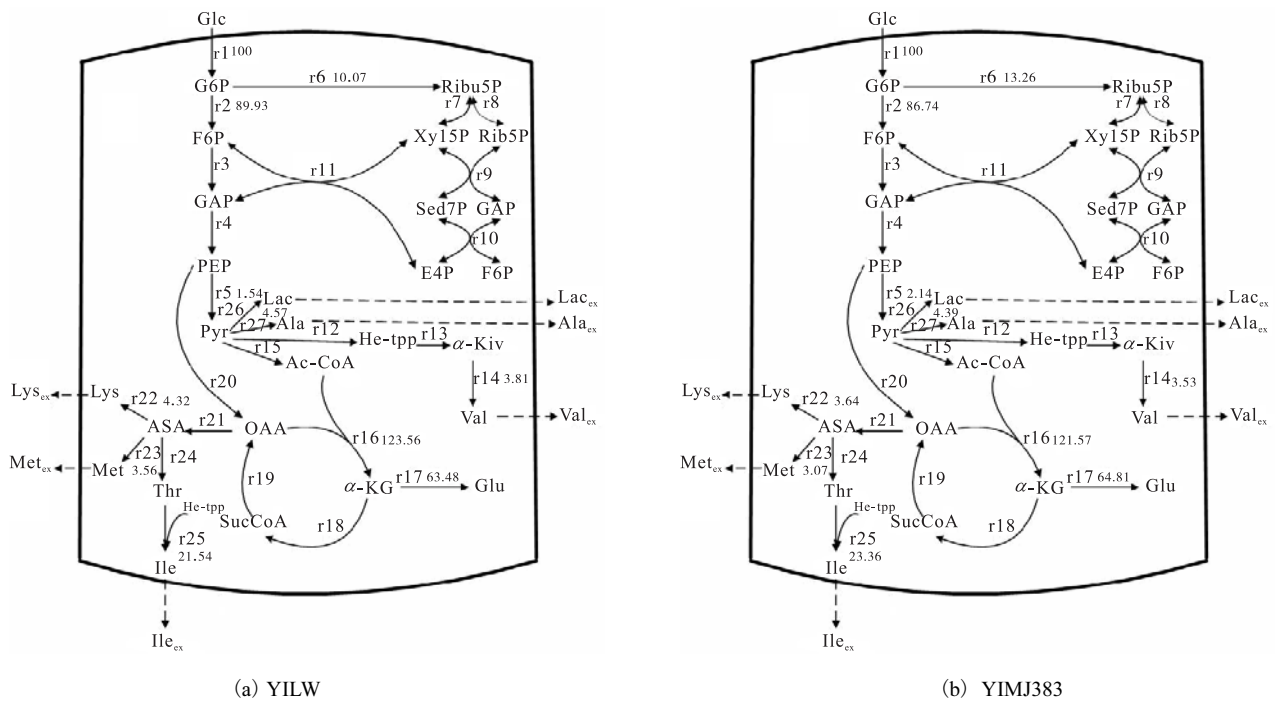


图 6 YILW 与 YIMJ383 合成 *L*-异亮氨酸代谢流分布
 Fig.6 Metabolic flux distributions of *L*-isoleucine fermentation in YILW and YIMJ383 strains

由图 6 可知,过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶后 HMP 途径流量增加了 31.7%,生成副产物 *L*-蛋氨酸、*L*-赖氨酸、*L*-缬氨酸与 *L*-丙氨酸的代谢流均有所降低,分别降低了 14.3%、16.3%、7.9%与 2.4%;而生成副产物乳酸的代谢流明显增加,与 *C. glutamicum* YILW 相比增加了 40.0%,同时进入 *L*-异亮氨酸生物合成途径的代谢流提高了 8.5%.

3 结 语

目前传统的随机诱变加定向筛选的育种方式以及 DNA 重组技术在设计育种中的应用已经大大提高了微生物对氨基酸的生产能力.

本实验考察了过量表达解除反馈抑制的苏氨酸脱水酶对 *L*-异亮氨酸发酵的影响,结果表明合成 *L*-异亮氨酸,乳酸的代谢流增加,副产物氨基酸的合成

均有不同程度的降低,为进一步改造 *L*-异亮氨酸生产菌如发酵工艺的优化、关键酶的串联表达以及转运蛋白的表达等工作奠定实验基础.

参考文献:

- [1] Blomstrand E. A role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue[J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(2): 544-547.
- [2] Julius E J, William J H. Role of amino acids in human nutrition[J]. 50 Years Ago, 1992, 6: 2361-2362.
- [3] 朱绪芝,任泉钟. 治肝灵口服液的制备、质量控制及临床应用[J]. 中国药房, 2001, 12(2): 87-88.
- [4] Sahn H, Eggeling L, Murbach S, et al. Construction of *L*-Isoleucine overproducing strains of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Naturwissenschaften, 1999, 86(1): 33-38.
- [5] Möckel B, Eggeling L, Sahn H. Functional and struc-

- tural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(24): 8065–8072.
- [6] Morbach S, Kelle R, Winkels S, et al. Engineering the homoserine dehydrogenase and threonine dehydratase control points to analyse flux towards L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45(5): 612–620.
- [7] Guillouet S, Rodal A A, An G H, et al. Metabolic redirection of carbon flow toward isoleucine by expressing a catabolic threonine dehydratase in a threonine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57(5/6): 667–673.
- [8] 史建明,徐兰兰,徐庆阳,等. 谷氨酸棒杆菌 YILW 苏氨酸脱水酶基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. *生物加工过程*, 2011, 9(1): 56–60.
- [9] 陈宁,常高峰,张克旭. L-异亮氨酸发酵培养基的响应面法优化[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(2): 33–37.
- [10] Samubuluke J. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2005:597–666.
- [11] Van Der Rest M E, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52: 541–545.
- [12] 何晨光,马雷,徐庆阳,等. 用高效液相色谱定量分析分支链氨基酸[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(4): 556–558.
- [13] Kromer J O, Wittmann C, Schroder H, et al. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(4): 353–369.
- [14] 马雷,程立坤,徐庆阳,等. 柠檬酸钠对 L-异亮氨酸发酵及代谢流量分布的影响[J]. *天津科技大学学报*, 2010, 25(3): 14–18.
- [15] 李涛,贺勇军,刘志俭. Matlab 工具箱应用指南:应用数学篇[M]. 北京:电子工业出版社,2000:210–212.
- [16] Huang C T, Peretti S W, Bryers J D. Effects of medium carbon-to-nitrogen ratio on biofilm formation and plasmid stability[J]. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1994, 44(3): 329–336.
- [17] Neubauer P, Lin H Y, Mathisizik B. Metabolic load of recombinant protein production: Inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*[J]. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 2003, 83(1): 53–64.