

ilvBNC 操纵子协同 *cimA* 基因过表达提高 *Corynebacterium glutamicum* YILW L-异亮氨酸产量 的研究

温冰^{1,2}, 徐国栋¹, 刘远¹, 徐庆阳¹, 谢希贤¹, 张成林¹, 陈宁¹

(1. 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457) (2. 天津市工业微生物研究所有限公司, 天津 300462)

摘要: L-异亮氨酸是人和动物八种必需氨基酸之一, 在生命活动中具有重要地位。乙酰羟酸合成酶 (acetoxy acid synthase, AHAS) 是 L-异亮氨酸合成途径的关键酶 (由 *ilvBN* 编码), α -酮基丁酸是 L-异亮氨酸合成的重要前体。因此强化 *ilvBN* 的表达以及增加 α -酮基丁酸的供应理论上可提高 L-异亮氨酸的合成。*cimA* 编码的甲基苹果酸合成酶可以催化丙酮酸和乙酰-CoA 快速生成 L-异亮氨酸前体 α -酮基丁酸, 从而增强主代谢流通量。本文采用基因重组手段将 L-异亮氨酸生产菌株 *Corynebacterium glutamicum* YILW *ilvBNC* 操纵子中的启动子替换为强启动子 P_{tac} 获得 *C. glutamicum* YILWP_{tac}。摇瓶发酵结果显示该菌株 L-异亮氨酸产量和转化率分别较出发菌株提高了 14.8% 和 18.6%。在此基础上过表达 *cimA* 基因, 获得 *C. glutamicum* YILWP_{tac}XMJ19*cimA*, 其 L-异亮氨酸产量和糖酸转化率分别较出发菌株提高了 14.5% 和 42.4%。本研究可为氨基酸生产菌株的选育提供依据。

关键词: L-异亮氨酸; 谷氨酸棒杆菌; α -酮基丁酸; 启动子替换; 柠檬酸合成酶

文章编号: 1673-9078(2016)2-27-32

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.005

Enhanced L-isoleucine Production by *Corynebacterium glutamicum* YILW through Overexpression of *ilvBNC* and *cimA*

WEN Bing^{1,2}, XU Guo-dong¹, LIU Yuan¹, XU Qing-yang¹, XIE Xi-xian¹, ZHANG Cheng-lin¹, CHEN Ning¹

(1. National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China) (2. Tianjin Research Institute of Industrial Microbiology Co., Ltd, Tianjin 300462, China)

Abstract: L-isoleucine is one of the eight essential amino acids for humans and animals, and it plays a vital role in numerous life functions. α -Ketobutyrate is the key precursor of L-isoleucine, and acetoxy acid synthase (AHAS; encoded by *ilvBN*) is the key enzyme in L-isoleucine synthesis. Therefore, L-isoleucine production can be theoretically increased either by increasing the supply of α -ketobutyrate or *ilvBN* expression. Citramalate synthase, encoded by *cimA*, catalyzes the generation of α -ketobutyrate from pyruvate and acetyl-CoA. α -Ketobutyrate is a direct precursor of L-isoleucine; thus, increasing *cimA* expression increases the metabolic flux of L-isoleucine synthesis. In the present study, the promoter of the *ilvBNC* operon in the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW was replaced by the potent *tac* promoter to construct a recombinant strain, *C. glutamicum* YILWP_{tac}, which overexpresses *ilvBNC*. Shake flask fermentation experiments showed that L-isoleucine production and glucose (Yp/s) conversion in the recombinant strain were increased by 14.8% and 18.6%, respectively. To further increase L-isoleucine production and Yp/s, a construct containing the *cimA* gene under the control of a strong promoter was introduced into *C. glutamicum* YILWP_{tac} to construct *C. glutamicum* YILWP_{tac}XMJ19*cimA*. Compared to the original strain, in *C. glutamicum* YILWP_{tac}XMJ19*cimA*, L-isoleucine production and Yp/s were increased by 14.5% and 42.4%, respectively. Thus, the findings of this study provide a basis for constructing new and improved amino acid-producing *C. glutamicum* strains.

Key words: L-isoleucine; *Corynebacterium glutamicum*; α -ketobutyric acid; promoter substitution; citramalate synthase

收稿日期: 2015-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31300069); 天津市科技支撑计划重点项目 (12ZCZDSY01900)

作者简介: 温冰 (1977-), 女, 博士研究生, 研究方向为氨基酸代谢工程研究; 通讯作者: 陈宁 (1963-), 男, 教授, 研究方向为代谢工程和发酵工程

L-异亮氨酸(L-isoleucine, ILE),又名“异白氨酸”,分子式为 C₆H₁₃NO₂,是人脊椎动物八种必需氨基酸之一,在生命活动中具有重要地位。L-异亮氨酸对激素和蛋白质的合成具有重要的调节作用,因而被广泛应用与食品、医药保健等行业。

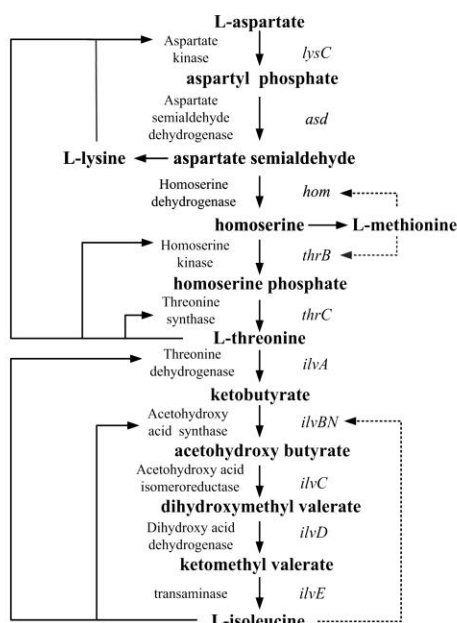


图1 L-异亮氨酸代谢调控机制

Fig.1 Metabolic regulation of L-isoleucine production

注: 实线和虚线分别代表反馈抑制和反馈阻遏。

L-异亮氨酸合成途径如图1所示, *ilvBN* 编码的乙酰羟基酸合成酶(AHAS)是L-异亮氨酸合成途径中的关键酶之一,研究表明过表达该酶可提高L-异亮氨酸产量^[1]。*ilvB*和*ilvN*分别编码AHAS的两个亚基,同编码乙酰羟基酸异构酶的*ilvC*构成操纵子*ilvBNC*。

采用强启动子替换的方式即可达到增加目的基因表达水平的目的亦可减轻宿主代谢负担。程永松^[2]将谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 的组氨酸操纵子替换为强启动子 *Ptac*, 使得关键基因 *hisD* 的表达量提高了 10.2 倍, 组氨酸产量提高了 58.4%。因此采用此方式过表达 L-异亮氨酸生产菌的 *ilvBNC* 操纵子理论上可增加 *ilvB* 的表达量, 使 L-异亮氨酸积累量增加。

α -酮基丁酸是 L-异亮氨酸的重要前体之一, 其合成主要通过苏氨酸途径, 即葡萄糖经糖酵解途径生成乙酰-CoA, 后者经过 TCA 循环后生成草酰乙酸, 再经 7 个反应才能生成 α -酮基丁酸。Nyles W 等^[3]在 *Leptospira* 中发现了其他合成 L-异亮氨酸的途径, 该途径中乙酰-CoA 和丙酮酸经柠檬酸合成酶(CimA, 由 *cimA* 基因编码)等酶催化 4 步反应即可生成 α -酮基丁酸。Choi^[4]等在大肠杆菌中异源表达 *cimA* 基因, 使得包括 α -酮基丁酸在内的酮酸合成量显著增加。因此, 在 L-异亮氨酸生产菌中异源表达柠檬酸合成酶, 理论上可以增加前体物 α -酮基丁酸的供应, 进而提高 L-异亮氨酸的合成量。

本研究采用基因重组技术将 L-异亮氨酸生产菌 *C. glutamicum* YILW *ilvBNC* 操纵子中的启动子替换为强启动子 *Ptac* 构建 *C. glutamicum* YILWPtac, 以提高关键基因 *ilvBN* 的转录量, 在此基础上导入柠檬酸合成酶编码基因 *cimA*^[5]构建重组菌 *C. glutamicum* YILWPtacpXMJ19cimA 以增加胞内 α -酮基丁酸的供应, 以期提高 L-异亮氨酸积累水平。

1 材料与方法

表1 菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and Plasmids	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> DH5 α MCR	F ⁻ , ϕ 80d <i>lacZ</i> AM15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)	
	U169 <i>recA1, endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺),	Stored in the lab
	<i>deoRsupE44</i> λ , <i>thi-1 gyrA96, relA1</i>	
<i>C. glutamicum</i> YILW	AHV ^r +SG ^r +Leu-ME ^r	Stored in the lab
<i>C. glutamicum</i> YILWPtac	<i>C. glutamicum</i> YILW harboring <i>Ptac</i>	This work
<i>C. glutamicum</i> YILWPXMJ19cimAPtac	<i>C. glutamicum</i> YILWPtac harboring pXMJ19cimA	This work
pK18 <i>mobsacB</i>	Integration vector, Km ^r ori _{V_{Ec}} ori _T <i>sacB</i>	Stored in the lab
pXMJ19	<i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> shuttle vector, 6.6 kb, <i>ptac, lacP^l, Cmf</i>	Stored in the lab
pXMJ19cimA	Plasmid pXMJ19 carrying the <i>cimA</i> gene encoding citramalate synthase	This work

1.1 材料

本研究所用菌种和质粒见表1。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pK18mobsacBPtac 的构建

利用 PCR 扩增大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pXMJ19 上的 Ptac 强启动子序列 (实验室保留)。设计 Ptac 强启动子序列的上下游引物 Ptac-1 (TGACCC AAGTAGCCA ACTTGATCCTCCCAAACACACAT) 和 Ptac-2 (CAGCCTAAAGACAAAGCCCTCCAGCG AG TCAAATGTCTTCAT)。分别设计 *ihvB* 的上下游同源臂上下游引物 *ihvB*-1 (TCTAGATTGATAATACG CATGGCCAGT)、*ihvB*-2 (ATGTGTGTTGGGGGAG GATCAAAGTTGGCTACTTGGGTCA) 和 *ihvB*-3 (ATG AAGACATTTGACTCGCTGGAGGGCTTTGTCTTT AGGCTG)、*ihvB*-4 (GTCGACCAAGTTGGTTGCT CCTGGG)。以 *ihvB*-1、*ihvB*-2 为引物, *C. glutamicum* YILW 基因组为模版进行 PCR 获得 *ihvB* 的上游同源臂片段, 以此为参照获得 *ihvB* 的下游同源臂。再以 *ihvB*-1 和 Ptac-2 为上游合成片段引物上游同源臂片段和 Ptac 序列为模版进行重叠 PCR 获得含有 Ptac 序列和 *ihvB* 上游同源臂序列的上游合成片段, 以此为参照获得下游合成片段。以 *ihvB*-1 和 *ihvB*-4 为引物, 上下游合成片段为模版进行 PCR 重叠获得含有 Ptac 序列的 *ihvB* 同源序列片段, 将获得片段用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 然后与经同样内切酶酶切后的自杀质粒 pK18mobsacB 连接, 转化到 *E. coli* DH5 α MCR 中。在含有 50 μ L/mL 卡那霉素抗性的 LB 平板培养基上筛选阳性转化子并进行 PCR 验证。

1.2.2 重组质粒 pXMJ19cimA 的构建

CimA 的编码基因^[5] *cimA* 委托北京金唯智生物公司合成。将含有 *cimA* 的克隆载体经 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切后连接至 pXMJ19, 获得重组质粒 pXMJ19cimA。

1.2.3 重组菌株 YILWPtac 的构建

利用电转化的方法将构建好的重组质粒 pK18mobsacB 导入 YILW 中, 通过与基因组上的同源序列进行交换得到 YILWpK18mobsacB 菌株, 在含有 10 μ L/mL 卡那霉素抗性的 LBG 平板培养基上筛选阳性转化子并进行 PCR 验证。筛选出的 YILWpK18mobsacB 继续在含有 15% 蔗糖的 LB 摇管中连续传代两次, 筛选发生双交换的菌株并通过 PCR 进行验证得到约 1000 bp 大小片段, 最终获得基因组上整合有 Ptac 启动子序列的重组菌 YILWPtac。

1.2.4 重组菌株 YILWpXMJ19、YILWpXMJ19cimA、YILWPtacpXMJ19、YILWPtacpXMJ19cimA 的构建

将重组质粒 pXMJ19cimA 电转入 YILWPtac 中, 在含有 10 μ L/mL 氯霉素抗性的 LBG 平板培养基上筛选阳性转化子富集培养以提取质粒, 用 *Hind* III 和 *Sac* I 进行双酶切, 获得约 1500 bp 大小片段, 表明重组菌 YILWPtacpXMJ19cimA 构建成功。参照 YILWPtacpXMJ19cimA 的构建方法构建 YILWpXMJ19、YILWpXMJ19cimA 和 YILWPtacpXMJ19。

1.2.5 RNA 的提取和转录量测定

利用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取 *C. glutamicum* YILW、*C. glutamicum* YILWPtac 和 *C. glutamicum* YILWPtacpXMJ19cimA 的总 RNA。使用 UltraSYBR 二步法荧光定量 PCR 试剂盒对 RNA 进行反转录。设计荧光定量 PCR 鉴定引物 *cimA*-S (TTC GCATCTTTGACACCACC)、*cimA*-A (ACCTCGTCCT CGGTCTTGC) 和 Ptac-S (TTGAAATCGGCTTGGC TTGGAC) 和 Ptac-A (GCTCCTCGAGCGATCGAAC AAT), 测定 *cimA* 和 *ihvB* 的相对转录量变化。以 16S rRNA 为内参^[6], 根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[7] 比较基因的转录水平。

1.2.6 SDS-PAGE 蛋白电泳

将菌体置于 -80 $^{\circ}$ C 和室温反复冻融三次, 利用超声破碎仪对菌体进行破碎。吸取 50 μ L 的上样缓冲液加入到 80 μ L 破碎后的样品, 沸水浴 15 min, 冷却后上样跑蛋白电泳。电泳过程中, 浓缩胶阶段 30 mA, 分离胶阶段 50 mA。

1.2.7 培养基和培养条件

1.2.7.1 培养基

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, pH 7.0, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 25, 酵母粉 5, (NH₄)₂SO₄ 5, MgSO₄·7H₂O 0.6, KH₂PO₄ 1.3, 豆浓 15 mL, 玉米浆 20 mL, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 80, (NH₄)₂SO₄ 3, MgSO₄·7H₂O 0.6, KH₂PO₄ 1.5, 玉米浆 30 mL, VB₁ 0.1 mg, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa, 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2.7.2 摇瓶发酵条件

将培养 10 h 后的种子培养物以 10% 的接种量接种至发酵培养基 (含氯霉素 10 μ g/mL) 中, 于 32 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养。发酵过程中以 10% 尿素调节 pH 在 7.0~7.2, 通过补加 80% 的葡萄糖控制糖浓度在 15.0 g/L 以上, 发酵周期为 40 h。

1.2.8 测定、计算方法及数据分析

葡萄糖浓度测定：使用山东省科学院生物研究所生产的SBA-40C生物传感仪测定。

氨基酸浓度含量的测定：使用 HPLC 测定。检测条件为：仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪；色谱柱 Phenomenex Gemini 5u C18 (150*4.6mm, 美国菲罗门公司)；流动相：流动相 A (50% 乙腈) 和流动相 B (4.1% 乙酸钠)；柱温 33 °C；检测波长 360 nm；流速 1.0 mL/min，梯度洗脱。

菌体干重(DCW)的计算：发酵液用 ddH₂O 稀释到适当倍数，测定其 OD₆₀₀。菌体干重表示为 OD×稀释倍数×0.3 g (DCW)/L，单位为 g/L。

数据分析：每组实验均设三个平行并重复三次，利用 Origin 8.0 统计软件对实验数据进行分析 and 处理。

2 结果与分析

2.1 Ptac 替换对 *ilvB* 转录水平影响

通过替换 *ilvBNC* 前启动子理论上可以强化 *ilvB* 的转录强度。在 LB 培养中分别培养 YILW、YILWPtac 24 h，收集菌体并提取总 RNA。利用荧光定量 PCR 检测菌株 YILWPtac 中 *ilvB* 的相对转录量变化，结果如图 2 所示，替换强启动子 Ptac 后，*ilvB* 的相对转录量提高了 12.5 倍，表明 Ptac 启动子能够在谷氨酸棒杆菌中有效地发挥作用。

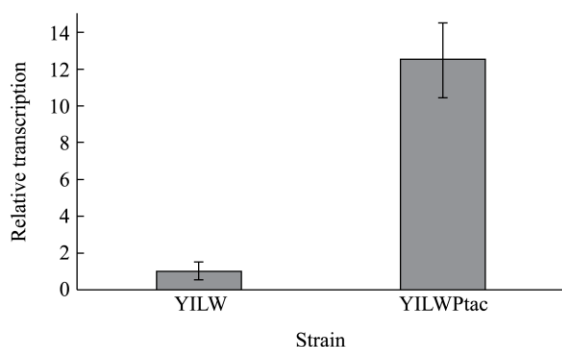


图 2 *ilvB* 在 YILWPtac 中的转录水平

Fig.2 Relative *ilvB* transcript levels in *C. glutamicum* strains YILW and YILWPtac

2.2 *cimA* 在 YILWPXMJ19*cimA* 中的转录及表达

对出发菌株 *C. glutamicum* YILW 和改造菌 YILWPtacXMJ19*cimA* 进行荧光定量 PCR 反应确定 *cimA* 转录量，再通过 SDS-PAGE 分析 *cimA* 编码的异源蛋白能否在 YILWPtacXMJ19*cimA* 中表达。结果见图 3。

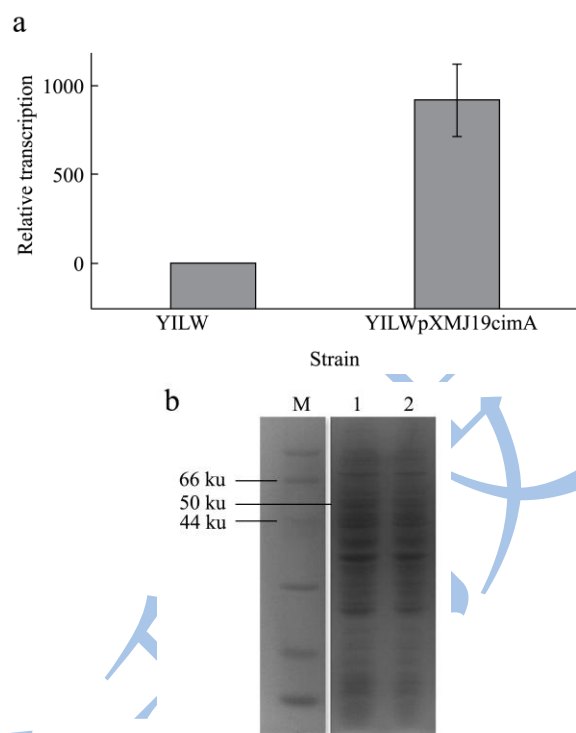


图 3 基因 *cimA* 在 YILWPtacXMJ19*cimA* 中的表达及转录水平

Fig.3 Expression and relative *cimA* transcript levels in *C. glutamicum* YILW and YILWPtacXMJ19*cimA*

注：(a)转录量比较；(b)蛋白电泳结果：M：蛋白 marker；1：YILWPXMJ19*cimA* 2：YILW。

cimA 在 YILWPtacXMJ19*cimA* 的转录量为原菌的 920 倍，表明 *cimA* 在该菌中成功转录。*cimA* 编码的 CimA 分子量约为 50 ku，由图 3 (b) 可知，在 50 ku 处 YILWPtacXMJ19*cimA* 与出发菌株 YILW 均有蛋白表达，但前者表达量略高（电泳前已对二者的蛋白质浓度进行定量分析并进行适当调整使其上样浓度相同），暗示 *cimA* 可能在 YILWPtacXMJ19*cimA* 中表达，但还需通过发酵实验对其效果进行验证。

2.3 Ptac 替换对 *C. glutamicum* YILWPtac 产 L-异亮氨酸的影响

为了研究 Ptac 插入对 *C. glutamicum* YILWPtac 产 L-异亮氨酸的影响，将 YILW 和 YILWPtac 进行摇瓶分批发酵实验。发酵过程中定时取样测定菌体生长 OD、发酵过程残糖量及 L-异亮氨酸产量，绘制出发酵过程曲线，见图 4。

由图 4 可知，启动子由于是插入到 YILW 的基因组上，因此对菌体生长没有明显的影响，出发菌株与改造菌的生物量和耗糖未见明显差异，表明启动子的替换未对菌株的生长生产负担。

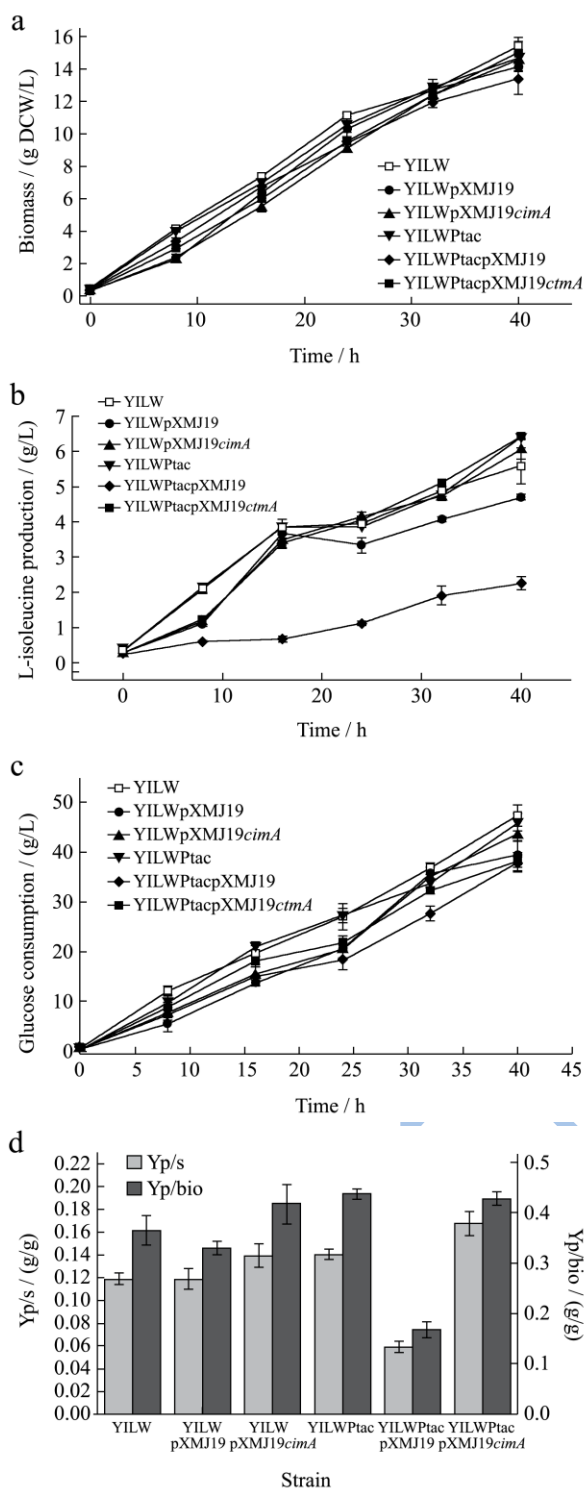


图4 *C. glutamicum* YILW (□), YILWpXMJ19 (○), YILW pXMJ19cimA (△), YILWptac (▽), YILWptacXMJ19 (◇)和 YILW PtacXMJ19cimA (■) 摇瓶分批发酵过程参数

Fig.4 Parameters for batch fermentation of *C. glutamicum* strains in shake flasks, YILW (□), YILWpXMJ19 (○), YILW pXMJ19cimA (△), YILWptac (▽), YILWptacXMJ19 (◇), YILWptacXMJ19cimA (■)

注: (a) 生长曲线; (b) 耗糖曲线; (c) L-异亮氨酸产酸曲线; (d) L-异亮氨酸终产量, 糖酸转化率 (Yp/s) 和单位菌

体产酸 (Yp/bio)。

发酵结束时, YILW 和 YILWptac 的 L-异亮氨酸产量分别为 5.95 g/L 和 6.42 g/L, 生物量分别为 15.37 g DCW/L 和 14.64 gDCW/L, 耗糖分别为 47.3 g/L 和 46.0 g/L, 糖酸转化率和单位菌体产酸分别为 0.118 g/g、0.364 g/g 和 0.14 g/g、0.438 g/g。YILWptac 产酸较原菌 YILW 产酸提高了 14.8%, 糖酸转化率和单位菌体产酸分别提高了 18.6% 和 20.3%。上述结果表明, Ptac 强启动子的替换可以提高菌体 L-异亮氨酸产量, 并能提高糖酸转化率和单位菌体产酸。

2.4 *cimA* 表达对 *C. glutamicum* YILWpXMJ19 *cimA* 产 L-异亮氨酸的影响

为了研究 *cimA* 表达对 *C. glutamicum* YILWpXMJ19 *cimA* 产 L-异亮氨酸的影响, 将 YILW、YILWpXMJ19 和 YILWpXMJ19*cimA* 进行摇瓶分批发酵实验。发酵过程中定时取样测定菌体生长 OD、发酵过程残糖量及 L-异亮氨酸产量, 绘制出发酵过程曲线, 见图 4。

如图 4 所示, 由于胞内含有较大质粒, 菌体的生长存在一定的负担, 因此 YILWpXMJ19 和 YILWpXMJ19*cimA* 生物量低于 YILW。YILW、YILWpXMJ19 和 YILWpXMJ19*cimA* 产酸分别为 5.95 g/L、4.69 g/L 和 6.09 g/L。YILWpXMJ19*cimA* 糖酸转化率和单位菌体产酸分别为 0.139 g/g 和 0.419 g/g, 较 YILWpXMJ19 分别提高了 16.8% 和 26.6%, 较 YILW 分别提高了 17.8% 和 15.1%, 产酸较 YILWpXMJ19 和 YILW 分别提高了 29.9% 和 8.9%。因此, *cimA* 的表达可以提高菌体的产酸、糖酸转化率和单位产酸水平。

2.5 *ilvBNC* 操纵子协同 *cimA* 过表达对 *C. glutamicum* YILWptacXMJ19*cimA* 产 L-异亮氨酸的影响

为了研究 Ptac 插入协同 *cimA* 表达对 *C. glutamicum* YILWptacXMJ19*cimA* 产 L-异亮氨酸的影响, 将 YILW、YILWptac、YILWptacXMJ19 和 YILWptacXMJ19*cimA* 进行摇瓶分批发酵实验。发酵过程中定时取样测定菌体生长 OD、发酵过程残糖量及 L-异亮氨酸产量, 绘制出发酵过程曲线, 见图 4。

由图 4 可知, YILWptacXMJ19*cimA* 产 L-异亮氨酸 6.40g/L, 较 YILW 提高了 14.5%; 糖酸转化率和单位菌体产酸为 0.168 g/g 和 0.428 g/g, 较 YILW 分别提高了 42.4% 和 17.6%, 糖酸转化率较 YILWpXMJ

19*cimA* 提高了 20.8%。Ptac 强启动子替换协同 *cimA* 表达可以较明显的提高菌体的糖酸转化率。

2.6 *ilvBNC* 操纵子协同 *cimA* 过表达对 *C. glutamicum* YILWPtacpXMJ19*cimA* 发酵副产物的影响

L-异亮氨酸发酵过程中的主要副产物有 L-赖氨酸、L-丙氨酸和 L-缬氨酸。发酵结束时, 对比各菌种副产物积累情况, 见图 5。

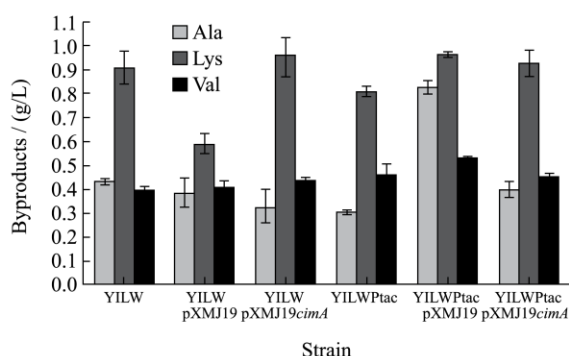


图 5 L-异亮氨酸发酵过程中副酸积累情况

Fig.5 Accumulation of byproducts during L-isoleucine fermentation

如图 5, L-异亮氨酸发酵的相关副产物有 L-丙氨酸、L-赖氨酸和 L-缬氨酸。YILW 发酵结束时副酸积累量分别为 0.432 g/L、0.909 g/L 和 0.423 g/L; YILWpXMJ19*cimA* 副产物浓度分别为 0.324 g/L、0.961 g/L 和 0.435 g/L; YILWPtac 副产物浓度分别为 0.303 g/L、0.804 g/L 和 0.461 g/L; YILWPtacpXMJ19 *cimA* 副产物浓度分别为 0.395 g/L、0.924 g/L 和 0.451 g/L。

3 讨论

L-异亮氨酸合成途径冗长且代谢调控机制较为复杂, 对于某节点处的分子改造带来的扰动往往会引发代谢调控体系的整体反馈响应。其主要代谢调控途径见图 1。

根据摇瓶发酵结果分析, 当在 YILW 的 *ilvB* 前插入 Ptac 后, *ilvB* 转录量提高, 乙酰羟氨酸合成酶活力提高, 促使 α -酮基丁酸向下游的转化速率加快, 强化了 α -酮基丁酸到 L-异亮氨酸合成路径的代谢流强度, 增加了 L-异亮氨酸的产量。同时, 与 AHAS 酶活有关的其他分支链氨基酸如 L-缬氨酸产量也有所增加^[8]。在强启动子 Ptac 插入后, α -酮基丁酸到 L-异亮氨酸合成路径的代谢流得到强化, L-赖氨酸合成量降低, 可

能是由于 L-天冬氨酸到 L-苏氨酸代谢途径中的反馈机制部分解除造成的。代谢流更多地流向 L-异亮氨酸的合成方向, 副产物 L-丙氨酸分泌量降低。

当 *cimA* 在 *C. glutamicum* YILW 中表达后, *cimA* 编码的 CimA 会催化乙酰-CoA 和丙酮酸反应, 将丙酮酸更多的引入 L-异亮氨酸的合成方向^[9], 以丙酮酸为前体的副产物 L-丙氨酸的积累量降低。与此同时, 胞内 α -酮基丁酸的增加会进一步提高 AHAS 对 α -酮基丁酸的亲和性, 使得该段合成途径代谢流增大, 代谢所涉及到的酶所催化的 L-缬氨酸合成量也会增加。胞内 α -酮基丁酸增加还会抑制 L-苏氨酸的转化, L-苏氨酸的积累会进一步抑制 L-高丝氨酸到高丝氨酸磷酸的缩合^[10], 使得代谢流从天冬氨酸半醛流向 L-赖氨酸。

此外, pXMJ19 空质粒导入 YILWPtac 后, 菌体的代谢明显发生异常, 改造菌副产物大量合成, 说明代谢流更多地流向了分支路径等。一个原因可能是质粒负担太大, 使得菌体生长和代谢受到影响, 另一方面可能是在插入 Ptac 后, 菌体的反馈抑制已经比较强烈, 空质粒引起生长上的负担, 生物量低, 碳源多数用于合成其他产物。YILWPtacpXMJ19 各种副酸分泌量远高于原菌, 这就解释了该菌种 L-异亮氨酸产酸水平、糖酸转化率和单位菌体转化率低的原因, 也解释了 YILWPtacpXMJ19*cimA* 多种副产物积累量较 YILWPtac 都略高的原因。通过再次导入 *cimA* 使得 α -酮基丁酸供应增大, 再次将代谢流更多地引入 L-异亮氨酸的合成方向, 使得 YILWPtacpXMJ19*cimA* 产酸趋于正常, 但是产酸和单位菌体产酸较 YILWPtac 有所降低。

总体而言, *cimA* 表达和 Ptac 插入对促进 L-异亮氨酸合成都有积极的作用, 但是质粒过表达会带来菌体生长和代谢负担, 因此可考虑将 *cimA* 整合到菌株的基因组上, 以此来消除质粒的不良影响, 进一步提高转化率等发酵参数。同时, 可以尝试过表达天冬氨酸到 α -酮基丁酸的相关的酶来进一步提高代谢通量, 使代谢流更多地流向 L-异亮氨酸的合成方向, 最终提高 L-异亮氨酸的积累量。

4 结论

采用基因重组技术将 *ilvBNC* 操纵子的启动子替换为强启动子 Ptac 可有效提高 *ilvBN* 的转录水平及 L-异亮氨酸的产量和转化率且未对菌体生物量产生明显影响。在此基础上过表达 *cimA* 基因对 L-异亮氨酸产量未见明显促进作用但可显著提高其转化率。本研究可为氨基酸生产菌株的选育提供依据。

参考文献

- [1] Yin LH, Hu XQ, Xu DQ, et al. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 542-550
- [2] 程永松.L-组氨酸的定向选育[D].天津:天津科技大学, 2012
CENG Yong-song. Directed breeding of L-histidine produced bacteria [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012
- [3] Westfall HN, Charon NW, Peterson DE. Multiple pathways for isoleucine biosynthesis in the spirochete *Leptospira* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(2): 846-853
- [4] Choi YJ, Park JH, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1-propanol [J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 477-486
- [5] Atsumi S, Liao JC. Directed evolution of *Methanococcus jannaschii* citramalate synthase for biosynthesis of 1-Propanol and 1-Butanol by *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(24): 7802-7808
- [6] Takle GW, Toth IK, Brurberg MB. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* [J]. *BioMed Central Plant Biology*, 2007, 7:50
- [7] Ganesh D, Petitot AS, Silva MC, et al. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR [J]. *Plant Science*, 2006, 170(6): 1045-1051
- [8] Elisakova V, Patek M, Holatko J, et al. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 207-213
- [9] David M, Howell, Huimin X, et al. (R)-Citramalate synthase in methanogenic archaea [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 331-333
- [10] 陈宁.氨基酸发酵工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2007: 346-355
CHEN Ning. Amino acid technology [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 2007: 346-355