

利用谷氨酸棒状杆菌高效表达枯草芽孢杆菌的 谷氨酰胺合成酶发酵生产 L-谷氨酰胺

白 婧, 吴桐思雨, 王 期, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子医学重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 谷氨酰胺合成酶(GS)是用于合成 L-谷氨酰胺(L-Gln)过程中的关键酶,然而 GS 的酶活受到多种因素的影响,导致其酶活不强,产物 L-Gln 偏低. 本研究以 GS 的基因为研究对象,构建谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的高效表达系统. 利用 *C. glutamicum* 中的两种强启动子: tac 启动子(Ptac)和麦芽糖启动子(Pmal),比较不同启动子的作用下 GS 的酶活力;其次,为了避免腺苷酰化对 *C. glutamicum* 的 GS 的抑制作用,将 GS 的腺苷酰化位点突变成苯丙氨酸(Tyr405Phe);同时由于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 GS 不受腺苷酰化作用的影响,故将 *Bacillus subtilis* 的 GS 基因导入到 *C. glutamicum* 的表达系统中,比较两种基因来源不同 GS 的酶活高低,以期达到高产 L-Gln 的目的. 本研究第一次应用 *Bacillus subtilis* 来源的 GS 在 *C. glutamicum* 的系统中表达. 最终的结果表明,在 *C. glutamicum* 的表达系统中, Ptac 比 Pmal 的效果更好,来自 *Bacillus subtilis* 的 GS 比来自 *C. glutamicum* 的 GS 酶活力更高. 重组菌 BJ2 有最高的酶活力和产量, L-Gln 的最终产量达到 32.5 g/L.

[关键词] 谷氨酸棒状杆菌, tac 启动子, mal 启动子, 谷氨酰胺合成酶

[中图分类号] Q789 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2015)02-0078-08

Glutamine Synthetase of *Bacillus subtilis* is Applied to *Corynebacterium glutamicum* Fermentation System to Produce L-Glutamine

Bai Jing, Wu Tongsiyu, Wang Qi, Yin Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,
Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Glutamine synthetase (GS) is the key enzyme responsible for L-glutamine (L-Gln) synthesis. However, enzymatic activity of GS is influenced by many factors, leading to the low enzyme activity and the low production of L-Gln. In this study, in order to improve the yield of L-Gln, a high-effective expression system was constructed in *Corynebacterium glutamicum* with *glnA* gene. We tested two different strong promoters, promoter tac (Ptac), and promoter mal (Pmal), for a comparison of the activity of GS. After then, for avoiding the adenylation in *C. glutamicum*, we constructed plasmids containing the point mutation of *glnA*, in which Tyr405 is replaced by a phenylalanine residue. Since the glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* is not regulated via adenylation, we also compared *C. glutamicum* GS activity with *Bacillus subtilis*'s to detect the enzyme activity in the given system. Light point of this study is to express GS of *Bacillus subtilis* in *C. glutamicum* expression system for the first time. The results reveal that promoter tac was more capable for producing L-Gln in *C. glutamicum* system. GS enzyme from *Bacillus subtilis* had the higher activity than *C. glutamicum*'s. The recombinant strain BJ2 has the highest GS activity and produce 32.5 g/L L-glutamine.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*, promoter tac, promoter mal, Glutamine synthetase

目前很多蛋白和非蛋白代谢产物都可以通过基因工程技术,在载体上连接目的基因的编码序列,导入受体菌中以达到产生新的代谢途径或获得高产菌株的目的^[1]. 在细菌中,大肠杆菌作为受体菌长期以来一直受到大家的青睐. 但是大肠杆菌是革兰氏阴性菌,外排到培养液中的代谢产物极其有限,而且高表达

收稿日期: 2014-12-25.

基金项目: 江苏省科技厅前瞻性研究项目(BY2013001-03).

通讯联系人: 殷志敏, 教授, 博导, 研究方向: 生物化学及细胞生物学. E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

外源基因经常会形成无活性的包涵体. 因此,我们急需一种更加高效的可以分泌代谢产物的菌株. 谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是革兰氏阳性菌,非致病菌且不产生孢子,长期以来一直用于工业生产多种 L 型氨基酸^[2]. 每年大约有 700 000 t 的 L-谷氨酸和 300 000 t 的 L-赖氨酸都是通过谷氨酸棒状杆菌发酵生产出来的. 自从 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 和 ATCC14067 的全基因组测序完成后,它在工业生产和基因工程方面的应用潜能进一步被挖掘^[3].

在过去,人们期望通过经典的随机诱变育种技术筛选出高产 L-谷氨酰胺(L-Gln)的菌株,这种方法工作量大、随机性、不可控性的缺陷很明显. 后来人们又用酶法将 L-Glu 转变成 L-Gln,这种方法的缺点是成本过高,难以进一步放大生产,另一个问题是 ATP 的再生问题^[4,6]. 因此,更加明智的方法是利用现代分子生物学技术,构建高产 L-Gln 的工程菌株^[5].

为了实现 L-Gln 的工业化生产和提高 L-Gln 的产量,作者采用基因重组手段构建了多种重组菌株,比较了含有不同启动子和不同来源的谷氨酰胺合成酶的重组菌在发酵液中的表现. 最终实验结果表明,将强启动子 tac 与枯草芽孢杆菌的谷氨酰胺合成酶组合,构建得到的 BJ2 工程菌株,在谷氨酸棒状杆菌的发酵体系中培养,表现出了较强的酶活和较高的 L-Gln 产量,本研究为今后国内高产菌株的开发与应用奠定了坚实的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

C. glutamicum ATCC13032, *E. coli* DH5 α 为本实验室保存; *E. coli*-*C. glutamicum* 穿梭表达质粒 pEKEX2 为南京师范大学尚广东副教授馈赠; pET-3C 质粒由本实验室保存.

1.1.2 试剂和仪器

Prime STAR HS DNA Polymerase、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DL2000 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司;质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒为 Axygen 公司产品;PCR 引物购自上海英俊生物技术公司;30%的丙烯酰胺购自上海伯乐生物公司;卡那霉素、蛋白分子量标准购自上海生工公司;细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;谷氨酰胺合成酶(GS)酶活测试盒,葡萄糖测试盒,谷氨酰胺测试盒均购自南京建成生物科技有限公司;Flag 抗体,荧光标记二抗购自 Cell Signaling Technology;胰蛋白胨、酵母粉为进口分析纯,其余试剂均为国产分析纯;电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser^{II};PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 S1000;美国宝特 Bio-Tek 生产的酶标仪;英国 Sanyo 公司生产的超声波破碎仪(Soniprep150);Agilent 1260 Infinity HPLC 检测系统.

1.1.3 DNA 测序

由南京思普金生物公司完成测序.

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建

本实验所使用和构建的质粒和工程菌株均列于表 1,PCR 引物列于表 2. 以 *C. glutamicum* ATCC13032 的基因组为模板^[7,8],扩增得到 1 434 bp 的谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*,为解决 *C. glutamicum* 的谷氨酰胺合成酶受到腺苷酰化作用的影响^[9-12],设计定点突变引物,通过融合 PCR 的方法,将 *glnA* 405 位的酪氨酸(Tyr405)突变成苯丙氨酸(Phe405)^[8,13,14],以 *Sal* I - *Sac* I 酶切后,连接到 *E. coli*-*C. glutamicum* 穿梭表达载体 pEKEX2 上,获得 pEKEX2-Ptac-*glnA*^m;有文献报道,枯草芽孢杆菌的 GS 不受腺苷酰化作用的影响^[12],以实验室保存的重组质粒 pET3C-*glnA*^{BS}为模板,扩增出来源于 *Bacillus subtilis* 的谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*^{BS},用 *Sal* I - *Kpn* I 双酶切之后,插入到 pEKEX2 中,获得重组质粒 pEKEX2-Ptac-*glnA*^{BS}.

麦芽糖(mal)启动子是 *C. glutamicum* 表达系统中的强启动子^[15],我们构建了 pEKEX2-Pmal-*glnA*^m, pEKEX2-Pmal-*glnA*^{BS}. 首先设计引物分别将 mal 启动子和 *glnA*^m、*glnA*^{BS}进行融合 PCR,将获得的融合片段 Pmal-*glnA*^m 和 Pmal-*glnA*^{BS}用 *Apa* I - *Kpn* I 双酶切,纯化后插入载体 pEKEX2 中.

透明颤菌(*Vitreoscilla*)含有血红蛋白(VHb),能够解决细菌在贫氧条件下的生长问题. 本实验尝试利用透明颤菌的血红蛋白基因(*vgb*)来解决 *C. glutamicum* 发酵过程中能量供给不足的难题,从而提高 L-Gln

的产量^[16]. 为此分别构建了 pEKEX2-Ptac-*glnA^m*-*vgb*-Flag、pEKEX2-Ptac-*glnA^{BS}*-*vgb*-F、pEKEX2-Ptac-*glnA^m*-F-Ptac-*vgb*-F 和 pEKEX2-Ptac-*glnA^{BS}*-F-Ptac-*vgb*-F.

表 1 本研究的菌株和质粒

Table 1 List of strains and plasmids used in this study		
菌种和质粒	基因型	来源
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , Δ(lacZYA-argF) U169, deoR, recA1, endA1, phoA, supE44, gyrA96, relA1, λ ⁻ , thi-1, hsdR17(RK ⁻ , MK ⁺)	本实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Wild-type	本实验室保存
pEKEX2	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle vector, Km ^R	本实验室保存
BJ-1	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2	本研究构建
BJ-2	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX 2-Ptac- <i>glnA^{BS}</i>	本研究构建
BJ-3	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX 2-Ptac- <i>glnA^m</i>	本研究构建
BJ-4	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2-Pmal- <i>glnA^{BS}</i>	本研究构建
BJ-5	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2-Pmal- <i>glnA^m</i>	本研究构建
BJ-6	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2-Ptac- <i>glnA^m</i> - <i>vgb</i> -F	本研究构建
BJ-7	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2-Ptac- <i>glnA^{BS}</i> - <i>vgb</i> -F	本研究构建
BJ-8	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2-Ptac- <i>glnA^m</i> -F-Ptac- <i>vgb</i> -F	本研究构建
BJ-9	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032/pEKEX2-Ptac- <i>glnA^{BS}</i> -F-Ptac- <i>vgb</i> -F	本研究构建

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 List of primers used in this study	
引物	序列(5' to 3')
Primer1	CGCTCGACAAGGAGATATAGATATGGCGTTTG(<i>Sal</i> I)
Primer2	CTGGTGGTAGTTCTGAAGAGCTCCTTGCCAC
Primer3	GTGGACAAGGACCTCTTCGAACCTACCACCAG
Primer4	CGAGCTCTTAGCAGTCGAAGTACAATTCTGAATTCCTGCTG(<i>Sac</i> I)
Primer5	GCGTCGACAAGGAGATATAGATATGGCAAAGTACACTAGAG(<i>Sal</i> I)
Primer6	CGGGATCCATATTGAGACATATACTGTTCCGCGCTC(<i>Bam</i> H I)
Primer7	GGGGTACCTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTG(<i>Kpn</i> I)
Primer8	GTTTGCTGCTCTAACATATCTATATCTCCTTCATGCAAGCTTGGCGTAATC
Primer9	GATTACGCCAAGCTTGCATGAAGGAGATATAGATATGTTAGACCAGCAAACC
Primer10	CGAGCTCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAACTTCAACCGCTTGAGC(<i>Sac</i> I)
Primer11	GCGGGCCCTCTCGCGTGCCCAAC(<i>Apa</i> I)
Primer12	GTTTCAAACGCCATGAGGTCCCTCATCTT
Primer13	AAGATGAGGACCTCATGGCGTTTGAAAC
Primer14	GGGGTACCTTAGCAGTCGAAGTACAATTCGAATTCCTG(<i>Kpn</i> I)
Primer15	GCGGGCCCTCTCGCGTGCCCAAC(<i>Apa</i> I)
Primer16	TGTACTTTGCCATGAGGTCTCATCTT
Primer17	AAGATGAGGACCTCATGGCAAAGTACA
Primer18	GGGGTACCTTAATATTGAGACATATACTGTTCCGCG(<i>Kpn</i> I)

1.2.2 发酵生产 L-Gln 的培养条件、生产曲线和葡萄糖残糖量的检测

1.2.2.1 发酵生产 L-Gln 的培养条件

C. glutamicum 的种子液培养用 LBG 培养基(葡萄糖 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 固体培养基中添加 1.5%的琼脂粉); 感受态细胞的制备和电转化用 LBHIS 培养基(蛋白胨 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 酵母提取物 2.5 g/L, 脑心浸出液 18.5 g/L, 山梨醇 91 g/L, 固体培养基中添加 1.5%的琼脂粉); 发酵培养基(葡萄糖 100 g/L, 硫酸铵 70 g/L^[17,18], 玉米浆 12 g/L, 氯化钠 2 g/L, 磷酸氢二钾 8 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 硫酸素 1 mg/L, 生物素 6 μg/L, 硫酸锰 0.4 mg/L, 四硼酸钠 0.04 mg/L, 硫酸锌 0.1 mg/L, 硫酸亚铁 5 g/L^[19,20]). 含有 Pmal 的重组菌, 麦芽糖在发酵培养基中既作碳源, 又作诱导剂. 接菌前, 在培养基中加入 50 μg/mL 的卡那霉素(Kan), 培养过夜后, 转接至 20 mL 的发酵培养基中, 使初始 OD 值约为 0.2; 当菌体长到对数中后期时, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 GS 表达; 整个发酵过程中, 培

养温度 30 ℃,用 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调控 pH,使发酵培养基中的 pH 保持在 6.0~6.5^[17,21]。

1.2.2.2 生长曲线的测定和残糖量的检测

选取重组菌 BJ1 (Wild-type/pEKEX2)、BJ2 (Wild-type/pEKEX2-Ptac-*glnA^{BS}*) 和 BJ3 (Wild-type/pEKEX2-Ptac-*glnA^m*) 在发酵培养基中培养,初始的 OD 值为 0.2,在发酵前期 32 h,每隔 2 h 测一次 OD; 32 h 后,每隔 4 h 测一次 OD。用从南京建成生物科技有限公司购买的葡萄糖测试盒,测定发酵培养基中剩余的葡萄糖的含量。

1.2.3 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 感受态细胞的制备和电转化

1.2.3.1 谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 感受态细胞的制备

从-80 ℃冰箱中取出冻存的野生型的 *C. glutamicum* ATCC13032,在 LBG 固体培养基上划线复壮,在 30 ℃培养箱中培养 24 h。然后,挑取单菌落至 4 mL 的 LBG 液体培养基中,在 30 ℃的摇床中,220 r/min 培养 16 h。接着,转接至 160 mL 的 LBHIS 液体培养基中,当培养基中的 *C. glutamicum* 的 OD₆₀₀ 值达到 0.5 左右时收菌,5 000 g,4 ℃离心 20 min,弃上清,用 40 mL 的冰预冷的 TG 缓冲液(1 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 pH 7.5,10%甘油)和冰预冷的 10%甘油分别清洗沉淀菌 2 次,最后用 500 μL 的 10%的冰预冷的甘油重悬沉菌,分装在 1.5 mL 的 EP 管中,每管 100 μL,在-80 ℃冰箱中保存。

1.2.3.2 电转化方法

从-80 ℃冰箱中取出 *C. glutamicum* ATCC13032 的感受态细胞,放在冰上融化,电击杯也放在冰上遇冷;吸取 1 μL 的重组质粒至感受态细胞中,反复吹打混匀后,将其转至电击杯中,注意不能有气泡,放入电转仪 Gene Pulser[®] 电击,25 F、12.5 kV/cm、200 Ω;电击后立刻转移到 1.5 mL 的 EP 管中,加入 800 μL 的 LBHIS 液体培养基,46 ℃水浴锅中热击 6 min;放在 30 ℃的摇床 200 r/min,培养 1.5 h 后涂布在 LBHIS 固体培养基上,30 ℃下培养 1 d~2 d。

1.2.4 Western blot 检测重组蛋白的表达

用接菌环从平板上挑取新复壮重组菌,接菌到 4 mL 的 LBG 液体培养基中(含有 50 μg/mL Kan),30 ℃,220 r/min 震荡培养 12 h。将菌液转接至 20 mL 新鲜的发酵培养基中,使初始 OD₆₀₀ 为 0.2,30 ℃,220 r/min 震荡培养,待 OD₆₀₀ 值达到 7~10 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,诱导过夜。取 5 mL 培养液 4 ℃下 12 000 g 离心 2 min 收菌,用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 次,最后用 200 μL PBS 溶液重悬,加入 14.3 mmol/L β-巯基乙醇和 0.5 mmol/L PMSF 后进行超声波破碎^[22]。4 ℃下 12 000 g 离心 30 min 去除细胞碎片,收集上清即得蛋白粗提液,用标准 Western blot 方法检测重组蛋白的表达^[23]。

1.2.5 谷氨酰胺合成酶的酶活力的检测

粗酶液提取方法同 1.2.4,利用谷氨酰胺合成酶(GS)酶活测试盒检测重组菌中 GS 的酶活。

1.2.6 HPLC 检测 L-Gln 的产量

本实验选用 Hypersil NH2 柱(4.6×150 mm,直径 5 μm),以乙腈-50 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调 pH 值至 4.0),70:30 为流动相;流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 215 nm;柱温为 40 ℃。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的测定和葡萄糖消耗量的检测

生长曲线是测定细胞绝对生长数的常用方法,也是判定细胞活力的重要指标。本实验通过对重组谷氨酸棒状杆菌生长曲线的测定,可以得到重组菌 BJ1、BJ2、BJ3 进入对数生长期和稳态期的时间。如图 1(a)所示,重组菌的生长曲线与含有空载体的对照菌 BJ1 基本相同,这说明导入外源表达载体不会影响重组菌的正常生长。重组菌 BJ2、BJ3 在 4 h~13 h 为对数生长期,15 h 之后进入稳态期;含有空载体的对照菌 BJ1 的对数生长期为 4 h~16 h,在 18 h 以后进入稳态期。通常,为更好地诱导酶的表达,需要在对数生长期的中后期添加 0.1 mmol/L~1.0 mmol/L IPTG,因此,根据图 1(a)所示,在重组菌生长到对数生长期的中后期约为 7 h~10 h 时,及时向发酵培养基中加入 0.5 mmol/L 的 IPTG。

为精确地测定培养基中葡萄糖的含量,整个发酵过程中没有向培养基中加入额外的葡萄糖和其他碳源。如图 1(b)所示,前 24 h,葡萄糖的含量急剧下降,说明在进入对数生长期之后,菌体迅猛增长,消耗大量的碳源来维持能量;在 24 h 时,菌体已生长到稳态期,葡萄糖的剩余量约为 30 mmol/L;24 h~60 h,葡萄

糖的下降趋势缓慢;60 h 时,葡萄糖基本消耗殆尽. 因此,为了保证发酵菌液的长势良好、代谢旺盛,需在 24 h 前补加足够菌体生长的葡萄糖,并在 24 h、36 h 和 48 h 分别补加 10 g/L 的葡萄糖.

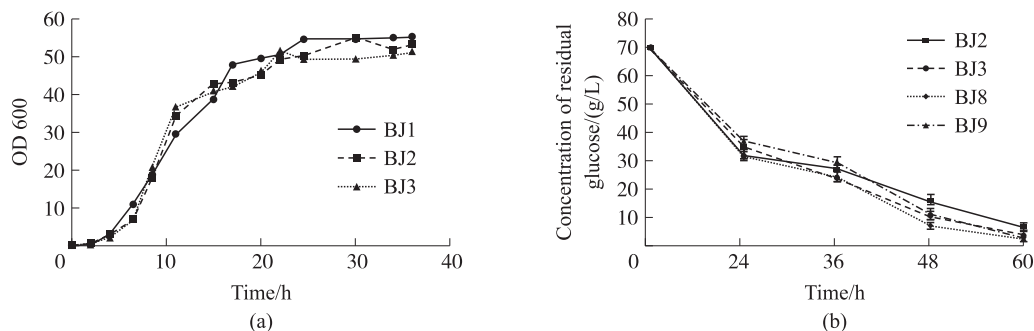


图 1 生长曲线和葡萄糖的消耗曲线

Fig. 1 Growth curve and the glucose consumption tendency

(a) BJ1、BJ2 和 BJ3 发酵培养过程中的生长曲线. 过夜培养的种子液转接到新鲜发酵培养基中,使初始 OD₆₀₀ 为 0.2,在 32 h 之前每隔 2 h 测一次 OD₆₀₀ 的吸光值,之后每隔 4 h 测一次 OD 值;(b) BJ2、BJ3、BJ8、BJ9 培养基中残糖量的测定,从 12 h 开始每隔 12 h 取样测一次葡萄糖的含量

(a) Growth curve for BJ1, BJ2 and BJ3 cells in MS medium at 30 °C. The overnight culture was diluted to an OD₆₀₀ of 0.2 in A medium, incubated and OD₆₀₀ was measured every 2 h (before 32 h) or 4 h (after 32 h); (b) The graph shows the consumption rate of glucose by *C. glutamicum* ATCC13032 BJ2/BJ3/BJ8/BJ9 through whole fermentation

2.2 谷氨酰胺合成酶的酶活检测

GS 的酶活力用南京建成生物技术公司生产的谷氨酰胺合成酶(GS)酶活测试盒检测. 如图 2(a) 所示,GS 的酶活力在 60 h 时达到最大值. BJ2 酶活力大约为对照组 BJ1 酶活力的 10 倍左右,BJ3 的酶活力大约为 BJ1 酶活力的 5 倍左右;重组菌 BJ2,BJ3 都是在 Ptac 作用下的,与同在 Pmal 作用下的 BJ4,BJ5 的酶活力相比,BJ2,BJ3 的 GS 酶活力远远高于 BJ4,BJ5. 结果表明,无论是连接 *Bacillus subtilis* 的 GS 还是 *C. glutamicum* 的 GS,Ptac 转录表达 GS 的效果都要比 Pmal 的效果好,可能因为在重组谷氨酸棒状杆菌的发酵过程中,含有 Pmal 的重组菌所用的碳源和诱导剂均为麦芽糖,麦芽糖作为碳源的效果不如葡萄糖好,麦芽糖作诱导剂的效果也远不如 IPTG 好;其次,比较在相同启动子作用下,不同来源的 GS 酶活力高低. BJ2 的酶活力大约为 BJ3 的 2~3 倍;BJ4 和 BJ5 相比,在发酵前期酶活力相差无异,60 h 之后,BJ4 的酶活上升,明显高于 BJ5. 结果表明,在相同启动子作用下,*Bacillus subtilis* 的 GS 酶活力更高,可能因为来源 *Bacillus subtilis* 的 GS 不会受到腺苷酰化的影响,即使 *C. glutamicum* 的 GS 为避免腺苷酰化的影响,将

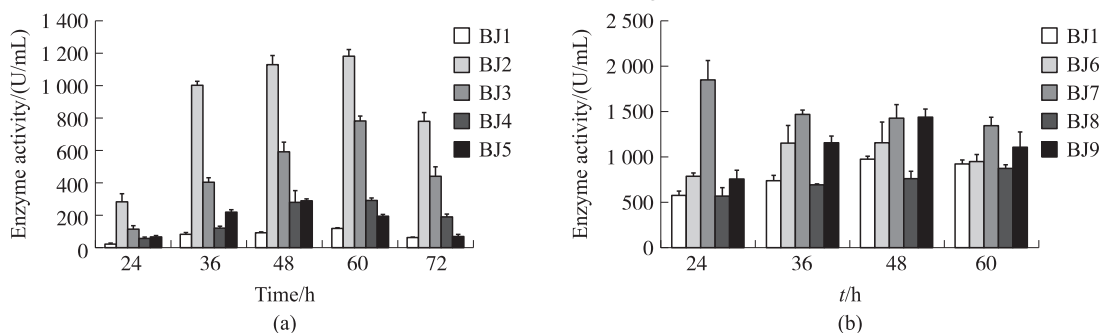


图 2 不同菌种的 GS 酶催化活性

Fig. 2 Catalyzes activity with different promoter and different GS

(a) 单启动子酶活. 新鲜活化的菌液接种到含有 20 mL 发酵培养基的 250 mL 的锥形瓶中,30 °C,220 r/min 震荡培养 60 h,pH 控制在 6.5,每 12 h 取样测一次酶活;(b) 为了研究 *vgb* 蛋白对 GS 酶活的影响,将新鲜活化的 BJ6~BJ9 菌株接种到含有 20 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,30 °C,220 r/min 震荡培养 60 h,pH 控制在 6.5,每隔 12 h 取样测一次酶活

(a) Cells were grown in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of MS medium at 30 °C for 60 h with shaking (220 r/min). The data measured every 12 h. pH was controlled at 6.5; (b) To understand the effect of *vgb*'s loci on glutamine synthetase activity, BJ6~BJ9 strains were grown in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL MS medium at 30 °C for 60 h with shaking (220 r/min). The data measured every 12 h, pH was controlled at 6.5

glnA Tyr405 突变成 Phe405,也没有将 GS 的来源换掉效果好. 因此我们将 *Bacillus subtilis* 的 GS 应用于谷氨酸棒状杆菌的表达系统中,对发酵生产 L-Gln 有重要的参考价值.

为了验证 *vgb* 基因是否在 L-Gln 的发酵生产中发挥作用,我们又构建了 4 个重组菌株,分别命名为 BJ6、BJ7、BJ8 和 BJ9(表 2). 由于 Pmal 的作用没有 Ptac 效果好,因此构建 BJ6、BJ7、BJ8、BJ9 时选用的启动子都是 Ptac. BJ6、BJ7 是单启动子设计,表达融合蛋白;BJ8、BJ9 是双启动子设计,分别表达 GS 和 VHb,其目的是检测 VHb 蛋白对 GS 酶活力和 L-Gln 产量的影响. 加入 *vgb* 基因后(图 2b),各个重组菌 GS 的酶活力没有显著差异,而且酶活反而下降,与对照组 BJ1 的酶活相似,说明 VHb 蛋白对 GS 的表达有负影响,导致其酶活下降,可能因为一个载体上同时表达两种蛋白,而且它们互相抑制从而导致酶活下降.

2.3 Western blot 检测重组蛋白的表达

为了更加精确地检测重组菌 BJ6~BJ9 中,目的蛋白 VHb 和 GS 的表达情况,我们在构建时于目的基因 *glnA^m*、*glnA^{BS}* 和 *vgb* 的羧基端加了 Flag-标签(表 1),用 Flag 抗体(1:1000)检测重组蛋白的表达水平以及稳定性. 如图 3 所示,GS 和 VHb 蛋白均能正常稳定表达,且没有降解,表明在重组菌 BJ6~BJ9 中,GS 酶活下降的原因是在同一个表达载体 pEKEX2 上,同时表达 2 个蛋白 VHb 和 GS,VHb 对 GS 的酶活有抑制作用.

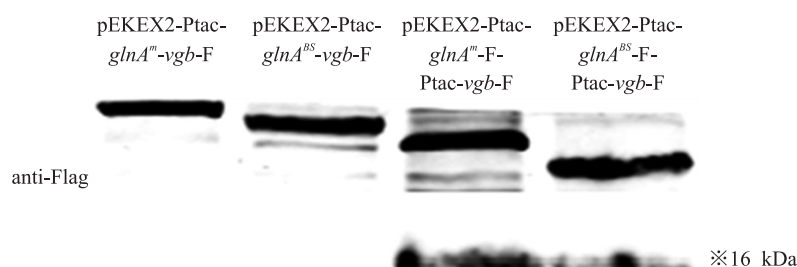


图 3 重组蛋白的表达检测

Fig. 3 The expression of recombinant protein

Flag 标签抗体检测 BJ6~BJ9 的蛋白提取液中融合蛋白表达情况:BJ6 表达 *C. glutamicum* 的 GS 酶和 VHb 的融合蛋白(69 kDa), BJ7 表达 *Bacillus subtilis* 的 GS 酶和 VHb 的融合蛋白(67 kDa), BJ8 分别表达 *C. glutamicum* 的 GS 酶(53 kDa)和 VHb 蛋白(16 kDa), BJ9 分别表达 *Bacillus subtilis* 的 GS 酶(51 kDa)和 VHb 蛋白(16 kDa)(※)

We used Flag antibody to examine fusion expression of the exogenous proteins, BJ6 for the expression of *C. glutamicum* GS and VHb fusion proteins(69 kDa), BJ7 for the expression of *Bacillus subtilis* GS and VHb fusion proteins(67 kDa), BJ8 for GS of *C. glutamicum* (53 kDa) and VHb(16 kDa), BJ9 for GS of *Bacillus subtilis* (51 kDa) and VHb protein(※)

2.4 结合 HPLC 和谷氨酰胺测试盒检测重组谷氨酸棒状杆菌发酵生产 L-Gln 的产量

所有重组菌处于同样的发酵条件,发酵培养条件在材料与方法中提及. 结合 HPLC 和谷氨酰胺测试盒,发酵生产 60 h 后,重组菌 BJ2 的 L-Gln 终产量最高,为 32.63 g/L(表 3),BJ3 为 25.7 g/L. BJ2 的产量大约为对照组 BJ1 的 3 倍,BJ1 的产量为 10.13 g/L. 重组菌 BJ6~BJ9 的 L-Gln 的终产量和 BJ1 基本相同. 上述结果表明,L-Gln 的产量和 GS 的酶活力成正比,且 *Bacillus subtilis* 来源的 GS 酶产量比 *C. glutamicum* 的 GS 突变体还要高. 为了比较麦芽糖启动子对 L-Gln 产量的影响,我们也检测了重组菌 BJ3 和 BJ4 的发酵情况. 实验结果表明,L-Gln 的产量没有显著提高,这表明麦芽糖启动子可能不适用于在谷氨酸棒状杆菌发酵生产 L-Gln,这与酶活数据也是吻合的.

表 3 谷氨酰胺测试盒检测各重组 *C. glutamicum* 中 L-Gln 的产量

Table 3 Production of L-Gln by recombinant *C. glutamicum*

g·L⁻¹

Strains and plasmids	L-Glutamine	Strains and plasmids	L-Glutamine
BJ1(pEKEX2)	10.13	BJ6(pEKEX2-Ptac- <i>glnA^m</i> - <i>vgb</i> -F)	8.99
BJ2(pEKEX2-Ptac- <i>glnA^{BS}</i>)	32.63	BJ7(pEKEX2-Ptac- <i>glnA^{BS}</i> - <i>vgb</i> -F)	15.41
BJ3(pEKEX2-Ptac- <i>glnA^m</i>)	25.77	BJ8(pEKEX2-Ptac- <i>glnA^m</i> -F-Ptac- <i>vgb</i> -F)	10.13
BJ4(pEKEX2-Pmal- <i>glnA^{BS}</i>)	9.57	BJ9(pEKEX2-Ptac- <i>glnA^{BS}</i> -F-Ptac- <i>vgb</i> -F)	12.77
BJ5(pEKEX2-Pmal- <i>glnA^m</i>)	9.89		

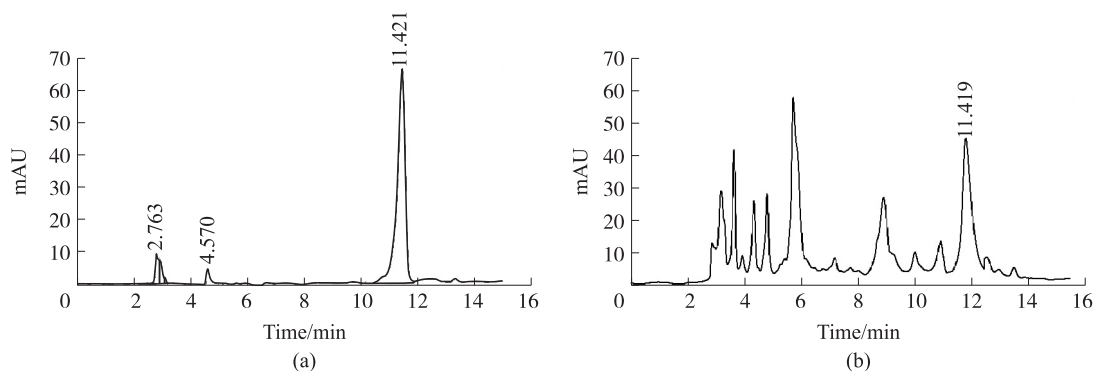


图 4 HPLC 检测 L-Gln 标品和部分样品的含量

Fig. 4 HPLC analysis of commercial glutamine

HPLC 检测系统为 Agilent 1260 Infinity; 色谱条件为色谱柱: Hypersil NH₂ 柱(4.6×150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-磷酸二氢钾缓冲液(50 mmol/L, pH 4.0); 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 215 nm. (a) L-Gln 标品出峰的时间为 11.421 min, L-Gln 标准品的浓度为 2 mmol/L. (b) HPLC 检测重组菌 BJ2 样品图, 发酵时间 46 h, 出峰时间为 11.419 min, 样品浓度为 2 mmol/L

The reactions catalyzed by *C. glutamicum* were monitored by HPLC according to a known protocol with modifications. Briefly, HPLC analysis was carried out using an Agilent 1260 Infinity system with the Hypersil NH₂ column(4.6×150 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-KH₂PO₄ (50 mmol/L, pH 4.0). Production of L-Gln was detected by UV absorbance at 215 nm. The retention of L-Gln was around 11.421 min, the concentration of L-Gln standard was 2 mmol/L. (b) The production of L-Gln of recombinant strain BJ2 for 46 h was monitored by HPLC and the retention of L-Gln of BJ2 was around 11.419 min, the concentration of L-Gln of BJ2 was 2 mmol/L.

3 讨论

本研究比较 Pmal 和 Ptac 中哪一个更适用于在谷氨酸棒状杆菌的表达系统中表达 GS. 应用 Pmal 表达 GS, 是之前文献中没有报道过的, 但是很遗憾 Pmal 并没有在转录表达 GS 的过程中发挥强启动子的作用, 可能因为含有 Pmal 的重组菌 BJ4、BJ5 的培养基中使用的碳源是麦芽糖. 因为葡萄糖效应, 会优先利用葡萄糖, 麦芽糖不被优先利用, 所以 BJ4、BJ5 的培养基碳源和诱导剂均为麦芽糖; 含 Ptac 的重组菌 BJ2、BJ3、BJ6~BJ9 用 IPTG 做诱导剂, 并且葡萄糖作为碳源. 麦芽糖和葡萄糖不同的是, 葡萄糖是速效碳源, 麦芽糖为碳源时, 菌体生长速度较葡萄糖为碳源时生长得更缓慢, 不利于菌体的生长和代谢产物的积累. 如果在含 Pmal 的重组菌的培养基中添加葡萄糖作碳源, Pmal 可能不能很好地诱导表达 GS, 因此本实验研究结果表明, Ptac 比 Pmal 能更好地在谷氨酸棒状杆菌中表达和增加 GS 的酶活力.

来源于 *Bacillus subtilis* 的 GS 酶活力高于 *C. glutamicum* 的 GS 突变体, 为今后进一步通过基因工程技术的发酵生产 L-Gln 做了很好的铺垫.

在发酵的前期阶段, 碳源含量过高, 会导致渗透压过大, 不利于菌的生长; 发酵后期, 碳源含量过高, 菌体会继续生长, 也不利于合成代谢产物; 所以本实验采取中间补糖的方案, 有利于发酵终产物的积累.

BJ6~BJ9 加入 *vgb* 基因后, GS 的酶活力反而下降, 可能因为在同一载体上, 同时表达 2 个蛋白, 2 个蛋白互相影响, 导致 GS 酶活下降. 为了能在重组菌中发挥 Vhb 的功能, 在今后的研究中, 可能将 *vgb* 基因通过基因敲入整合进 *C. glutamicum* ATCC13032 的基因组中, 对菌体的生长及 L-谷氨酰胺的发酵生产起到积极的促进作用.

[参考文献]

- [1] Li Y, Yang G, Huang X, et al. Recombinant Glutamine Synthetase (GS) from *C. glutamicum* existed as both hexamers & dedecamers and C-terminal His-tag enhanced inclusion bodies formation in *E. coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(3): 614-622.
- [2] Beckers G, Nolden L, Burkovski A. Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 11): 2 961-2 970.
- [3] Merrick M J, Edwards R A. Nitrogen control in bacteria[J]. Microbiol Rev, 1995, 59(4): 604-622.

- [4] Rehm N, Burkovski A. Engineering of nitrogen metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*; influence on amino acid pools and production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 89(2): 239–248.
- [5] Binder S, Siedler S, Marienhagen J, et al. Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(12): 6360–6369.
- [6] Behensky P, Stenzl V, Adamek F, et al. Conversion of glutamate to glutamine by permeabilized *Corynebacterium glutamicum*[J]. Folia Microbiol (Praha), 1999, 44(5): 487–490.
- [7] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome; features and impacts on biotechnological processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(2/3): 99–109.
- [8] 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(1/2/3): 5–25.
- [9] Rehm N, Burkovski A. Engineering of nitrogen metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*; influence on amino acid pools and production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(2): 239–248.
- [10] Harper C, Hayward D, Wiid I, et al. Regulation of nitrogen metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*; a comparison with mechanisms in *Corynebacterium glutamicum* and *Streptomyces coelicolor*[J]. IUBMB Life, 2008, 60(10): 643–650.
- [11] Silberbach M, Burkovski A. Application of global analysis techniques to *Corynebacterium glutamicum*; new insights into nitrogen regulation[J]. J Biotechnol, 2006, 126(1): 101–110.
- [12] Strosser J, Ludke A, Schaffer S, et al. Regulation of GlnK activity; modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Mol Microbiol, 2004, 54(1): 132–147.
- [13] Knoppova M, Phensaijai M, Vesely M, et al. Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*[J]. Curr Microbiol, 2007, 55(3): 234–239.
- [14] Lee J. Development and characterization of expression vectors for *Corynebacterium glutamicum*[J]. J Microbiol Biotechnol, 2014, 24(1): 70–79.
- [15] Okibe N, Suzuki N, Inui M, et al. Isolation, evaluation and use of two strong, carbon source-inducible promoters from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(2): 173–180.
- [16] Wang Q, Min C, Yan T, et al. Production of glutamine synthetase in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner and application to L-glutamine synthesis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(11): 2603–2610.
- [17] Park J H, Lee S Y. Fermentative production of branched chain amino acids; a focus on metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(3): 491–506.
- [18] Schmi R, Uhlemann E M, Nolden L, et al. Response to nitrogen starvation in *Corynebacterium glutamicum* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 187(1): 83–88.
- [19] Kusumoto I. Industrial production of L-glutamine[J]. J Nutr, 2001, 131(Suppl 9): 2552S–2555S.
- [20] Lee Y B, Jo J H, Kim M H, et al. Enhanced production of α -ketoglutarate by fed-batch culture in the metabolically engineered strains of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 118(4): 770–777.
- [21] Park J H, Lee S Y. Fermentative production of branched chain amino acids; a focus on metabolic engineering[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(3): 491–506.
- [22] An S J, Yim S S, Jeong K J. Development of a secretion system for the production of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using the Porin B signal peptide[J]. Protein Expr Purif, 2013, 89(2): 251–257.
- [23] Fan Y, Chen H, Qiao B, et al. c-Jun NH2-terminal kinase decreases ubiquitination and promotes stabilization of p21^{WAF1/CIP1} in K562 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 355: 263–268.

[责任编辑:黄敏]