

# 钝齿棒杆菌 N-乙酰鸟氨酸转氨酶的克隆表达分析及其重组菌的精氨酸发酵

徐美娟<sup>1</sup>, 张显<sup>1</sup>, 饶志明<sup>1</sup>, 杨娟<sup>1</sup>, 窦文芳<sup>2</sup>, 金坚<sup>2</sup>, 许正宏<sup>2</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学医药学院, 无锡 214122

**摘要:** N-乙酰鸟氨酸转氨酶 (EC 2.6.1.11, ACOAT) 是钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* 精氨酸合成途径中的第 4 个酶, 催化底物 N-乙酰谷氨酸半醛生成产物 N-乙酰鸟氨酸。为研究 N-乙酰鸟氨酸转氨酶在钝齿棒杆菌中精氨酸合成中的作用, 考察其酶学性质, 对培养基成分和发酵过程工艺条件的优化提高精氨酸产量提供依据。从精氨酸高产菌株钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 染色体扩增获得 ACOAT 编码基因 *argD*, 全长 1 176 bp, 编码 390 个氨基酸, 在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 及 *C. crenatum* SYPA 中成功表达。采用 Ni 柱亲和层析纯化后获得的重组蛋白比酶活达 108.2 U/g, 对其部分酶学性质进行初步研究。构建重组钝齿棒杆菌 *C. crenatum* SYPA (pJCTac-CcargD), 加强精氨酸合成途径 ACOAT 蛋白表达量, 对重组菌产精氨酸进行初步发酵分析。多次发酵结果表明重组钝齿棒杆菌与出发菌株相比胞内 ACOAT 酶活得以增强; 重组菌 *CCDI* 精氨酸平均产量为 39.7 g/L, 产酸提高 14.7%。结果还表明在重组菌发酵精氨酸的同时不仅 ACOAT 得到了加强表达, 同时还提高了重组菌在发酵过程中菌体自身的氧利用率。

**关键词:** 钝齿棒杆菌, L-精氨酸, 乙酰鸟氨酸转氨酶, 酶学性质, 发酵

## Cloning, expression and characterization of N-Acetylornithine aminotransferase from *Corynebacterium crenatum* and its effects on L-arginine fermentation

Meijuan Xu<sup>1</sup>, Xian Zhang<sup>1</sup>, Zhiming Rao<sup>1</sup>, Juan Yang<sup>1</sup>, Wenfang Dou<sup>2</sup>, Jian Jin<sup>2</sup>, and Zhenghong Xu<sup>2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Received:** December 14, 2010; **Accepted:** March 29, 2011

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA02Z207), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707804), Program for New Century Excellent Talents in University (Nos. NCET-07-0380, NCET-10-0459) National Natural Science Foundation of China (No. 30970056), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP31001).

**Corresponding author:** Zhiming Rao. Tel/Fax: +86-510-85910886; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghongxu@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA02Z207), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707804), 教育部新世纪优秀人才计划 (Nos. NCET-07-0380, NCET-10-0459), 国家自然科学基金 (No. 30970056), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP31001) 资助。

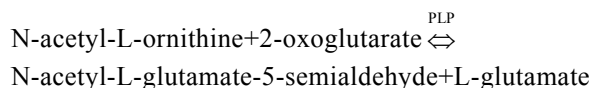
2 School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** N-Acetylornithine aminotransferase (EC 2.6.1.11, ACOAT) catalyzes the conversion of N-acetylglutamic semialdehyde to N-acetylornithine, the fourth step involved in the L-arginine biosynthetic pathways. We studied the enzyme properties to set up reliable theoretical basis for the arginine fermentation optimization. ACOAT encoding gene *argD* was cloned from an industrial L-arginine producer *Corynebacterium crenatum* SYPA 5-5. Analysis of *argD* sequences revealed that only one ORF existed, which coded a peptide of 390 amino acids with a calculated molecular weight of 41.0 kDa. The *argD* gene from *C. crenatum* SYPA 5-5 was expressed both in *Escherichia coli* BL21 and *C. crenatum* SYPA. Then ACOAT was purified by Ni-NTA affinity chromatography and its specific enzyme activity was 108.2 U/g. Subsequently, the expression plasmid pJCTac-CcargD was transformed into *C. crenatum* SYPA and the specific activity of ACOAT was improved evidently in the recombinant *C. crenatum* CCD. Further fermentative character of CCD1 was also analyzed. The results showed that the L-arginine producing ability of the recombinant strain was 39.7 g/L improved by 14.7%.

**Keywords:** *Corynebacterium crenatum*, L-arginine, N-Acetylornithine aminotransferase, enzymatic properties, fermentation

L-精氨酸 (L-arginine, 简称 L-Arg) 是一种含胍基的碱性氨基酸, 是人体和动物体内的半必需氨基酸, 也是生物体尿素循环的一种重要中间代谢物, 在医药和食品工业中用途广泛, 具有独特的生理和药理作用; L-精氨酸还是配制营养或特殊治疗用途药物的重要原料<sup>[1]</sup>, 发酵法生产精氨酸的研发是目前国内外研究的热点<sup>[1-2]</sup>。细菌中从 L-谷氨酸合成精氨酸有 3 条途径: 线性途径、循环途径及新发现的利用氨甲酰基转移酶进行精氨酸生物合成的新途径<sup>[3-5]</sup>, 如图 1 所示。

钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum*、谷氨酸棒杆菌、嗜热链球菌、假单胞菌等利用经济循环途径合成精氨酸, 乙酰鸟氨酸转氨酶 (N-Acetylornithine aminotransferase, EC 2.6.1.11) (ACOAT) 在合成 L-精氨酸循环途径中催化第 4 个酶促反应, 即催化底物 N-乙酰谷氨酸半醛合成 N-乙酰鸟氨酸, 需要 5-磷酸吡哆醛作为辅酶。反应方程式如下:



随着原料氨基酸的需求量日益增长, 用传统诱变育种手段提高 L-精氨酸产量已不能满足日益增长的需要, 开始利用 DNA 重组技术及代谢工程手段来调控 L-精氨酸相关代谢途径, 以达到提高产量的目

的。*C. crenatum* SYPA 5-5 是本实验室筛选并经过多步传统诱变得到的菌株, 具有产精氨酸能力高、无芽孢的革兰氏阳性高产 L-精氨酸突变菌株<sup>[6-7]</sup>。本课题组对 *C. crenatum* 的谷氨酸合成精氨酸的代谢途径相关酶进行了功能分析及其酶学性质的研究, 为进一步对精氨酸合成的发酵过程优化提供理论指导意义, 在此基础上进行加强表达, 并对系列重组菌进行发酵分析。本研究克隆了来自于高产精氨酸菌株 *C. crenatum* SYPA 5-5 中的乙酰鸟氨酸转氨酶 (ACOAT) 编码基因 *argD*, 首先在大肠杆菌中高效表达, 利用镍柱亲和层析对表达有活性的重组 ACOAT 进行纯化, 对酶学性质进行初步研究; 并构建了重组钝齿棒杆菌/pJCTac-CcargD (CCD), 在 *C. crenatum* 中加强转氨酶的表达, 在重组钝齿棒杆菌 CCD 进行酶活分析的基础上进一步对其发酵产精氨酸进行分析。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株与质粒

实验所用菌株及质粒见表 1。

### 1.2 培养条件及培养基

大肠杆菌: LB 培养基, 培养温度 37 °C, 旋转式摇床转速 160 r/min, 氨苄青霉素浓度为 100 μg/mL, 卡那霉素浓度为 50 μg/mL 筛选转化子, IPTG 诱导终浓度为 0.5~1 mmol/L。

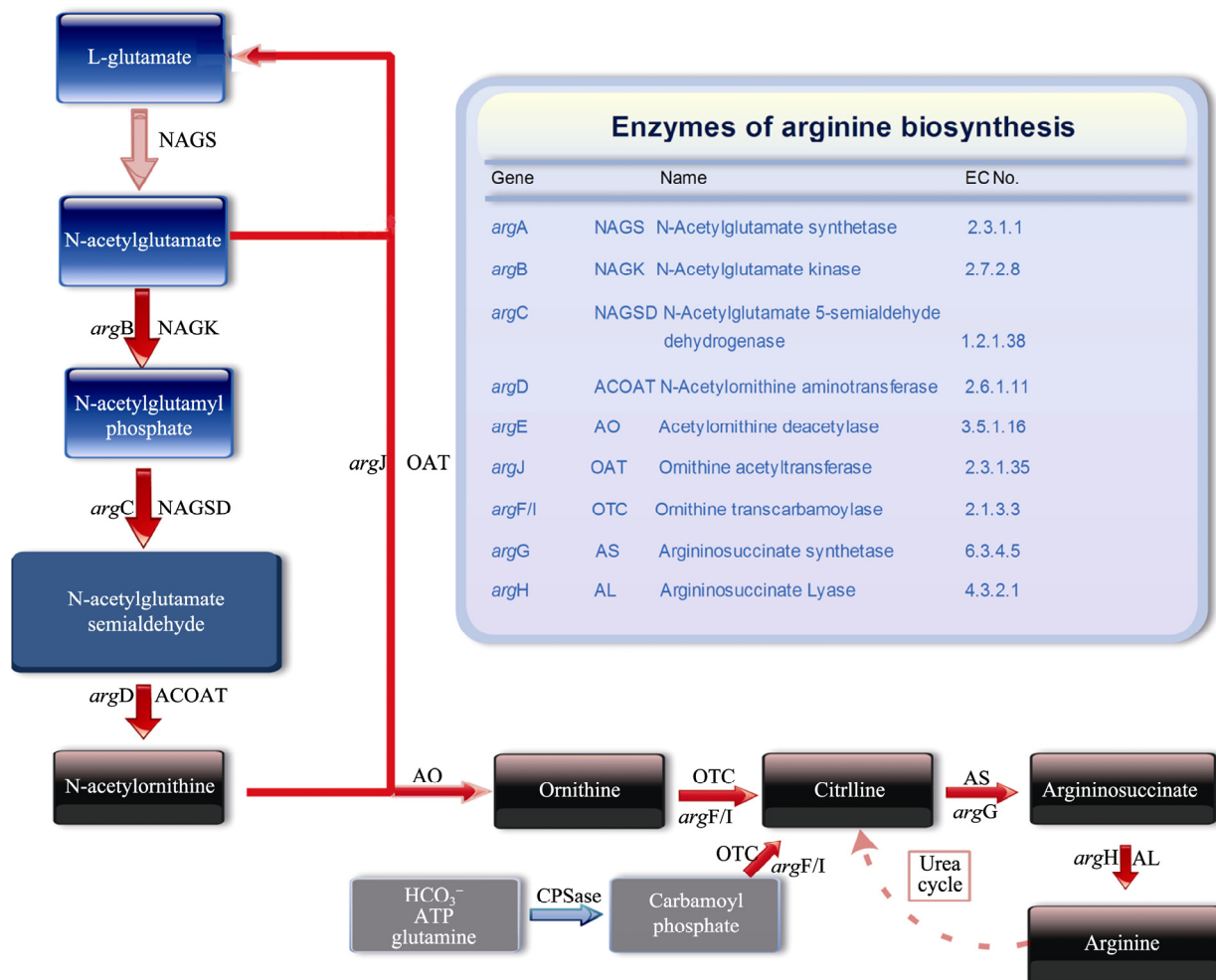


图 1 细菌 L-精氨酸生物合成途径

Fig. 1 The arginine biosynthesis pathway in bacteria.

表 1 本实验中所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains, plasmids, or primers	Characteristics	Source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB <sup>+</sup> Δ(lac-proAB) e14- [F <sup>+</sup> traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Promega
<i>Corynebacterium crenatum</i> SYPA5-5	L-arginine producer, his <sup>-</sup> , SG <sup>f</sup> , D-arg <sup>f</sup> , H-arg <sup>f</sup>	Our laboratory
<b>Plasmids</b>		
pMD18-T	<i>E. coli</i> clone plasmid Amp <sup>r</sup> , Col E origin	TaKaRa
T- <i>CcargD</i>	A derivative of pMD18-T, Amp <sup>r</sup> , harboring <i>argD</i> gene	This study
pET-28a	<i>E. coli</i> expression vector, Km <sup>r</sup>	Novagen
pET-28a- <i>CcargD</i>	A derivative of pET-28a, harboring <i>argD</i> gene	This study
pJC- <i>tac</i>	A derivative of pJC1, harboring <i>tac</i> promoter	Our laboratory <sup>[8]</sup>
pJC <i>tac</i> - <i>CcargD</i>	A derivative of pJC- <i>tac</i> , harboring <i>argD</i> gene	This study

Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-resistant phenotype; Km<sup>r</sup>: kanamycin-resistant phenotype.

钝齿棒杆菌: LBG 培养基 (LB+0.5%葡萄糖), 培养温度 30 °C, 往复式摇床转速 160 r/min, 发酵 96 h, 转化子选用卡那霉素浓度为 30 µg/mL 筛选。

斜面培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, NaCl 10。pH 7.0、115 °C 灭菌 15 min。

摇瓶种子培养基 (g/L): 葡萄糖 30, 玉米浆 20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 尿素 1.5。pH 7.0~7.2、121 °C 灭菌 20 min, 装液量 30 mL/250 mL。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 150 (分消), 玉米浆 40, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.02, 生物素 8×10<sup>-5</sup>, L-组氨酸 5×10<sup>-4</sup>, CaCO<sub>3</sub> 30。pH 7.0~7.2、121 °C 灭菌 10 min, 装液量 25 mL/250 mL<sup>[9]</sup>。

### 1.3 主要试剂及仪器

质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; 工具酶、IPTG 购自 TaKaRa 公司; 咪唑和抗生素购自上海 Sangon 公司; L-精氨酸琥珀酸购自 Sigma 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 (American Promega Corporation)、广范围蛋白质分子量标准购自 Fermentas 公司; PCR 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成; 其他试剂均为国产试剂纯。基因扩增仪 (BioRad 公司), 电击仪 (Eppendorf), BIOTECH-5BG 5 L 发酵罐 (上海保兴)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 *argD* 基因的克隆

由于 *C. crenatum* 的遗传背景尚不清楚, 其与谷氨酸棒杆菌同源性高, 因此根据 NCBI 中谷氨酸棒

杆菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 的全基因组核苷酸序列中 1 176 bp *argD* 基因序列 (GenBank Accession No. BA000036.3), 设计乙酰鸟氨酸转氨酶编码基因的引物如表 2 所示。

提取 *C. crenatum* SYPA 5-5 染色体为模板, PCR 扩增条件为: 94 °C, 5 min 预变性; 94 °C 50 s, 58 °C 1 min 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。所得片段胶回收后与克隆载体 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* JM109, 挑取阳性转化子。提取质粒酶切鉴定, 并将重组质粒命名为 T-*CcargD*, 测序。

#### 1.4.2 重组大肠杆菌表达载体的构建及乙酰鸟氨酸转氨酶 (ACOAT) 编码基因的诱导表达

将 T-*CcargD* 进行 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 胶回收 *argD* 片段, 与经相同酶切线性化的 pET-28a(+) 载体连接, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 筛选阳性转化子。经酶切验证, 挑选阳性转化子接种至含卡那霉素 (终浓度为 50 µg/mL) 的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1% 接种量转接, 至 OD<sub>600</sub> 约 0.6~0.8 时加入 IPTG 进行 16 °C 过夜诱导表达<sup>[10]</sup>。

#### 1.4.3 重组大肠杆菌-钝齿棒杆菌穿梭表达载体的构建

将 T-*CcargD* 进行 *Sal* I、*Bam* H I 双酶切, 胶回收 *argD* 片段, 与相同酶切的线性化载体 pJC-*tac* 连接, 转化大肠杆菌 *E. coli* JM109, 筛选阳性转化子, 经质粒验证后备用。

#### 1.4.4 SDS-PAGE

采用 5% 的浓缩胶及 12% 分离胶的不连续垂直平板电泳, 考马斯亮兰 R-250 染色。

表 2 本实验中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>CcargD</i> Primer F	CGCGTCGAC(GAATTC)ATGAGCAGCTGGAAACTG ( <i>Sal</i> I、 <i>Eco</i> R I)	29
<i>CcargD</i> Primer R	CGCGGATCC(CTCGAG)TTATGCGATTGTCTCGGCAA ( <i>Bam</i> H I、 <i>Xho</i> I)	29

#### 1.4.5 乙酰鸟氨酸转氨酶的纯化

诱导表达的菌液于 10 000 r/min、4 °C 离心收集菌体, 进行超声波破碎细胞, PBS 缓冲液 (pH 7.4) 悬浮菌体, 0.45 μm 滤膜过滤后上柱, 经 Ni-NTA 纯化<sup>[10]</sup>。

#### 1.4.6 乙酰鸟氨酸转氨酶活力的测定<sup>[11-14]</sup>

酶反应体系: 0.5 mL 反应液含 100 mmol 磷酸钾缓冲液 (pH 9.5) (加入不同浓度的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 或由 KOH 调节至目标 pH 值), 10 mmol N-乙酰-L-鸟氨酸, 5 mmol α-酮戊二酸钾, 0.5 mmol 5-磷酸吡哆醛及适量酶液。37 °C 水浴 15 min 后加入 0.2 mL 反应终止液 (10 mol/L HCl), 终止反应后沸水浴 45 min, 冷却至室温后离心, 上清加入 1 mL 3.6 mol 的醋酸钠和 0.2 mL 10 mmol 的邻氨基苯甲醛, 室温显色 15 min, 测定 440 nm 下的吸光值。产物 5-吡咯羧酸 440 nm 的摩尔吸光系数为 1.9×10<sup>3</sup> L/(mol·cm)。本实验利用精氨酸合成途径中的逆向反应, 采用 N-乙酰-L-鸟氨酸和 α-酮戊二酸钾为底物, 5-磷酸吡哆醛为辅酶, 有明显的黄色反应则为有酶活。其原理是利用邻氨基苯甲醛和酶促反应产物自身环化脱乙酰基的 5-吡咯羧酸产生黄色反应, 440 nm 下测定光吸收值。

一个 ACOAT 活力单位 (U) 定义为在上述反应条件下, 每分钟转化 α-酮戊二酸钾生成 1 μmol 产物环化后生成 5-吡咯羧酸所需的酶量。

#### 1.4.7 蛋白质含量测定

酶液蛋白含量采用 Bradford 法<sup>[16]</sup>测定, 以 BSA 为标准蛋白。

#### 1.4.8 乙酰鸟氨酸转氨酶的酶学性质的初步研究

最适 pH 及 pH 稳定性: 配制 pH 4.0~12.0 的反应缓冲液, 37 °C 下将酶分别与不同 pH 的反应液混合, 测定 ACOAT 在不同 pH 体系中酶活, 观察 pH 对酶促反应的影响。再将一定量的酶液加入到以上不同 pH 的反应缓冲液中, 30 °C 保温 1 h, 测定剩余酶活, 观察 ACOAT 在不同 pH 条件下的稳定性。

最适温度及热稳定性: 采用 pH 7.0 反应液, 分

别在 4 °C、15 °C、25 °C、30 °C、35 °C、45 °C、55 °C、65 °C、80 °C 温度下测定酶活, 研究温度对酶的影响。将酶液置于以上不同温度下保温 1~5 h, 测定剩余酶活, 观察 ACOAT 在不同温度下的稳定性。

不同金属离子、EDTA 及精氨酸和鸟氨酸的添加对酶活的影响: 在反应液中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Li<sup>+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 以及 EDTA、L-鸟氨酸、L-精氨酸, 30 °C 下测定 ACOAT 酶活, 以不另加任何物质的反应液作为对照, 研究不同金属离子对酶促反应的影响<sup>[17]</sup>。

#### 1.4.9 重组钝齿棒杆菌的获得

采用电击转化法<sup>[18]</sup>将重组质粒转化钝齿棒杆菌, 涂布含有 30 μg/mL 卡那霉素的固体 LBG 平板于 30 °C 培养 36 h, 挑取转化子验证后于斜面保藏。

#### 1.4.10 钝齿棒杆菌的发酵

从斜面挑取一环菌体接种种子培养基, 30 °C 于往复摇床培养 15~16 h。5 L 发酵罐发酵: 5 L 发酵罐中装液量 3 L, 接种量 5%, 通风量 3 L/min, 流加氨水控制 pH 7.0, 搅拌转速为 600 r/min, 30 °C 发酵 96 h。

#### 1.4.11 菌体生长的测定

发酵液用 0.25 mol/L 的盐酸稀释至适当倍数, 测定 562 nm 处的光密度, 按照 1 OD=0.375 g/L DCW, 换算为菌体干重 (文中以 DCW 表示)<sup>[7,17]</sup>。

#### 1.4.12 发酵液中还原糖的测定

采用 SBA-40B 生物传感分析仪测定发酵液中葡萄糖浓度<sup>[19]</sup>。

#### 1.4.13 氨基酸含量的测定

采用坂口试剂法测定精氨酸<sup>[20-21]</sup>及氨基酸自动分析仪测定发酵液中氨基酸含量。

## 2 结果

### 2.1 钝齿棒杆菌 *argD* 基因的克隆及分析

以 *C. crenatum* SYPA5-5 基因组 DNA 为模板, 引物 P1、P2 进行 PCR 扩增, 得到大小 1 176 bp、

编码 390 个氨基酸的基因片段, 连接至 pMD18-T 载体测序, 比对结果表明 *C. crenatum* SYPA *argD* 基因与 *C. glutamicum* ATCC 13032 *argD* 同源率为 99.32%, 相差 8 个碱基, 4 个氨基酸。*C. crenatum* SYPA 5-5 基因 *argD* 核苷酸序列已提交 GenBank 数据库 (Accession No. HQ602711)。

## 2.2 重组大肠杆菌 BL21 (pET-28a-*argD*) 的构建

将 T-*CcargD* 用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 回收 *argD* 片段后, 与线性化 pET-28a(+) 连接后转化, 阳性转化子提取质粒经 *EcoR* I、*Xho* I 酶切验证, 释放 5 369 bp 和约 1 176 bp 大小的片段, 分别对应 pET-28a(+) 和 *argD* 的大小, 结果表明质粒 pET-28a-*CcargD* 构建成功。

## 2.3 *CcargD* 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达与重组蛋白 ACOAT 的纯化

重组菌 pET-28a(+)-*CcargD*/BL21 (DE3), 经诱导表达菌液经超声破碎取上清 SDS-PAGE 分析, 检测到分子量约为 42 kDa 的特异性条带, 如图 2 所示。上清液测得酶活为 65.7 U/g, 约为对照菌株 BL21 粗酶液酶活的 6 倍, 说明 *argD* 基因在大肠杆菌中表达, 乙酰鸟氨酸转氨酶具生物学活性。采用 Ni-NTA 亲和层析, 纯化后 ACOAT 酶液比酶活为 108.2 U/g, 回收率达 77.8%, 结果见表 3。

## 2.4 乙酰鸟氨酸转氨酶的酶学性质

### 2.4.1 最适 pH 及 pH 稳定性

由图 3 可知重组酶的最适反应 pH 为 8.0, 但在 pH 6.0~9.0 范围内酶活均处于较高的水平, 在酸性和强碱的条件下, 酶活损失严重。将 ACOAT 在 pH 6.0~10.0 处理 1~5 h 后测定酶活性, 在 pH 7.0、8.0、9.0、10.0 时保温 1 h 后的酶活力均能保持 85%

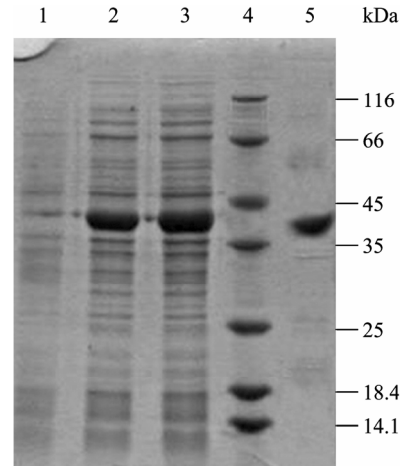


图 2 重组菌全细胞蛋白及 ACOAT 纯化后 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells and ACOAT purification. 1: supernatant of *E. coli* BL21 with plasmid pET-28a(+); 2,3: supernatant of *E. coli* BL21 with recombinant plasmid pET-28a(+)-*CcargD*; 4: protein markers (kDa); 5: purified ACOAT.

以上的酶活力, 说明 ACOAT 在弱碱性环境下相对稳定, 而重组酶保存在 pH 值为 8.0 的缓冲液条件下稳定性最佳 (图 4)。

### 2.4.2 最适反应温度及热稳定性

如图 5 所示, 在 4 °C~80 °C 范围内进行酶促反应, 最适反应温度为 30 °C, 而已报道的肠杆菌属的乙酰鸟氨酸转氨酶的最适反应温度为 37 °C<sup>[9]</sup>。在 20 °C、25 °C、37 °C 酶活力相似约为在 30 °C 条件下的 97%; 由图 6 可知, 37 °C 保温 5 h 后有 74% 活力, 55 °C 保温 5 h 后仍留有 69% 活力, 表明该酶热稳定性较好。ACOAT 在 4 °C~40 °C 较稳定, 保温 1 h 后相对酶活仍在 80% 以上, 随着温度的升高, 酶稳定性逐渐下降, 到达 65 °C 时 ACOAT 几乎完全失活, 且检测不到酶活, 说明酶已完全失活。

表 3 重组酶乙酰鸟氨酸转氨酶纯化表

Table 3 Purification of recombinant ACOAT

ACOAT	Total protein (g/L)	Total enzyme activity (U/L)	Specific activity (U/g)	Recovery percent (%)	Purification ratio
Crude enzyme	5.3	348.2	65.7	100.0	1.00
By Ni-NTA	2.5	270.5	108.2	77.8	1.65

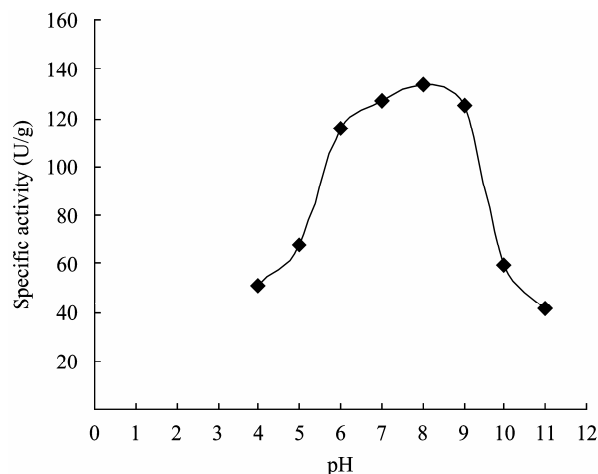


图3 pH对转氨酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzymatic transamination.

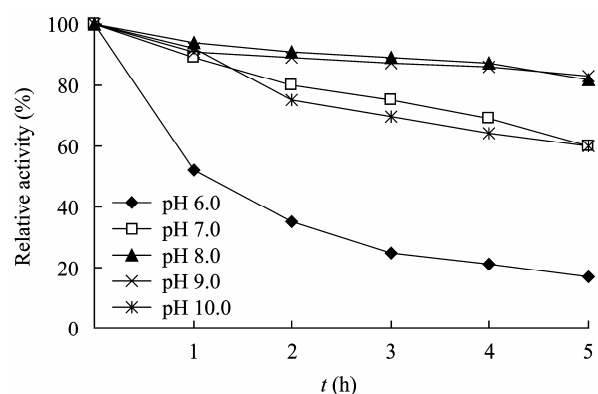


图4 乙酰鸟氨酸转氨酶的 pH 稳定性

Fig. 4 pH stability of N-Acetylornithine aminotransferase.

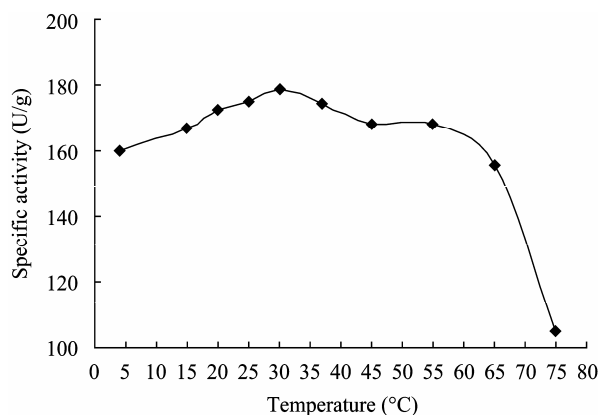


图5 温度对转氨酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on enzymatic transamination.

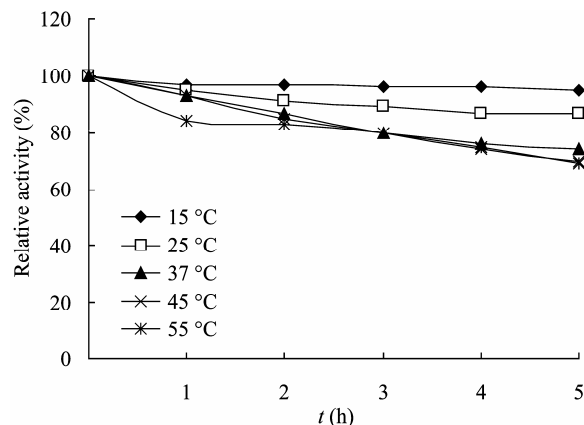


图6 乙酰鸟氨酸转氨酶的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of N-Acetylornithine aminotransferase.

#### 2.4.3 金属离子及EDTA对ACOAT酶促反应的影响

金属离子可作为酶促反应的辅助因子, 在酶促反应中常添加一些金属离子。在 ACOAT 酶促反应添加金属离子以及 EDTA, 以不加离子的反应液作为对照设其酶活为 100%, 离子对 ACOAT 酶活的影响结果见表 4。Ni<sup>2+</sup>对转氨酶的酶活力有明显促进作用; Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>等加入后出现白色絮状沉淀, 酶活较低, 此时酶蛋白大多已失活; Na<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>及 EDTA 对酶促反应影响较小; Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>均具有一定抑制作用。

#### 2.4.4 精氨酸、鸟氨酸对ACOAT酶促反应的影响

反应体系中添加终浓度为 1 mmol/L 的 L-精氨酸以及 L-鸟氨酸 (该酶在以 L-精氨酸和 L-鸟氨酸为底物时没有转氨活性), 测定代谢途径相关氨基酸对 ACOAT 酶活影响, 分别测得酶活为 104.9 U/g 和 118.9 U/g, 说明 L-鸟氨酸的添加对钝齿棒杆菌 ACOAT 催化底物 N-乙酰鸟氨酸与  $\alpha$ -酮戊二酸生成 N-乙酰谷氨酸半醛的转氨反应起促进作用, 酶活提高 9.89%; L-精氨酸的添加对其酶促反应几乎没有影响, 说明此酶不受终产物反馈抑制。

### 2.5 重组钝齿棒杆菌 *C. crenatum* (pJctac-CcargD) 的构建

构建重组质粒 pJctac-CcargD 同上文, 经 Sal I、

*Bam*H I 双酶切, 释放约 6 400 bp 和 1 100 bp 大小的片段, 分别对应于 *pJctac* 和 *argD* 的大小, 证明重组质粒构建成功。电击转化 *C. crenatum* SYPA, 在含卡那霉素的 LBG 平板上筛选阳性转化子 *C. crenatum* (*pJctac-CcargD*)。

## 2.6 重组钝齿棒杆菌的获得及其与 *C. crenatum* SYPA 中 ACOAT 酶活力比较

研究发现 IPTG 的添加对菌体生长具有一定的毒性, 由于 *tac* 启动子在钝齿棒杆菌中未经 IPTG 诱导即有本底表达, 因此以下重组菌的发酵中选择不添加 IPTG。挑选一组 *C. crenatum* (*pJctac-CcargD*) 转化子和出发菌株 *C. crenatum* SYPA 接种于 LBG 培养基培养 24 h 后转接于种子培养基 18 h 后收集菌体, 经超声波破碎, 测定粗酶液中 ACOAT 酶活, 选择其中 3 组数据如表 5 所示。可以看出, 重组菌粗酶液的转氨酶活力显著提高, 其中以 3 号转化子提高最多, 提高了 84.4%, 证明了重组菌 ACOAT 表达量加强。

## 2.7 重组菌 *C. crenatum* (*pJctac-CcargD*) 与 *C. crenatum* SYPA 5-5 发酵产精氨酸比较

挑取酶活提高较多的 8 个重组菌 *C. crenatum* (*pJctac-CcargD*) 和出发菌株 *C. crenatum* SYPA 同时摇瓶发酵, 将 8 个转化子分别命名为 *CCD* (1~8),

每个转化子取 3 个平行, 摇瓶发酵产酸比较。将产量最高的转化子命名为 *CCD1* 和出发菌株 *C. crenatum* SYPA 5-5 进行 5 L 发酵罐发酵, 每隔 8 h 取样对 *OD*、残糖及产酸进行跟踪测定, 多次发酵结果表明转化子 *CCD1* 产酸稳定, 取 3 次发酵数据绘制图 7, 由图可知 *CCD1* 较出发菌株 *C. crenatum* SYPA 5-5 在生长前期稍慢, 对数生长期后两者生长状态已基本趋于一致; 40 h 到 96 h 为菌体生长的稳定期也是精氨酸积累的关键时期, 此时重组菌 *CCD1* 发酵产酸优势趋于明显, 精氨酸生成率明显提高, 至发酵结束时产量达到最高达 39.7 g/L, 较出发菌株 *C. crenatum* SYPA 产酸 34.6 g/L 提高了 14.7%。由耗糖曲线可以看出重组菌的耗糖能力从 16 h 开始便强于对照出发菌株, 到发酵 96 h 时葡萄糖残留量都为 0。结果表明加强精氨酸合成代谢途径中的转氨酶表达可以增强精氨酸合成的代谢流从而对增强 L-精氨酸的合成途径有一定的加强作用, 但提高幅度不大。由图 7 (E) 可知发酵溶氧曲线, *argD* 的增强表达对菌株的溶氧水平的影响较显著, 重组菌 *CCD1* 与对照菌株 SYPA 相比从发酵起始溶氧曲线始终保持较低水平, 说明重组菌发酵罐内氧气利用较多, 说明菌体中 *argD* 的加强表达提高菌体氧利用率显著。

表 4 金属离子及 EDTA 对 ACOAT 酶活性的影响

Table 4 Effect of metal ion and EDTA on the activity of ACOAT

Ion	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub>	Ca <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	EDTA
Relative activity (%)	93.6	96.6	105.5	94.5	96.3	34.5	101.8	25.5	69.1	97.3	67.3	124.1	28.0	94.8

表 5 重组菌与原始 *C. crenatum* SYPA ACOAT 酶活力分析比较

Table 5 Comparison of ACOAT enzyme activities in the *CCD* (*pJctac-CcargD/C. crenatum*) and *C. crenatum* SYPA

Strains	ACOAT enzyme activity (U/L)	Protein content (g/L)	ACOAT specific enzyme activity (U/g)	Increase rate (%)
<i>C. crenatum</i> SYPA	434.2	26.8	16.2	-
Stain <i>CCD1</i>	690.9	24.3	28.4	75.1
Stain <i>CCD2</i>	634.5	21.8	29.1	79.9
Stain <i>CCD3</i>	747.9	25.1	29.8	84.4



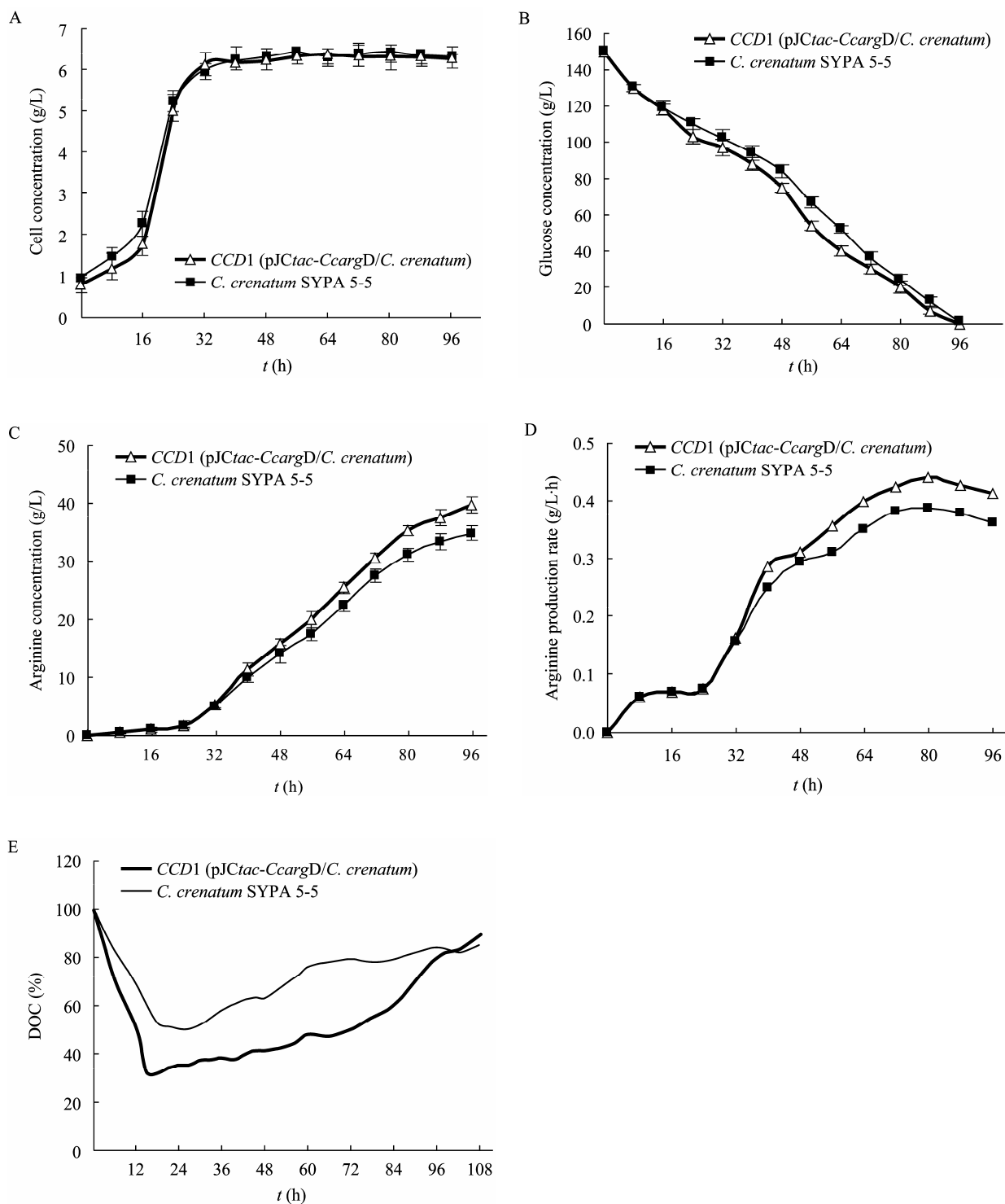


图 7 重组菌 *CCD1* (pJClac-CcargD/*C. crenatum*) 与原始菌株的发酵曲线

Fig. 7 Comparison of L-arginine production between the *CCD1* (pJClac-CcargD/*C. crenatum*) and *C. crenatum* SYPA. (A) Cell concentration. (B) Glucose concentration. (C) L-arginine concentration. (D) L-arginine production rate. (E) The dissolved oxygen (DO) changing patterns.

### 3 讨论

本文首先研究了精氨酸合成代谢途径中 N-乙酰鸟氨酸转氨酶的酶学性质, *C. crenatum* ACOAT 在弱碱性酶活相对稳定, 而来自于 *E. coli* 和 *Klebsiella aerogenes* 的 ACOAT 的酶学性质最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 6.5 和 7.0<sup>[13,22-23]</sup>, 本课题组还分析了此代谢途径中其他酶的性质, 发现 *argC-argH* 编码的 7 个酶最适 pH 都在 6.5~8.0 之间, 从酶促反应的角度解释了精氨酸发酵过程需要维持 pH 7.0~7.5。还发现了 Ni<sup>2+</sup> 的促进作用和 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup> 的抑制作用, 这为深入研究其蛋白结构和作用机理, 以便更清晰了解 *C. crenatum* SYPA 精氨酸合成途径奠定了基础, 同时为改良发酵工艺和培养基的优化进一步提高产酸提供了可靠理论依据; 本研究还发现了鸟氨酸的添加对 ACOAT 的酶活具有一定的激活作用, 但其作用机理将在对 ACOAT 进行蛋白结构分析的基础上进行分析, 相关研究正在进行。

另外, 利用代谢工程提高 L-精氨酸产量最重要的策略之一是提高关键酶酶量, 郝宁等在加强了钝齿棒杆菌中合成精氨酸关键酶基因 N-乙酰谷氨酸激酶表达后其产量提高了 25%<sup>[24]</sup>。本课题组同样也对 *C. crenatum* SYPA 5-5 的精氨酸合成关键酶基因 *argB* 进行了加强表达研究, 重组菌 CCB 产酸量提高较明显, 提高幅度为 23.4%, 与郝宁等的研究结果相似。本文通过增加转氨酶编码基因表达量, 较出发菌株 ACOAT 酶活提高了 84%; 发现 ACOAT 的增强表达对菌株溶氧水平影响显著, 课题组前期研究发现溶氧在精氨酸的合成中起重要作用, 高溶氧条件下精氨酸的产量明显高于低溶氧条件下的产酸量<sup>[7]</sup>, 重组菌 *CCDI* 在发酵精氨酸过程中氧利用率明显高于对照菌株, 从实验结果来看, 重组菌精氨酸产量提高一方面是由于 *argD* 的过量表达增强了精氨酸合成代谢流, 另一方面是由于菌体自身氧利用率提高, 从而使得重组菌精氨酸的产量提高了 14.7%。本研究为构建高产精氨酸重组基因工程菌

提供理论依据, 具有一定的指导意义。另外本文证明了加强合成代谢途径中某一种酶 (关键酶/非关键酶) 的表达既可以增强产物合成代谢流量, 也可能改变菌体的某些其他发酵性能, 这为氨基酸代谢研究提供了一定的实践参考。

### REFERENCES

- [1] Ikeda M. Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2003, 79: 1-35.
- [2] Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis*, 1996, 127(1): 1-11.
- [3] Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev*, 1986, 50(3): 314-352.
- [4] Lu CD. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(3): 261-272.
- [5] Xu Y, Labedan B, Glansdorff N. Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(1): 36-47.
- [6] Xu ZH, Xiong XJ, Dou WF, et al. Improvement of high L-arginine producing strain and the mechanism analysis based on metabolic flux distribution. *Ind Microbiol*, 2006, 36(4): 1-6.  
许正宏, 熊筱晶, 窦文芳, 等. L-精氨酸高产菌的选育及基于代谢流量分布的育种机制. *工业微生物*, 2006, 36(4): 1-6.
- [7] Xu H, Dou WF, Xu HY, et al. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced l-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis. *Biochem Eng J*, 2009, 43(1): 41-51.
- [8] Xu MJ, Rao ZM, Xu H, et al. Enhanced production of L-arginine by expression of *Vitreoscilla* hemoglobin using a novel expression system in *Corynebacterium crenatum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 163(6): 707-719.
- [9] DOU WF, XU ZH, Tao WY, et al. Effects of carbon source and its feeding mode on L-Arginine production by *Corynebacterium crenatum* JDN28-75. *Chin J Pharm Ind*, 2004, 35(5):272-281.

- 窦文芳, 许正宏, 陶文沂, 等. 碳源及添加模式对钝齿棒杆菌 JDN28-75 发酵生产 L-精氨酸的影响. 中国医药工业杂志, 2004, 35(5): 272-281.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Friedrich B, Friedrich CG, Magasanik B. Catabolic N<sub>2</sub>-acetylornithine 5-aminotransferase of *Klebsiella aerogenes*: control of synthesis by induction, catabolite repression, and activation by glutamine synthetase. J Bacteriol, 1978, 133(2): 686-691.
- [12] Heimberg H, Boyen A, Crabeel M, et al. *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* acetylornithine aminotransferase: evolutionary relationship with ornithine aminotransferase. Gene, 1990, 90(1): 69-78.
- [13] Ledwidge R, Blanchard JS. The dual biosynthetic capability of N-acetylornithine aminotransferase in arginine and lysine biosynthesis. Biochemistry, 1999, 38(10): 3019-3024.
- [14] Morizono H, Cabrera-Luque J, Shi DS, et al. Acetylornithine transcarbamylase: a novel enzyme in arginine biosynthesis. J Bacteriol, 2006, 188(8): 2974-2982.
- [15] Mao Y, Bi ZZ. Determination of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by RP-HPLC. Chin Pharm Affairs, 2008, 22(10): 895-896.  
毛影, 毕中周. HPLC 法测定酮戊二酸的含量. 中国药事, 2008, 22(10): 895-896.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] Wang JY, Shen T. Biochemistry. 3 rd. Beijing: High Education Press, 2001: 78-278.
- 王镜岩, 沈同. 生物化学. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2001: 78-278.
- [18] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, 2003, 104(1/3): 287-299.
- [19] Ning ZX. Handbook of Food Composition Analysis. Beijing: China Light Industry Press, 2001: 50-55.  
宁正祥. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 50-55.
- [20] Yu HQ, Wu SH, Zhang KX, et al. The study on quantitative determination of L-arginine content with  $\alpha$ -naphthol. J Tianjing Univ Sci Technol, 2001, (2): 30-33.  
俞海青, 伍时华, 张克旭, 等.  $\alpha$ -萘酚法定量测定 L-Arg 的研究. 天津科技大学学报, 2001, (2): 30-33.
- [21] Hao G, Qian H. Study on the method of L-arginine quantification in fermentation broth. Sci Technol Food Ind, 2005, 26(2): 184-186.  
郝刚, 钱和. 发酵液中 L-精氨酸定量检测方法的研究. 食品工业科技, 2005, 26(2): 184-186.
- [22] Vander Wauven C, Stalon V. Occurrence of succinyl derivatives in the catabolism of arginine in *Pseudomonas cepacia*. J Bacteriol, 1985, 164(2): 882-886.
- [23] Albrecht AM, Vogel HJ. Acetylornithine delta-transaminase. Partial purification and repression behavior. J Biol Chem, 1964, 239: 1872-1876.
- [24] Hao N, Zhao Z, Wang Y, et al. Cloning, sequence analysis and expression of N-acetylglutamate kinase gene in *Corynebacterium crenatum*. Acta Microbiol Sin, 2006, 46(1): 90-94.  
郝宁, 赵智, 王宇, 等. 钝齿棒杆菌 N-乙酰谷氨酸激酶基因的克隆、序列分析及表达. 微生物学报, 2006, 46(1): 90-94.