全局调控因子 Lrp 的表达强化谷氨酸棒状杆菌发酵生产 L-缬氨酸

陈 诚[1,2]，李颜颜[2]，尹良鸿[2]，胡瑾瑜[2]，王小元[*1,2,3]

(1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心，江苏 无锡 214122)

摘要：作者研究发现全局调控因子 Lrp 的表达能促进谷氨酸棒状杆菌发酵生产 L-缬氨酸，但对菌体生长有一定影响。RT-PCR 分析发现：Lrp 的表达能提高 L-缬氨酸合成相关基因 *ilvA*、*ilvBN*、*ilvC*、*ilvD* 及转运相关基因 *brnFE* 的转录水平，这也许是 L-缬氨酸产量提高的原因。实验还发现：表达含有点突变(Arg39Trp)的 Lrp 可以进一步提高谷氨酸棒状杆菌 L-缬氨酸的产量，而且对菌体生长的影响也减小；这种效果在 *lrp-brnF* 间隔区域存在突变的 L-缬氨酸生产菌 VWB-1 中更加明显。在 VWB-1 中共表达 *lrp1* 和 *brnFE* 基因，5 L 罐发酵 L-缬氨酸产量达到 42.1 g/L，比对照提高了 48.9%。

关键词：Lrp；调控；谷氨酸棒状杆菌；L-缬氨酸

中图分类号：Q 933　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)09—0920—08

Expression of Global Regulator Lrp Facilitates L-Valine Production in *Corynebacterium glutamicum*

CHEN Cheng[1,2]，*LI Yanyan*[2]，*YIN Lianghong*[2]，*HU Jinyu*[2]，*WANG Xiaoyuan*[*1,2,3]

(1. State Key Laboratory of Food and Science Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Collaborative Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: L-valine is one of the branched chain amino acids widely used in food, feed, and drug industries. In this study, the global regulator Lrp was found to improve L-valine production in *C. glutamicum*, but slightly inhibit the growth. RT-PCR analysis showed that expression of lrp increased the transcriptional levels of genes related to L-valine biosynthesis (*ilvA*, *ilvBN*, *ilvC*, *ilvD*) and export (*brnFE*), which might be the reason for the improved L-valine production. A single amino acid substitution (Arg39Trp) in Lrp reduced the growth inhibition and led to higher L-valine production, especially in L-valine production strain *C. glutamicum* VWB-1 which contains mutations in the region between *lrp* and *brnF*. By co-expressing lrp1 and brnFE in VWB-1, L-valine production

收稿日期：2014-09-09

基金项目：国家自然科学基金项目(31370131)；江苏省“六大人才高峰”资助项目(2012-SWYY-008)。

* 通信作者：王小元(1956—)，男，山西垣曲人，博士，教授，博士研究生导师，主要从事工业微生物代谢工程优化和食源性病原微生物的致病机制方面的研究。E-mail：xwang@jiangnan.edu.cn

of fed-batch fermentation reached 42.1 g/L which was 48.9% increase.

Keyword: Lrp, regulation, *Corynebacterium glutamicum*, L-valine

支链氨基酸 L-缬氨酸(L-valine)在生命代谢中起重要作用,因此被广泛应用于食品、饲料、化妆品和药物等领域。谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)作为一种常见的氨基酸工业生产菌株,也被用于发酵生产 L-缬氨酸[1]。近年来随着谷氨酸棒状杆菌全基因组测序的完成[2],代谢工程已被用来改造优化谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸代谢合成和调控[3-5]。

全局调控蛋白 Lrp 广泛存在于多种原核微生物中[6]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)Lrp 能够调控 L-缬氨酸合成和转运的相关基因[7]。谷氨酸棒状杆菌 Lrp 可以结合在其编码基因 *lrp* 及其相邻的支链氨基酸转运蛋白复合体 BrnFE 的编码基因 *brnFE* 之间的间隔区域[8],促进 BrnFE 表达[9]。在谷氨酸棒状杆菌中过量表达 Lrp 和 BrnFE 可以提高支链氨基酸 L-异亮氨酸产量[10],但 Lrp 对谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸代谢合成及调控作用尚未见报道。

作者在谷氨酸棒杆菌野生型菌株 ATCC13869 和 L-缬氨酸高产菌株 VWB-1 中过量表达 Lrp,研究其对 L-缬氨酸产量的影响及其对 L-缬氨酸代谢合成和转运相关基因的调控作用。发现 VWB-1 中 Lrp 和 *lrp-brnFE* 基因间隔序列的突变可提高 L-缬氨酸产量,并通过在 VWB-1 中共同表达 *lrp* 和 *brnFE* 基因,提高了 L-缬氨酸发酵水平。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

本研究所用菌株和载体见表 1。大肠杆菌 *E. coli* JM109 使用 LB 培养基(酵母提取物 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L;固体培养基加入琼脂粉 18 g/L)在 37 ℃培养。谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* ATCC13869 使用 LBG 培养基(LB 培养基加入 5 g/L 葡萄糖)在 30 ℃培养。菌株 *C. glutamicum* VWB-1 为作者所在实验室筛选得到的 L-缬氨酸高产菌株,使用 LBGB 培养基(LBG 培养基加入 18.5 g/L 脑心浸液)在 30 ℃培养。*C. glutamicum* 电转恢复培养基使用 LBHIS 培养基(蛋白胨 5 g/L,酵母提取物 2.5 g/L,NaCl 5 g/L,D-山梨醇 91 g/L,脑心浸液 18.5 g/L;固体培养基加入琼脂粉 15 g/L)。必要时添加抗生素卡那霉素和氯霉素,质量浓度为 30 μg/mL。pJYW-3 是基于载体 pEC-XK-99E 构建的 *E. coli* 和 *C. glutamicum* 穿梭表达载体,pJYW-4 是含 *tac* 启动子的 pJYW-3[11]。

表 1 本研究所用菌株和载体

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株	描述	来源
E.coli JM109	野生型 *E. coli*	作者所在实验室保藏
ATCC13869	野生型 *C. glutamicum*	ATCC
VWB-1	高产 L-缬氨酸 *C. glutamicum* 菌株	作者所在实验室保藏
ATCC13869/pJYW-4	ATCC13869 带有 pJYW-4	本研究构建
ATCC13869/pJYW-4-*lrp*	ATCC13869 带有 pJYW-4-*lrp*	本研究构建
ATCC13869/pJYW-4-*lrp*1	ATCC13869 带有 pJYW-4-*lrp*1	本研究构建
VWB-1/pJYW-4	VWB-1 带有 pJYW-4	本研究构建
VWB-1/pJYW-4-*lrp*	VWB-1 带有 pJYW-4-*lrp*	本研究构建
VWB-1/pJYW-4-*lrp*1	VWB-1 带有 pJYW-4-*lrp*1	本研究构建
VWB-1/pJYW-4-*brnFE*	VWB-1 带有 pJYW-4-*brnFE*	本研究构建
VWB-1/pJYW-4-*lrp*1-*brnFE*	VWB-1 带有 pJYW-4-*lrp*1-*brnFE*	本研究构建
JM109/pJYW-4-*cat*	JM109 带有 pJYW-4-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-4-*lrp*-*cat*	JM109 带有 pJYW-4-*lrp*-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-4-*lrp*1-*cat*	JM109 带有 pJYW-4-*lrp*1-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-3-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-3-LF-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-LF-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-3-LF1-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-LF1-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-3-LF-*lrp*-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-LF-*lrp*-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-3-LF-*lrp*1-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-LF-*lrp*1-*cat*	本研究构建

续表 1

	描述	来源
JM109/pJYW-3-LF1-*lrp*-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-LF1-*lrp*-*cat*	本研究构建
JM109/pJYW-3-LF1-*lrp*1-*cat*	JM109 带有 pJYW-3-LF1-*lrp*1-*cat*	本研究构建
载体		
pJYW-4	*E.coli* 和 *C.glutamicum* 穿梭表达载体	[11]
pJYW-4-*lrp*	pJYW-4 连接 ATCC13869 来源 *lrp*	本研究构建
pJYW-4-*lrp*1	pJYW-4 连接 VWB-1 来源 *lrp*	本研究构建
pJYW-4-*brnFE*	pJYW-4 连接 *brnFE*	本研究构建
pJYW-4-*lrp*1-*brnFE*	pJYW-4-*lrp*1 连接 *brnFE*	本研究构建
pJYW-4-*cat*	pJYW-4 连接 *cat*	本研究构建
pJYW-4-*lrp*-*cat*	pJYW-4-*lrp*1 连接 *cat*	本研究构建
pJYW-4-*lrp*1-*cat*	pJYW-4-*lrp*1 连接 *cat*	本研究构建
pDXW-11	*E.coli* 和 *C.glutamicum* 穿梭启动子检测载体	[12]
pJYW-3	不含 tac 启动子的 pJYW-4	[11]
pJYW-3-*cat*	pJYW-3 连接 *cat*，启动子检测载体	本研究构建
pJYW-3-LF-*cat*	pJYW-3-*cat* 连接 ATCC13869 来源 LF	本研究构建
pJYW-3-LF1-*cat*	pJYW-3-*cat* 连接 VWB-1 来源 LF	本研究构建
pJYW-3-LF-*lrp*-*cat*	pJYW-3-LF-*cat* 连接 *lrp*	本研究构建
pJYW-3-LF-*lrp*1-*cat*	pJYW-3-LF-*cat* 连接 *lrp*1	本研究构建
pJYW-3-LF1-*lrp*-*cat*	pJYW-3-LF1-*cat* 连接 *lrp*	本研究构建
pJYW-3-LF1-*lrp*1-*cat*	pJYW-3-LF1-*cat* 连接 *lrp*1	本研究构建

1.2 各种新载体和基因重组菌的构建

本研究所用引物序列及相关信息见表 2。引物主要依据 *C. glutamicum* ATCC13032 基因组序列[2]设计，LF1 突变相关引物 LF1-F/LF1-R 根据 VWB-1 测序结果设计。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列(5'-3')	酶切位点
lrp-F	CGGGATCCAGAAGGAGATATACCATGAAGCTAGATTCCATTG	*Bam*HI
lrp-R	CGGAATTCTCACACCTGGGGGCGA	*Eco*RI

续表 2

引物	序列(5'-3')	酶切位点
brnFE-F	CGGGATCCAGAAGGAGATATACCGTGCAAAAAACGCAAGAGAT	*Bam*HI
brnFE-R	CGGAATTCTTAGAAAAGATTCACCAGTC	*Eco*RI
tac-*brnFE*-F	CGGAATTCACTCGACAACTGTTAATT	*Eco*RI
cat-F	CGGTATACTAACTAACTAAGAAAGGACATGAACGATGGAGA	*BstZ17* I
cat-R	GCTGCAGTTACGCCCCGCCCTGCCACT	*Pst* I
LF-F	TTAAGACTACAATCATCACACAATTGCCGGGTAGTTTTGTTGCCAGTTTGCGCACCTCAACTAGGCTATTGTGCAATATG	*Aat*II
LF-R	GATCCATATTGCACAATAGCCTAGTTGAGGTGCGCAAACTGGCAACAAAACTACCCGGCAATTGTGTGATGATTGTAGTC	*Bam*HI
LF1-F	TTAAGACTCCAATCATCACACAATTGCCGGGTAGTTTTGTTGCCAGTTTGCGCACCTCAACTAGGCTTATGTGCAATATG	*Aat*II
LF1-R	GATCCATATTGCACATAAGCCTAGTTGAGGTGCGCAAACTGGCAACAAAACTACCCGGCAATTGTGTGATGATTGGAGTC	*Bam*HI
16S rRNA-1	ACCTGGAGAAGAAGCACCG	
16S rRNA-2	TCAAGTTATGCCCGTATCG	
lrp-1	TCATTTTGGGCTACAGCGC	
lrp-2	GTACTTCATCATGCTGCGC	
brnFE-1	CTTATCGACGAAGCCTACG	
brnFE-2	AACTCTGCGATCGCCACTC	
ilvA-1	CTACACCATCGTGGAGAAGA	
ilvA-2	AACCCAGCGATAGACAGC	
ilvBN-1	CGGATGACAGGTGCAAAGG	
ilvBN-2	TTGTGGAGGAATAGAGCGG	
ilvC-1	CATCGAGCCAAACCTGAACGC	
ilvC-2	CATCAACGAACTGACGGCGAAC	
ilvD-1	GCATTGCCACCAAGAAGG	
ilvD-2	GCGAGGATGTGGAGGATG	
ilvE-1	GTCTGGCTGAGCGAAGATTACG	
ilvE-2	GGCATCCAACCATACGACCTG	

注：酶切位点序列加下划线表示。

以 *C. glutamicum* ATCC13869 和 VWB-1 的基因组为模板扩增 *lrp* 和 *brnFE* 基因。VWB-1 来源的 *lrp*（记为 *lrp*1）基因编码的 Lrp1 蛋白相比于

ATCC13869 来源的 Lrp 有一个点突变 Arg39Trp。以 *lrp-F* 和 *lrp-R* 为引物扩增基因 *lrp* 和 *lrp1*，*Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切纯化后连接 pJYW-4，得到 pJYW-4-*lrp* 和 pJYW-4-*lrp1*。以 *brnFE-F* 和 *brnFE-R* 为引物扩增基因 *brnFE*、*Bam*HI 和 *Eco*RI，酶切纯化后连接 pJYW-4，得到 pJYW-4-brnFE。以 pJYW-4-*brnFE* 为模板，以 *brnFE-tac-F* 和 *brnFE-R* 为引物扩增得到带有 *tac* 启动子和 *brnFE* 基因的片段，*Eco*RI 酶切纯化后连接 pJYW-4-lrp 和 pJYW-4-*lrp1*，得到 pJYW-4-*lrp*-*brnFE* 和 pJYW-4-*lrp1*-*brnFE*。

以载体 pDXW-11[12]为模板，*cat-F* 和 *cat-R* 为引物，扩增得到包含 3 个终止子和 SD 序列但不含启动子的氯霉素抗性基因 *cat*，*BstZ17* I 和 *Pst*I 酶切纯化后连接 pJYW-3，得到启动子检测载体 pJYW-3-*cat*。采用相同方法将 *cat* 基因连接到 pJYW-4、pJYW-4-*lrp* 和 pJYW-4-*lrp*1，分别得到 pJYW-4-*cat*、pJYW-4-*lrp*-*cat* 和 pJYW-4-*lrp*1-*cat*。

以 *C. glutamicum* ATCC13869 和 VWB-1 基因组为模板，LF-1 和 LF-2 为引物，扩增得到包含 *lrp-brnF* 间隔区域的片段，测序发现两个来源的 *lrp-brnF* 间隔区域序列存在差异。分别以 LF-F/LF-R 和 LF1-F/LF1-R 为引物，直接退火得到 ATCC13869 和 VWB-1 来源的 *lrp-brnF* 间隔片段，并引入 *Aat*II 和 *Bam*HI 粘性末端，记为 LF 和 LF1。为检测 LF 和 LF1 的启动子活性，将 LF 和 LF1 连接 pJYW-3-*cat*，得到 pJYW-3-LF-*cat* 和 pJYW-3-LF1-*cat*。为研究 *lrp* 和 *lrp*1 对 LF 和 LF1 活性的影响，将构建的 *lrp* 和 *lrp*1 片段交错连接 pJYW-3-LF-*cat* 和 pJYW-3-LF1-*cat*，得到 4 个载体 pJYW-3-LF-*lrp*-*cat*，pJYW-3-LF-*lrp*1-*cat*，pJYW-3-LF1-*lrp*-*cat* 和 pJYW-3-LF1-*lrp*1-*cat*。

构建的新载体均转入 *E.coli* JM109 进行保存和扩增，见图 1。大肠杆菌感受态的制备和转化参照文献[13]。谷氨酸棒状杆菌 ATCC13869 感受态的制备和电转参照文献 [14-15]；VWB-1 电转化方法为电击 2 次并在 46 ℃水浴 6 min。

1.3　谷氨酸棒杆菌培养基和发酵条件

1.3.1　种子培养基　30 g/L 葡萄糖，5 g/L $(NH_4)_2SO_4$，5 g/L 尿素，1 g/L KH_2PO_4，0.04 g/L $FeSO_4$，0.07 g/L $MnSO_4$，0.1 g/L $MgSO_4$，0.7 g/L 甲硫氨酸，0.2 mg/L 生物素，0.05 mg/L VB_1，60 g/L 大豆浸出汁。

1.3.2　发酵培养基　120 g/L 葡萄糖，40 g/L $(NH_4)_2SO_4$，1 g/L KH_2PO_4，0.04 g/L $FeSO_4$，0.07 g/L $MnSO_4$，0.1 g/L $MgSO_4$，0.7 g/L 甲硫氨酸，0.3 mg/L 生物素，0.05 mg/L VB_1，10 g/L 大豆浸出汁。

1.3.3　摇瓶发酵　将冻存于甘油管的菌种接种于 LBHIS 平板，30 ℃活化 48 h。将一环培养物接种于装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶，18 h 后转接至装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶，初始 OD_{562} 控制为 1.0，30 ℃、200 r/min 发酵 96 h。发酵过程另加 20 g/L $CaCO_3$ 控制 pH，30 mg/L 卡那霉素保持载体。

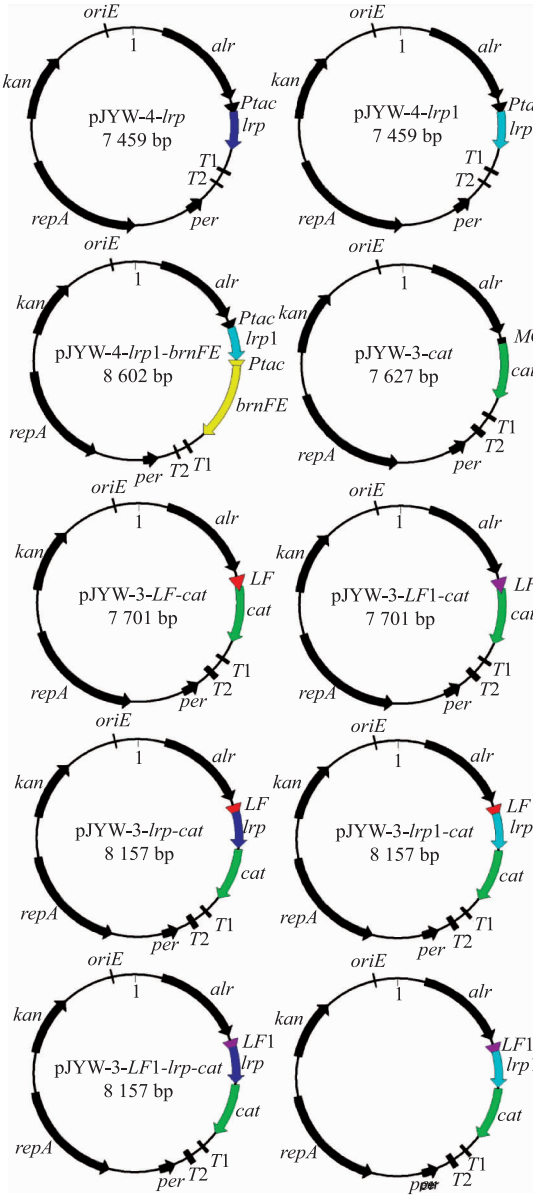


图 1　本研究所构建的载体

Fig. 1　Plasmids constructed in this study

1.3.4 5 L罐发酵 同样条件培养200 mL种子,接入装有2 L发酵培养基的5 L发酵罐(Biostat B, Germany)。发酵过程中pH通过补加NH_4OH自动控制为7.2,温度保持30 ℃,通过调节搅拌转速(0 h, 200 r/min;12~96 h,提高到600 r/min)和通气量(1.5 vvm)控制溶氧在30%,发酵液葡萄糖质量浓度低于60 g/L时流加葡萄糖溶液。每隔12小时取样,发酵96 h。

1.4 各种参数分析方法

1.4.1 发酵过程参数分析 L-缬氨酸和其他氨基酸含量通过高效液相色谱(AgilentTechnologies 1200 series,USA)测定[16];发酵液葡萄糖含量采用文献[17]方法测定;OD_{562}采用紫外分光光度计(UV-1800,日本岛津公司)测定;细胞干重采用公式

DCW (g/L) = 0.649 5×OD_{562}-2.792 5 计算[10]。

1.4.2 实时定量荧光PCR分析 相关基因转录水平差异通过实时定量荧光PCR分析仪(Applied Biosystems,San Mateo,CA,USA)定量检测。总RNA的提取、纯化、反转录和PCR采用文献[18]的方法,所用引物见表2。不同谷氨酸棒状杆菌菌体收集时间根据各自发酵过程中达到对数中后期的时间确定[10],选择16srRNA作为内参,数据处理采用Nolden方法[19]。

1.4.3 氯霉素抗性基因*cat*活性分析 96孔板测定氯霉素的最小抑菌浓度(MIC)测定参照Pendlenton方法[20]。在较低氯霉素浓度时为获得较精确的结果,浓度采用等差梯度稀释代替等比梯度稀释。氯霉素抗性基因*cat*编码的氯霉素乙酰转移酶(Cat)活性采用Shaw方法[21]测定,菌体收集方法改为直接超声破碎,然后4 ℃、12 000 r/min离心10 min(Allegra C-15R,Beckman Coulter,USA),1单位Cat酶活(U)定义为1 μmol/min。

2 结果与讨论

2.1 Lrp的表达对谷氨酸棒状杆菌生长和发酵生产L-缬氨酸的影响

为了研究Lrp对谷氨酸棒杆菌中L-缬氨酸代谢合成和转运的调控作用,载体pJYW-4、pJYW-4-*lrp*和pJYW-4-*lrp*1和pJYW-4-*brnFE*被构建并分别转入野生型菌株ATCC13869和L-缬氨酸高产菌株VWB-1。摇瓶发酵结果见图2。在ATCC13869中,对照菌株ATCC13869/pJYW-4几乎不产L-缬氨酸(0.2 g/L),而L-缬氨酸在ATCC13869/pJYW-4-*lrp*和ATCC13869/pJYW-4-*lrp*1中的产量则分别提高了16.0和17.5倍(3.2、3.5 g/L)。VWB-1作为筛选得到的L-缬氨酸高产菌株,VWB-1/pJYW-4中L-缬氨酸产量为28.1 g/L,而在VWB-1/pJYW-4-*lrp*和VWB-1/pJYW-4-*lrp*1L-缬氨酸则分别提高了5.3%和22.0%,达到29.6 g/L和34.3 g/L,见图2。这些数据表明Lrp的表达能明显提高谷氨酸棒状杆菌中L-缬氨酸产量,且Lrp1对产量提升更多。

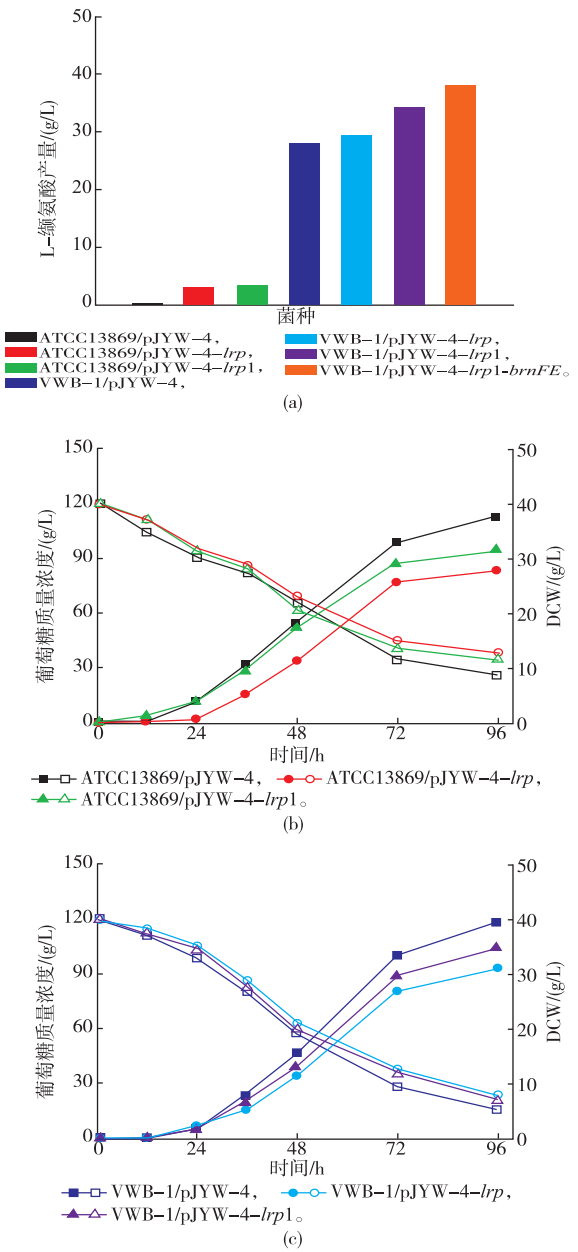


图2 谷氨酸棒状杆菌ATCC13869和VWB-1摇瓶发酵

Fig. 2 Flask fermentation of *C. glutamicum* ATCC13869 and VWB-1

2.2　Lrp 的表达对谷氨酸棒状杆菌 L-缬氨酸合成和转运相关基因的转录水平的影响

为了研究 Lrp 对谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸代谢合成和转运的影响，对各种谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸合成和转运相关基因 *ilvA*、*ilvBN*、*ilvC*、*ilvD*、*ilvE*、*brnFE* 和 *lrp* 进行了实时定量荧光 PCR 分析。如图 3 所示，在 ATCC13869 中表达 Lrp 和 Lrp1 时，*ilvA*、*ilvBN*、*ilvC*、*ilvD*、*lrp* 和 *brnFE* 转录水平上调，而 *ilvE* 略微下调，Lrp 和 Lrp1 影响程度差别不大；而在 VWB-1 中表达 Lrp 和 Lrp1 时，大多数基因转录水平变化趋势和在 ATCC13869 中一致。这表明 Lrp 能提高谷氨酸棒状杆菌 L-缬氨酸合成和转运相关基因的转录水平，这可能就是 L-缬氨酸的产量提升的主要原因。值得注意的是，在 VWB-1 中 Lrp 能使 *lrp* 自身转录显著上调（17.0 倍），而突变 Lrp1 仅仅使 *lrp* 自身转录略有上调（2.9 倍）；而在 ATCC13869 中并没有这种差异现象。这表明 Lrp 在谷氨酸棒状杆菌中还能提高自身编码基因 *lrp* 转录水平，而突变 Lrp1 在 VWB-1 中减弱了对自身编码基因 *lrp*1 的调控作用。为了揭示这种差异的来源，将来自于谷氨酸棒状杆菌 ATCC13869 和 VWB-1 的 Lrp 以及 *lrp-brnFE* 间隔区域进行了测序，发现 Lrp 和 Lrp1 存在一个点突变 Arg39Trp，而 *lrp-brnFE* 间隔区域序列也存在突变，见图 4。在谷氨酸棒状杆菌中，Lrp 可以结合在间隔区域（加粗标注位置），促进 BrnFE 表达[8]。在大肠杆菌中，Lrp（与谷氨酸棒状杆菌 Lrp 同源性仅 36%）N 端为活性区域，C 端区域与 DNA 结合。可以调控的基因包括 *lrp* 自身的转录[7]。Lrp1 的突变靠近 C 端，*lrp-brnFE* 间隔区域在靠近 *lrp* 端 Lrp 结合位点存在点突变，都可能影响与 Lrp 蛋白的结合及调控。

推测 *lrp* 在 VWB-1 中自身转录水平显著提高与 Lrp 和 LF 的相互作用有关。Lrp1 的突变抑制与近 *lrp* 端 DNA 结合，从而抑制 *lrp* 转录。而 LF1 的突变促进 Lrp 蛋白与 DNA 的结合，从而促进 *lrp* 和 *brnFE* 的转录；但没有发现这两个突变对 *brnFE* 的转录的影响。因此在 VWB-1 中表达 Lrp 时，正常 Lrp 蛋白和突变 LF1 共同作用下，*lrp* 转录水平显著提高。而在 VWB-1 中表达 Lrp1 时，Lrp1 和 LF1 共同作用使 *lrp*1 的转录水平提高幅度有限；结合发酵结果分析，Lrp1 和 LF1 共同作用在增加 L-缬氨酸产量的同时弱化了生长抑制。

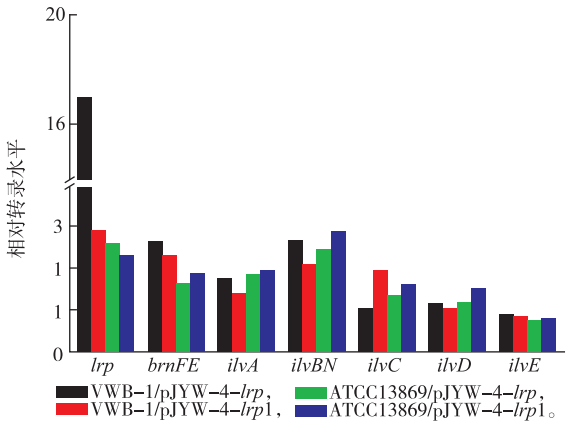


图 3　谷氨酸棒状杆菌中 L-缬氨酸合成和转录相关基因的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 3　RT-PCR analysis of genes involved in L-valine synthesis and gene transcription of *Corynebacterium glutamicum*

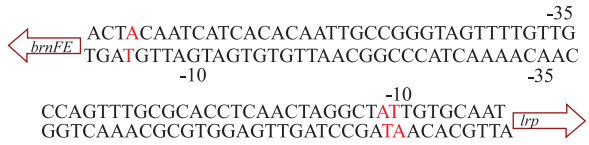


图 4　Lrp 及 lrp-brnFE 间隔区域突变位点分析

Fig. 4　Mutation analysis of Lrp and the interval sequence between *lrp-brnFE*

2.3　谷氨酸棒状杆菌 Lrp1 编码基因及其上游序列 LF1 的突变对 Lrp 自身转录的影响

为验证以上关于 Lrp 和 LF 相互作用的推测，作者构建一系列带有 *lrp-brnF* 间隔序列 LF 和 LF1 的启动子检测载体。氯霉素乙酰转移酶 Cat 被选作报告基因。这些载体被转入 *E.coli* JM109，并采用 96 孔板法测定氯霉素的最小抑菌浓度 MIC（图 5a）。带有 *tac* 启动子的 JM109/pJYW-4-*cat*、JM109/pJYW-4-*lrp*-*cat* 和 JM109/pJYW-4-*lrp*1-*cat* 的氯霉素 MIC 分别为 60、30、30 mg/L。在 cat 之前串联 *lrp* 或 *lrp*1 表达都引起 Cat 表达量下降，且 Lrp 和 Lrp1 影响效果相同，排除 Lrp1 的突变对 pJYW-4 自身 tac 启动子的影响。对照 JM109/pJYW-4 和 JM109/pJYW-3-*cat* 氯霉素 MIC 仅为 0.5 mg/L；而 JM109/pJYW-3-LF-cat 和 JM109/pJYW-3-LF1-*cat* 氯霉素 MIC 分别提高到 8 mg/L 和 10 mg/L，表明在 *cat* 之前连接的 LF 和 LF1 具有微弱的启动子活性。

为模拟谷氨酸棒状杆菌基因组中 LF 与 *lrp* 的位置组合，在 LF（LF1）与 *cat* 之间连接 *lrp*（*lrp*1）。得

到的 JM109/pJYW-3-LF-lrp-cat 和 JM109/pJYW-3-LF1-*lrp-cat* 氯霉素 MIC 分别提升到 12 mg/L 和 18 mg/L，而 JM109/pJYW-3-LF-*lrp*1-*cat* 和 JM109/pJYW-3-LF1-*lrp*1-*cat* MIC 分别下降到 6 mg/L 和 8 mg/L。这表明 LF 和 LF1 即使受到调控也不具备较强的启动子活性。正常 Lrp 的表达能促进 LF 和 LF1 后 Cat 的表达从而提高 MIC，突变 Lrp1 反而起抑制作用。与 LF 相比，在受到 Lrp 或 Lrp1 调控时 LF1 更能促进 Cat 的表达。

含有各种 pJYW-3 系列载体的 *E.coli* JM109 菌的 Cat 酶活测定结果(图 5b)与 MIC 测定结果基本吻合。JM109/pJYW-3-*cat* 的 Cat 酶活很低，JM109/pJYW-3-LF-*cat* 和 JM109/pJYW-3-LF1-*cat* 有较低的酶活。LF 与 *lrp* 串联后，LF1 使酶活上升而 *lrp*1 使酶活下降。JM109/pJYW-3-LF1-*lrp-cat* 酶活最高。

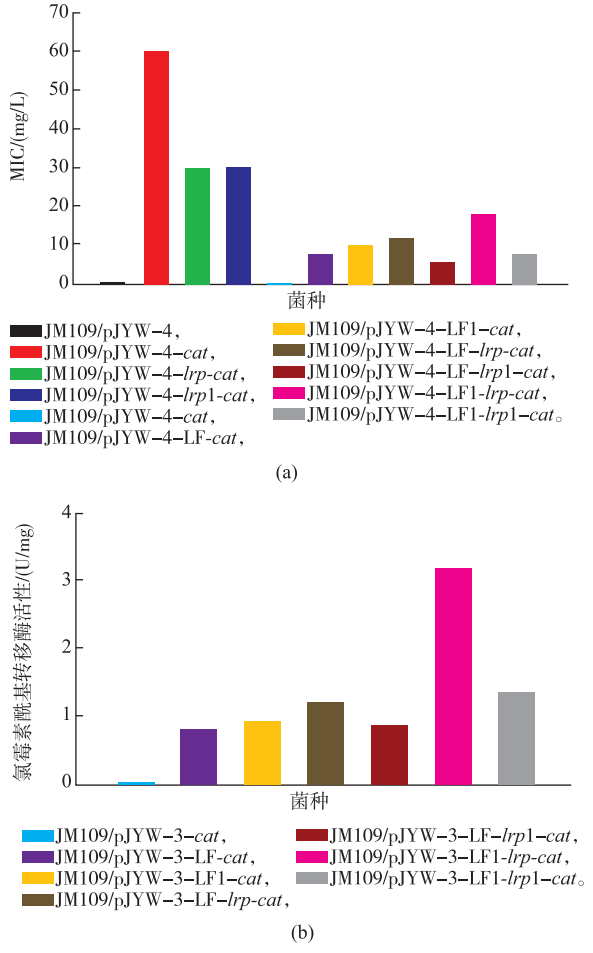


图 5　大肠杆菌 JM109 氯霉素最小抑菌浓度和 Cat 酶活

Fig. 5　MIC of chloramphenicol and activity of Cat in *E. coli* JM109

2.4　共同表达 *lrp1-brnFE* 对谷氨酸棒状杆菌 VWB-1 发酵生产 L-缬氨酸的影响

为了进一步促进 VWB-1 发酵生产 L-缬氨酸，将转运蛋白 BrnFE 与 Lrp1 共同表达，构建了重组菌 VWB-1/pJYW-4-*lrp*1-*brnFE*。摇瓶发酵产量较对照菌 VWB-1/pJYW-4 提高了 35.6%，达到 38.1g/L。这表明共同表达 *lrp*1 和 *brnFE* 可以提高谷氨酸棒状杆菌 VWB-1 L-缬氨酸产量。进一步对 VWB-1/pJYW-4-*lrp*1-*brnFE* 进行 5 L 罐发酵，见图 6。发酵 96 h，L-缬氨酸产量提高了 48.9%，达到 42.1 g/L，产率 0.439 g/(L·h)，比产量 0.905 g/(L·g 干细胞)，糖酸转化率 0.243 g/g 葡萄糖。发酵终了时葡萄糖质量浓度已经很低，但菌体量和 L-缬氨酸质量浓度还有上升趋势。再补加葡萄糖并延长发酵时间 L-缬氨酸产量可能还会提高，但发酵周期过长对产率有不利影响。通过培养基优化、发酵策略优化或者一些代谢改造减弱或消除 Lrp1 的生长抑制，产量可能会进一步提高。

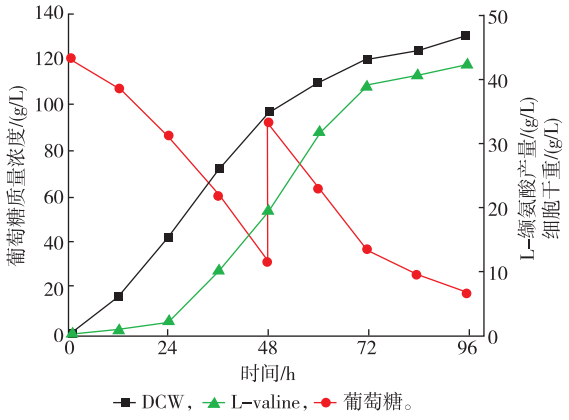


图 6　VWB-1/pJYW-4-*lrp*1-*brnFE* 5 L 罐发酵

Fig. 6　Fed-batch fermentation of VWB-1/pJYW-4-*lrp*1-*brnFE*

3　结　语

研究发现全局调控因子 Lrp 能提高谷氨酸棒状杆菌 L-缬氨酸合成及转运相关的基因转录水平，从而提升发酵 L-缬氨酸产量，但对菌体生长有抑制作用。VWB-1 中 Lrp1 和 LF1 突变共同作用影响Lrp1 与 *lrp-brnF* 间隔 DNA 结合，一方面促进 L-缬氨酸相关基因表达，另一方面弱化生长抑制，因此产量提升效果最显著。在 VWB-1 中共同表达 Lrp1 和 BrnFE 可进一步提高其 L-缬氨酸产量。

参考文献:

[1] Park J H,Sang Y L. Fermentative production of branched chain amino acids:a focus on metabolic engineering[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2009,85:491-506.

[2] Kalinowski J,Bathe B,Bartels D,et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins[J]. **J Biotechnol**,2003,104:5-25.

[3] Radmacher E,Vaitsikova A,Burger U ,et al. Linking central metabolism with increased pathway flux:L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Appl Environ Microbiol**,2002,68:2246-2250.

[4] Leyval D,Delaunay S,Goergen J L,et al. Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine producing strain of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **J Biotechnol**,2003,104:241-252.

[5] 王小元. 谷氨酸棒状杆菌生产缬氨酸的代谢工程研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(3):225-231.
WANG Xiaoyuan. Metabolic engineering in *C. glutamicum* to increase L-valineproduction[J]. **J Food Sci Biotech**,2012,31(3):225-231.(in Chinese)

[6] Lintner R E,Mishra P K,Srivastava P,et al. Limited functional conservation of a global regulator among related bacterial genera:Lrp in *Escherichia*,*Proteus* and *Vibrio*[J]. **BMC Microbiol**,2008,8:60.

[7] Joseph M C,Rowena G M. The leucine-responsive regulatory protein,a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*[J]. **Microbiol Reviews**,1994,58:466-490.

[8] Lange C,Mustafi N,Frunzke J,et al. Lrp of *Corynebacterium glutamicum* controls expression of the brnFE operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids[J]. **J Biotechnol**,2012,158:231-241.

[9] Kennerknecht N,Sahm H,Yen M ,et al. Export of L-Isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*:a two-gene-encoded member of a new translocator family[J]. **J Bacteriol**,2002,184:3947-3956.

[10] Yin L,Shi F,Hu X,et al. Increasing L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum* by overexpressing global regulatorLrp and two-component export system BrnFE[J]. **J Appl Microbiol**,2013,114:1369-1377.

[11] Hu J,Li Y,Zhang H,et al. Construction of a novel expression system for use in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Plasmid**,2014,75:18-26.

[12] Xu D,Tan Y,Li Y,et al. Construction of a novel promoter-probe vector and its application for screening strong promoter for *Brevibacterium flavum* metabolic engineering[J]. **World J Microbiol Biotechnol**,2011,27:961-968.

[13] Sambrook J,Russell D W. Molecular cloning:a laboratory manual[M]. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1996.

[14] 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**,1999,5:541-545.

[15] Xu D,Tan Y,Huan X,et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*,an industrial amino acid producer[J]. **J Microbiol Methods**,2010,80:86-92.

[16] Koros A,Varga Z S,Molnar P. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their ophthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography[J]. **J Chromatogr A**,2008,1203:146-152.

[17] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. **Anal Chem**,1959,31:426-428.

[18] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. **Methods**,2001,25:402-408.

[19] Nolden L,Farwick M,Burkovski,et al. Glutamine synthetases of *Corynebacterium glutamicum*:transcriptional control and regulation of activity[J]. **FEMS Microbiol Lett**,2001,201:91-98.

[20] Pendleton S J,Story R,O'Bryan C A,et al. Brief communication:a membrane filtration method for determining minimum inhibitory concentrations of essential oils[J]. **Agric Food Anal Bacteriol**,2012,2(2):88-93.

[21] Shaw W V. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria [J]. **Methods Enzymol**,1975,43:737-755.