谷氨酸棒杆菌产 L-色氨酸重组菌株的构建

蔡霞，郑穗平

（华南理工大学生物科学与工程学院，微生物酶学重点实验室，广东广州 510006）

摘要：在芳香族氨基酸合成途径中，由分支酸产生两个分支：一方面，在邻氨基苯甲酸异构酶（ANS）、邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶（PRT）和色氨酸合成酶（TS）的催化下合成色氨酸；另一方面，分支酸在分支酸变位酶（CM）的催化下生成预苯酸（PPA），由预苯酸又产生两个分支，最后生成酪氨酸或苯丙氨酸。在该途径中，3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7 磷酸合成酶（DS）是关键酶。以谷氨酸棒杆菌 SPT9（Phe-、Tyr-、4-FPr、6-FTr）为出发菌株，通过同源重组敲除分支酸变位酶基因 csm 获得菌株 SPT9Δ*csm*。将编码 DS、ANS 和 PRT、TS 的基因 aroⅡ、trpEGD 及 ts 在 SPT9Δcsm 中分别过量表达和串联过量表达，获得一系列重组菌：*SPT9Δcsm-XK99E-aro Ⅱ-trpEGD*、*SPT9Δcsm-XK99E-ts*、*SPT9Δcsm-XK99E-cspB-ts*、*SPT9Δcsm-mob2-ts* 和 *SPT9Δcsm-mob2-ts- aro Ⅱ-trpEGD*。这五株菌摇瓶发酵 72 h 后，色氨酸产量相对于出发菌株 SPT9 分别提高了 21.4%、57.1%、100%、121.4%和 178.6%。通过实时荧光定量 PCR 检测表明，ts、aroⅡ和 trpEGD 基因在重组菌 *SPT9Δcsm-mob2-ts-aro Ⅱ-trpEGD* 中的表达量是它们在菌株 SPT9 中的 9.2 倍、13.0 倍以及 10.6 倍。

关键字：谷氨酸棒杆菌；L-色氨酸；同源重组；色氨酸合成酶

文章篇号：1673-9078(2014)4-165-170

Construction of Recombinant *Corynebacterium glutamicum* for L-tryptophan Production

CAI Xia, ZHENG Sui-ping

(School of Bioscience and Bioenginerring, South China University of Technology, Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In the aromatic amino acid synthesis pathway, chorismic acid produces two branches. One is to synthetize tryptophan under the catalyze of anthranilate isomerase (ANS), anthranilate phosphoribosyl transferase (PRT) and tryptophan synthase (TS). And the other is to generate prephenic acid (PPA) under the catalyze of chorismic acid mutase (CM), which further produces tyrosine and phenylalanine. Meanwhile, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DS) is the key enzyme in this pathway. We recently engineered *Corynebacterium glutamicum* SPT9 (Phe-, Tyr-, 4-FPr and 6-FTr) for improved production of L-tryptophan. Inactivation of gene *csm* encoding chorismate mutase was firstly conducted by homologous recombination to get auxotrophic tyrosine and phenylalanine, which was different from the classical mutagenesis method. Then *aro Ⅱ*, *trpEGD* and *ts* genes encoding DS, ANS and PRT, TS were over-expressed alone or together to obtain series of recombinant strains SPT9Δ*csm*-XK99E-*aro Ⅱ-trpEGD,* SPT9Δ*csm*-XK99E-*ts,* SPT9Δ*csm*-XK99E-*cspB-ts,* SPT9Δ*csm*-mob2-*ts* and SPT9Δ*csm*-mob2-*ts-aro Ⅱ-trpEGD*. After 72 hr fermentation, the tryptophan yield in these five strains increased by 21.4%, 57.1%, 100%, 121.4% and 178.6%, respectively compared with SPT9. qPCR was employed to evaluate the transcript quantification of the target genes. The expressions of *ts*, *aro Ⅱ* and *trpEGD* genes in SPT9Δ*csm*-mob2-*ts-aro Ⅱ-trpEGD* were 9.2, 13.0 and 10.6 times, respectively of that in strain SPT9.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; L-tryptophan; homologous recombination; tryptophan synthase

L-色氨酸作为人和动物体自身不能合成而又具有多项生理功能的必需氨基酸，在医药、食品和饲料添加剂等方面具有广泛的用途[1~2]。目前，利用发酵法生产芳香族氨基酸的效率仍然很低，特别是 L-色氨酸由于产量较低，在相当长的一段时间内达不到工业化生产的要求，使得色氨酸成为氨基酸发酵工业中最难发酵的氨基酸之一。大肠杆菌由于生长迅速、遗传背景清晰被认为是生产 L-色氨酸的主要菌株。而谷氨酸棒杆菌[3]虽然是 L-谷氨酸和 L-赖氨酸的主要生产菌，

收稿日期：2013-10-14

作者简介：蔡霞，女，硕士研究生，研究方向：主要从事氨基酸代谢流工程的研究

通讯作者：郑穗平，男，教授，博士生导师，研究方向：主要从事发酵工程、代谢工程的研究

但由于 *Corynebacterium glutamicum* 在食品安全指标上的优势[4]，加之近年来模式菌株 ATCC13032[5]、ATCC14067[6]和 R[7]基因组测序的完成以及相关载体的成功构建，谷氨酸棒杆菌作为色氨酸生产菌株的选育越来越多的被研究。

谷氨酸棒杆菌中的芳香族氨基酸合成途径与大肠杆菌相似[8~9]。其合成是以磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）和 4-磷酸赤鲜糖（EP）的形成开始，到生成分支酸，在分支酸处沿不同途径分别合成色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。色氨酸的生物合成途径比较长、代谢调节机制复杂，因此从自然界中直接找到能够大量积累色氨酸的菌株比较困难。随着 DNA 重组技术的应用，构建的基因工程菌也逐渐应用于各种色氨酸生产中，大大提高了色氨酸生产菌株产酸水平和转化底物的能力。产 L-色氨酸基因工程菌的构建策略有：过量表达关键酶基因 aroII、trpEGD 等，使芳香族氨基酸合成途径更加畅通；敲除分支途径中的基因 csm，以增加分支酸流向 L-色氨酸方向的代谢流等。

目前，许多国内外研究者利用基因工程手段改造色氨酸生产菌。son 等和 Yukawa 等分别克隆了大肠杆菌色氨酸合成酶 B 亚基基因（trpB）和 A、B 亚基基因（trpBA），酶促转化生成色氨酸达 78 g/L 和 200 g/L。随后 Natsui 等用乳糖发酵短杆菌构建含 Tac 启动子、trpBA 基因的重组质粒 pAJ31902，并将其转化对 5-氟色氨酸呈抗性的宿主菌 M247，结果转化子积累色氨酸 7.5 g/L。Shibatani 等克隆了粪产碱菌（Alcaligenes fecalis）的色氨酸酶基因，工程菌色氨酸酶产量比野生菌高 4 倍。张玉彬等和 Tani 等分别构建了含色氨酸酶基因的重组质粒 pTase9、pMD6B，并将之转化至大肠杆菌，工程菌色氨酸酶表达量皆占总可溶性蛋白的 30%。

本文主要集中在提高 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸（DAHP）的供应以及色氨酸的最终转化率上。运用分子生物学手段，在谷氨酸棒杆菌 SPT9 中敲除分支酸变位酶基因 csm，将基因 ts、trpEGD 及 aroⅡ在菌株 SPT9Δ*csm* 中分别过量表达和串联过量表达，能够有效提高 L-色氨酸的产量。从而为定向优化 L-色氨酸的代谢流，提高 L-色氨酸产量奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 培养基和生长条件

LB 培养基：细菌蛋白胨 1%，氯化钠 1%，酵母提取物 0.5%，固体培养基添加 1.5%琼脂后灭菌；种子培养基：葡萄糖 2%，酵母提取物 1.5%，蛋白胨 1.5%，尿素 0.1%，氯化钠 0.25%，Phe 200 mg/L，Tyr 200 mg/L，pH 7.2；发酵培养基：葡萄糖 6%，玉米浆 1%，硫酸铵 2%，磷酸二氢钾 0.05%，磷酸氢二钾 0.05%，七水硫酸锰 10 mg/L，七水硫酸镁 0.025%，碳酸钙 2%，pH 7.2，115 ℃灭菌 20 min，葡萄糖、碳酸钙分开灭菌。所有培养基需要时，添加卡那霉素至终浓度为 50 μg/mL。*Escherichia coli* 在 37 ℃ LB 中培养，谷氨酸棒杆菌在 30 ℃ LBG（LB+2%葡萄糖）中培养。

1.2 菌株、质粒和引物

所有的菌株和质粒如表 1，主要的引物及其序列如表 2。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain	Relevant characteristics	Source or ref
E.coli TOP10	F-, mcrAΔ (mrr-hsd RMS-mcrBC), φ8, lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araΔ139Δ (ara-leu) 7697, galU, galK, rps, (Strr) endA1, nupG	Laboratory strain
C.glutanicum SPT9	Derived from ATCC 13032	Laboratory strain
SPT9Δcsm	SPT9 with deletion in the csm gene	This work
SPT9Δcsm-XK99E-ts	SPT9Δcsm with plamid pEC-XK99E-ts	This work
SPT9Δcsm-XK99E-cspB-ts	SPT9 Δcsm with plamid pEC-P-cspB-ts	This work
SPT9Δcsm-XK99E -aro Ⅱ-trpEGD	SPT9 Δcsm with plamid pEC-XK99E-aroⅡ-trpEGD	This work
SPT9Δcsm-mob2-ts	SPT9Δcsm with plamid pEC-T18mob2-ts	This work
SPT9Δcs-mob2-ts-XK99E-aro Ⅱ-trpEGD	SPT9Δcsm with plamid pEC-T18mob2-ts and pEC-XK99E-aroⅡ-trpEGD	This work

转下页

接上页

pk18mobsacB	Km^r, mobilizable (oriT), oriV	Andreas Schgfer, 1994
pK18mobsacB-Δcsm	*E.coli-C.glutamicum* shuttle vectors(Tet^r)	This work
pEC-XK99E	Km^R, *E.coli-C.glutamicum* shuttle vector	Oliver Kirchner, 2003
pEC-P-cspB	pEC-XK99E with changed promoter	This work
pEC-T18mob2	Tet^R, *E.coli-C.glutamicum* shuttle vector	Achim Marx, 2002
pEC-XK99E-ts	Plasmid containing *ts* in pEC-XK99E	This work
pEC-XK99E-cspB-ts	Plasmid carrying *ts* in pEC-P-*cspB*	This work
pEC-XK99E-aro Ⅱ-trpEGD	Plasmid carrying *aro Ⅱ-trp EGD* in pEC-XK99E	This work
pEC-T18mob2-ts	Plasmid containing *ts* in pEC-T18mob2	This work

表 2 本研究中用到的主要引物

Table 2 Main oligonucleotides used in this study

Main Oligonucleotides	sequences	purpose
csm-1	GGAATTCCCGTCGCCTGGCAGGTGTTCTTG	Primers for plasmid construction
csm-2	CAGGTCTAGTCAGTTATCTATGCCCTCGCTGGAATTTTGC	
csm-3	TAGATAACTGACTAGACCTGTTCTGCCACGTCTGGCTGTCG	
csm-4	CGGGATCCCGGCAGCCTTATTGGTAAAGGTAATG	
TS-1	CGCGGTACCATGACTGAAAAAGAAAACTTGG	
TS-2	ACTCGTCGACCTAAACCTTCTTGGTCGCTG	
aro Ⅱ-1	GCTCTAGATCGATCTGCTCCCATTCCATAGGTTGG	
aro Ⅱ-2	CGACGTCGACTTAGTTACGCAGCATTTCTGCAACGAG	
trpEGD-1	CCGGAATTCATGAGCACGAATCCCCATGTTTTCTC	
trpEGD-2	CGCGGATCCCTAGTCATTGGAAGACTCCTTTTCTG	
RT-dnaE-1	TCTCACGCCGCAGGTTAT	Primers for RT-PCR
RT-dnaE-2	TGTCGGCAATCAGAAAGG	
RT-csm-1	ATGATTGCTACTTCTCGGGTGTG	
RT-csm-2	ATCAACCGCTTGGACCGC	
RT-TS-1	TTCCCAACCATCGTGCGT	
RT-TS-2	CGACACAGGCGACCACAAC	
RT-trpEGD-1	TAAGCCCAACGGGTCCTGTC	
RT-trpEGD-2	ACGTCATCGTATTCACCCAC	
RT-aro Ⅱ-1	AATAGGGGTGTGAGTTGGAC	
RT-aro Ⅱ-2	CCTCAGGGGCAACAACGATT	

1.3 酶与试剂盒

限制性内切酶、T4 DNA ligase、Taq DNA Polymerase、SYBR® PrimeScriptTM RT-PCR Kit、DNase I（RNase Free）、溶菌酶、均为宝生物工程（大连）有限公司产品；质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司；RNA 提取试剂盒 RNeasy midi Kit、PCR 产物凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司；RNA 纯化试剂盒购自 MN 公司（Nucleospin RNA Clean-up，Macherey Nagel）。

1.4 DNA 的基本操作

大肠杆菌中的质粒提取具体操作见质粒提取试剂盒（Takara），提取 *C glutamicum* 基因组参照文献[10]。利用电击进行谷氨酸棒杆菌的转化[11]，大肠杆菌转化利用 $CaCl_2$ 化学方法。

1.5 重组质粒和重组菌的构建

1.5.1 csm 基因的敲除

以 *C glutamicum* SPT9 基因组为模板分别扩增上

游片段和下游片段，经回收纯化后，进行重叠 PCR 反应得到 csm 基因内缺失部分碱基的 DNA 片段。扩增体系为 50 μL：ddH$_2$O 37.5 μL，10×E Buffer 5 μL，dNTP 5 μL，引物各 0.5 μL，模板 1 μL，Ex Taq 酶 0.5 μL。PCR 反应程序：95 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，65 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 40 s/min，30 个循环；72 ℃最后延伸 10 min。扩增所得片段 Δcsm 和质粒 pK18mobsacB 均用 EcoR I 和 BamH I 双酶切，双酶切体系如下：载体或目的基因片段 25.0 μL，10×K buffer 5.0 μL，EcoR I、Kpn I 各 2.5 μL，补水至 50 μL，37 ℃酶切 12 h。双酶切产物用 1%琼脂糖凝胶回收，用于下一步的连接反应。连接反应体系 10 μL：片段 6.0 μL，载体 2.0 μL，10×T4 DNA 连接酶 Buffer 1.0 μL，T4 DNA 连接酶 1.0 L，将上述连接体系于 16 ℃连接过夜。将上述连接体系转化入大肠杆菌 TOP10 感受态，涂布于含卡那霉素至终浓度为 50 μg/mL 的 LB 平板上，37 ℃恒温培养 12~16 h。挑选单菌落进行菌落 PCR 鉴定（PCR 体系同前目的基因的 PCR 体系），将鉴定正确的菌落转接入含卡那霉素至终浓度为 50 μg/mL 的 LB 液体培养基中，37 ℃，200 r/min 过夜培养，提质粒进行双酶切鉴定，酶切体系同前。将所得所得质粒命名为 pk18mobsacB-Δcsm 转入 *C.glutamicum* SPT9 获得重组菌 SPT9-Δ*csm*。

1.5.2 将 pEC-XK99E 表达载体的启动子 Ptrc 替换为 P-cspB

P-cspB 和质粒 pEC-XK99E 均用 sph Ⅰ酶切，酶切体系 50 μL：载体或目的基因片段 25.0 μL，10×H buffer 5.0 μL，sph Ⅰ 5.0 μL，补水至 50 μL，37 ℃酶切 12 h。连接、转化、鉴定如 1.5.1 所述。

1.5.3 重组菌 *SPT9Δcsm-XK99E-trpEGD-aro Ⅱ* 的构建

重组质粒 pEC-XK99E-trpEGD-aroⅡ的构建参照文献[12]，将此质粒转入谷氨酸棒杆菌 SPT9Δ*csm* 获得重组菌 *SPT9Δcsm-XK99E-trpEGD-aro Ⅱ*。

1.5.4 重组菌 *SPT9Δcsm-XK99E-ts*、*SPT9Δcsm-XK99E-cspB-ts* 和 *SPT9Δcsm-mob2-ts*、*SPT9Δcsm-ts-trpEGD-aro Ⅱ*的构建

目的基因 *TS* 的扩增如 1.5.1 所述，获得的片段 *TS* 用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切后分别连接到同样用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切的质粒 pEC-XK99E、pEC-P-*cspB* 和 pEC-T18mob2 上。酶切体系 50 μL：载体或目的基因片段 25.0 μL，10×H buffer 5.0 μL，Kpn I、Sal I 各 2.5 μL，补水至 50 μL，37 ℃酶切 12 h。连接、转化、鉴定如 1.5.1 所述。获得的新质粒分别命名为 pEC-XK99E-ts、pEC-P-cspB-ts 以及 pEC-T18mob2-ts。将这 3 个质粒分别转入谷氨酸棒杆菌 *SPT9Δcsm*，得重组菌 *SPT9Δcsm-XK99E-ts*、*SPT9Δcsm-XK99E-cspB-ts* 和 *SPT9Δcsm-mob2-ts*。同时，用同样的方法获得重组菌 *SPT9Δcsm-ts-trpEGD-aro Ⅱ*。

1.6 重组菌的发酵

将平板上活化的重组菌挑取一环接种至种子培养基中，250 r/min，30 ℃过夜培养 24 h。转接于新的种子培养基中，250 r/min，30 ℃培养至生长对数中后期，转接至发酵培养基，控制其初始 OD_{600} 为 1.0，培养 12 h 后添加终浓度为 0.2 g/L 的 IPTG，共发酵 72 小时，做三个平行。

1.7 HPLC 分析 L-色氨酸产含量

色谱条件：高效液相色谱仪 Waters 1525，色谱柱 Agilent 20RBAX SB-C18（4.6×150 mm，5 μm），紫外检测器 Waters2487 在 280 nm 处测定发酵液中 L-色氨酸含量[13]。其中流动相配比：甲醇：0.02 mol/L 乙酸钠缓冲液（用乙酸调 pH 至 4.5）=30:70，流动相流速：0.8 mL/min，进样量：10 μL。

1.8 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达量

总 RNA 的提取方法参照 RNA 提取试剂盒 RNeasy midi Kit（QIAGEN），将提出的总 RNA 进行反转录反应获得其 cDNA。荧光定量 PCR 选取 dnaE 为内参基因，RT-PCR 体系及方法参照 SYBRR Premix EX-TaqTM II 试剂盒（Takara，Japan），每个反应均做 3 孔重复。

2 结果及讨论

2.1 质粒和重组菌株的鉴定

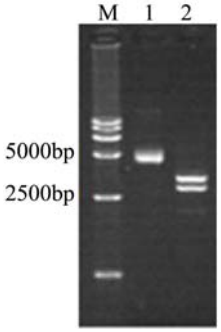

图 1 双酶切鉴定重组质粒 pEC-P-cspB

Fig.1 Identification of the recombined plasmid pEC-P-*cspB*

注：M: DNA Marker DL15000bp ladder；1：重组质粒

pEC-P-cspB；2：pEC-P-cspB 的 XbaⅠ、HindⅢ双酶切产物。

将 pEC-XK99E 表达载体的启动子 Ptrc 替换为 P-cspB 获得新质粒 pEC-PcspB，重组质粒用 XbaⅠ/HindⅢ双酶切后鉴定，如图 2。

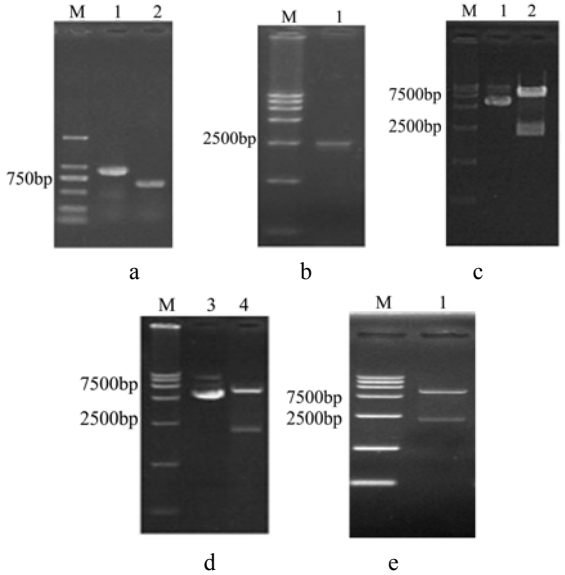

图 2 带有 ts 基因重组质粒的鉴定

Fig.2 Verification for recombinant plasmids with ts gene

注：a：1.*csm* 的 PCR 产物；2.突变基因 Δcsm 的 PCR 产物；b：1.基因 *ts* 的 PCR 扩增产物；c：1.质粒 PEC-XK99E-*ts*；2.重组质粒 PEC-XK99E-ts 的双酶切产物；d：3.质粒 PEC--XK99E-cspB-ts；4.重组质粒 PEC-XK99E-cspB-ts 的双酶切产物；e：1.重组质粒 pEC-T18mob2-ts 的双酶切。

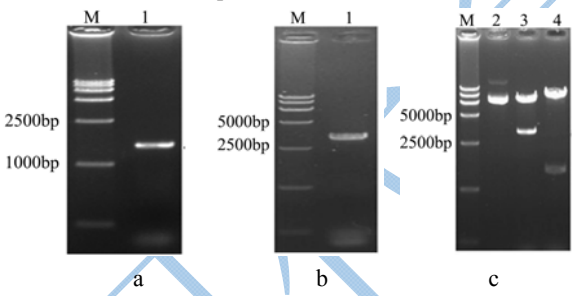

图 3 带有基因 aroⅡ和 trpEGD 重组质粒的鉴定

Fig.3 Verification for recombinant plasmids with aroⅡ and trpEGD genes

注：a：1.aroⅡ的 PCR 产物；b：1.trpEGD 的 PCR 产物；c：2.质粒 pEC-XK99E-trpEGD-aroⅡ；3.重组质粒 PEC-XK99E-aroⅡ-trpEGD 的 EcoRⅠ、BamHⅠ双酶切产物；4.重组质粒 PEC-XK99E-aroⅡ-trpEGD 的 XbaⅠ、SalⅠ双酶切产物。

缺陷突变株 *SPT9Δcsm* 通过 PCR 鉴定，同时所有单独过量表达或串联过量表达基因 ts、aroⅡ和 trpEGD 的菌株也进行了鉴定。

2.2 重组菌色氨酸产量及目的基因相对表达量的检测

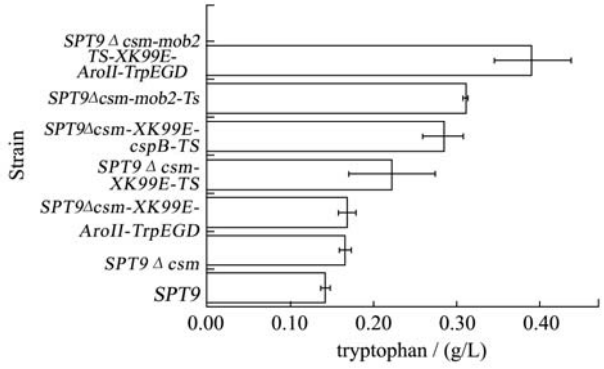

图 4 出发菌株和重组菌株的色氨酸产量

Fig.4 L-tryptophan yield of the relative strains

如图 4 所示，通过将基因 ts、aroII、trpEGD 在重组菌 SPT9-Δcsm 中共表达，色氨酸的产量从 0.14 g/L 上升到 0.39 g/L。

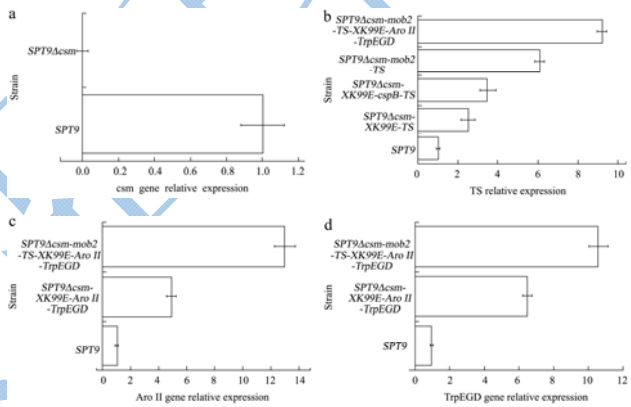

图 5 重组菌中目的基因的相对表达量

Fig.5 Evaluation of target gene relative expression quantitation of the recombinant strains

为了提高色氨酸的产量，构建重组菌 *SPT9Δcsm*，色氨酸产量相对于野生型菌株 SPT9 从 0.14 g/L 上升到 0.16 g/L，如图 4。同时，荧光定量 PCR 结果显示基因 csm 的表达量锐减（如图 5a）。

将基因 aroⅡ和 trpEGD 在 *SPT9Δcsm* 中分别过量表达，色氨酸的产量是它们在野生型菌株 SPT9 中的 4.9 倍、6.5 倍（如图 5c、d）。重组菌 *SPT9Δcsm-aroⅡ-trpEGD* 发酵 72 h 后，色氨酸产量为 0.17 g/L，相对于 WT SPT9 色氨酸产量提高了 21.4%。在本研究中，aroⅡ没有突变或是解除抑制，可能使该基因对提高色氨酸产量没有很大的贡献，而且不同的出发菌也可能导致不同程度的过量表达。

色氨酸合成酶（TS）对 L-色氨酸的产量影响很大。基因 *ts* 在重组菌 *SPT9Δcsm-XK99E-ts*、*SPT9Δcsm-XK99E-cspB-ts* 以及 *SPT9Δcsm-mob2-ts* 中的表达量是

它在野生型菌株 *SPT9* 中的 2.5 倍、3.5 倍以及 6.1 倍（如图 5b）。这三株重组菌中的色氨酸表达量都比 *SPT9Δcsm-aro Ⅱ-trpEGD* 中的高，表明色氨酸的产量与 *ts* 基因的表达有很大关系。将上述 3 株菌分别发酵 72 h 后，色氨酸产量分别为 0.22 g/L、0.28 g/L、0.31 g/L，相对于 WT SPT9 色氨酸产量分别提高了 57.1%、100%、121.4%，表明在不同的启动子下 ts 基因的表达量不同。

当基因 aroⅡ、trpEGD 和 ts 在 *SPT9Δcsm* 中共同表达时色氨酸的产量上升到 0.39 g/L，如图 4，这可能是基因 ts 和 aroⅡ-trpEGD 的相互作用激活了其他基因的表达，从而导致色氨酸的产量提高了 178.6%。而且，重组菌 *SPT9Δcsm-mob2-ts-aro Ⅱ-trpEGD* 中色氨酸的高表达可以通过荧光定量 PCR 验证。通过 HPLC 法测定色氨酸产量，表明基因 ts，aroⅡ和 trpEGD 在重组菌 *SPT9Δcsm-mob2-ts-aro Ⅱ-trpEGD* 中的表达量是它们在菌株 SPT9 中的 9.2 倍、13.0 倍以及 10.6 倍。

3 结论

3.1 本研究通过同源重组敲除基因 csm 获得酪氨酸和苯丙氨酸营养双缺陷型菌株 *SPT9Δcsm*，使流向色氨酸合途径的分支酸增多，L-色氨酸产量增加了 14.2%。同时，在 *SPT9Δcsm* 中串联过量表达基因 aroⅡ、trpEGD 和 ts，使色氨酸产量提高了 178.6%。这表明同时增加 aroⅡ、trpEGD 和 ts 的表达量对 L-色氨酸的合成是有效的。

3.2 随着更多系统的生物学工具应用在 *Corynebacterium glutamicum* 中，达到食品和药品安全指标的谷氨酸棒杆菌未来在色氨酸工业生产上将很有应用前景。

参考文献

[1] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins [J]. J. Biotechnol., 2003, 104(1-3): 5-25

[2] 陈涛,陈宁.L-色氨酸的生产及其代谢控制育种[J].生物技术通讯,2000,11(2):141-145
CHEN Tao, CHEN ning. The production of L-tryptophan and breeding of tryptophan producting strains by metabolic control [J]. Letters in Biotechnology, 2000, 11(2): 141-145

[3] Gregory F, Oxenkrug M D, PhD. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later [J]. Isr. J. Psychiatry Relat. Sci., 2010, 47(1): 56-63

[4] Wang X, Quinn P J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification [J]. Prog. Lipid Res., 2010, 49(2): 97-107

[5] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 62(2-3): 99-109

[6] Lv Yang-yong, Liao Juan-jun, Wu Zhan-hong, et al. Genome Sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, Which Provides Insight into Amino Acid Biosynthesis in Coryneform Bacteria [J]. J. Bacteriol., 2012, 194(3): 742-743

[7] Yukawa H, Omumasaba C A, Nonaka H, et al. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R [J]. Microbiology, 2007, 153(4), 1042-1058

[8] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 69(6): 615-626

[9] Eggeling L, Bott M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2005: 493-509

[10] Eikmanns B J, Thum-Schmitz, Eggeling L, et al. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* gltA gene encoding citrate synthase [J]. Microbiology, 1994, 140 (8): 1817-1828

[11] Van der Rest M E, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52(4): 541-545

[12] 李智涛,伍展红,郑穗平.谷氨酸棒杆菌*aroII*、*trpEGD*基因的过量表达及其对色氨酸合成的影响[J].生物技术通报,2011, 5:151-156
LI Zhi-tao, WU Zhan-hong, ZHENG sui-ping. Over-expression of aroII and trpEGD Genes in *Corynebacterium glutamicum* and their effectson tryptophan yield [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 5: 151-156

[13] Donzanti B A, Yamamoto B K. An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates [J]. Life sciences, 1988, 43(11): 913-922