

## 弗氏柠檬酸菌 1,3-丙二醇合成的代谢工程研究

于越 郭文逸 王居立 杨洪江\*

(工业微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

**摘要:**【目的】研究弗氏柠檬酸菌(*Citrobacter freundii*) 1,3-丙二醇合成的代谢过程。【方法】构建甘油脱氢酶基因 *GSR-lacZ*、1,3-丙二醇氧化还原酶基因 *PDO-lacZ* 和甘油脱水酶基因 *GL-lacZ* 等报告基因。在此基础上, 构建 3 个相应的转座子突变文库。【结果】筛选到 6 株突变子, 其相应关键酶表达水平提高 1-11 倍, 1,3-丙二醇产量提高幅度为 3%-50%。对转座子插入位点分析显示, 5 株突变子插入位点均为  $\beta$ -内酰胺酶(CKO\_02592)编码基因, 1 株突变子插入位点为二氢硫辛酰胺基转移酶(CKO\_02433)编码基因。进一步分析发现,  $\beta$ -内酰胺酶基因突变显著提高甘油脱水酶和甘油脱氢酶的表达水平, 而 1,3-丙二醇氧化还原酶表达水平没有变化; 二氢硫辛酰胺基转移酶基因突变显著提高 1,3-丙二醇氧化还原酶表达水平, 其他两种关键酶基因表达水平不变。【结论】 $\beta$ -内酰胺酶和二氢硫辛酰胺基转移酶基因能够分别影响 1,3-丙二醇合成代谢途径关键酶的表达, 为构建工程菌株打下基础。

**关键词:** 转录融合报告基因, 转座子突变文库, 弗氏柠檬酸菌, 1,3-丙二醇

## Metabolic engineering of 1,3-propanediol synthesis in *Citrobacter freundii* CF-5

YU Yue GUO Wen-Yi WANG Ju-Li YANG Hong-Jiang\*

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [Objective] The metabolism of 1,3-propanediol in *Citrobacter freundii* was studied. [Methods] Transcriptional fusion reporter genes of *GSR-lacZ*, *PDO-lacZ*, and *GL-lacZ* were constructed. Based on this, the mariner transposon libraries were constructed. [Results] Six mutants were isolated. The expression level of the corresponding key enzymes was increased from 1 to 11 folds in the mutants, and the corresponding 1,3-propanediol production was increased from 3% to 50%. Transposon insertion sites were analyzed and the results show that the  $\beta$ -lactamase gene was inactivated in 5 mutants and the dihydrolipoamide acyltransferase gene was inactivated in 1 mutant. Furthermore, the expression levels of glycerol dehydrogenase and glycerol dehydratase were increased significantly in the  $\beta$ -lactamase mutant, whereas no increase of the 1,3-propanediol oxidoreductase expression was observed. In the dihydrolipoamide acyltransferase mutant, 1,3-propanediol oxidoreductase expression level was significantly improved, whereas the other two enzymes expression

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370205)

\*通讯作者: ✉: hongjiangyang@tust.edu.cn

收稿日期: 2014-07-09; 接受日期: 2014-10-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-15

level remained unchanged. **[Conclusion]** The results provide insight into constructing engineering strains producing a high level of 1,3-propanediol.

**Keywords:** Transcriptional fusion reporter gene, Transposon mutant library, *Citrobacter freundii*, 1,3-Propanediol

1,3-丙二醇是典型的甘油发酵产物, 甘油作为唯一碳源, 可在菌体内沿着氧化途径和还原途径发生歧化反应<sup>[1-2]</sup>。在氧化途径中, 甘油在甘油脱氢酶(Glycerol dehydrogenase, GDH)的催化下生成二羟丙酮, 进一步代谢成丙酮酸, 进入三羧酸循环。这一过程为微生物提供 ATP 和还原力 NADH; 在还原途径中, 甘油在以维生素 B12 为辅酶的甘油脱水酶(Glycerol dehydratase, GDHt)催化下生成 3-羟基丙醛, 进一步在 1,3-丙二醇氧化还原酶(1,3-Propanediol oxidoreductase, PDOR)作用下生成 1,3-丙二醇。相关文献已报道, 甘油脱氢酶(GDH)、甘油脱水酶(GDHt)和 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)在生物发酵生产 1,3-丙二醇代谢途径中起到关键作用<sup>[3-5]</sup>。

研究表明, 上述几种甘油厌氧代谢过程中的关键酶, 其编码基因都在 *dha* 操纵子上<sup>[6-7]</sup>。如图 1 所示, 其中 *dhaD* 编码甘油脱氢酶<sup>[8]</sup>, *dhaB*、*dhaC* 和 *dhaE* 编码甘油脱水酶<sup>[9]</sup>, *dhaT* 编码 1,3-丙二醇氧化还原酶<sup>[10]</sup>, *dhaK* 编码二羟基丙酮激酶<sup>[11]</sup>。*dhaF* 和 *dhaG* 共同编码了甘油脱水酶的激活因子, 这个激活子可能以(*dhaF*)<sub>2</sub>(*dhaG*)<sub>2</sub> 二聚体形式存在<sup>[12]</sup>, 另外, *dha* 操纵子上还有一个调节基因编码的抑制酶, 此抑制酶由 *dhaR* 编码<sup>[11]</sup>。研究表明, *dha* 操纵子的功能受到 3 个因子的影响: (1) *dhaR* 所编码的抑制子可在转录水平上抑制 *dha* 系统酶的合成<sup>[11]</sup>; (2) 氧气对 *dha* 系统有负调控作用, 当细胞存在厌氧环境进行甘油代谢时, 氧气的存在能引起甘油脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的不可逆失活<sup>[13]</sup>; (3) 环腺苷酸 cAMP 也是影响 *dha* 操纵子的一个因素, 在肺炎克雷伯氏菌培养基中加入底物葡萄糖时, 甘油脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的活性丧失了一半<sup>[14]</sup>。然而, 对于甘油厌氧代谢过程中涉及关键酶的其他调控基因鲜有报道。

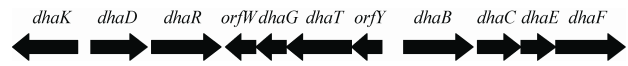


图 1 弗氏柠檬酸菌中 *dha* 的组成

Figure 1 Genetic organization of *dha* in *Citrobacter freundii*

弗氏柠檬酸菌中, 1,3-丙二醇合成途径调节机制的研究还是空白, 本研究采用报告基因和构建转座子突变文库的方法, 筛选相应突变子, 分析关键酶基因的表达水平, 确定与 1,3-丙二醇合成相关的基因, 实验结论对深入了解弗氏柠檬酸菌合成 1,3-丙二醇的调控机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和培养基

本研究所用的菌株和质粒如表 1 所示。

LB (Luria-Bertani) 培养基用于细菌的常规培养, 配方为蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g 和氯化钠 10 g, 加蒸馏水至 1 L, 调 pH 至 7.0。牛肉膏蛋白胨琼脂培养基用于 Mating 实验, 配方为牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g 和氯化钠 5 g, 加蒸馏水至 1 L, 调 pH 至 7.0。发酵培养基用于发酵合成 1,3-丙二醇, 配方为甘油 40.00 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.00 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.40 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.30 g, MgSO<sub>4</sub> 0.20 g, 酵母粉 3.00 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 蛋白胨 5.00 g, 无水氯化钙 0.01 g, 柠檬酸钠 0.42 g 和 CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01 g, 加蒸馏水至 1 L, 调 pH 至 7.0, 添加过滤除菌的维生素 B12 至终浓度 10 mg/L。

### 1.2 转录融合报告基因的构建

参考相关文献构建转录融合报告基因<sup>[19]</sup>。根据 GenBank 1,3-丙二醇合成途径中甘油脱氢酶(GDH)、甘油脱水酶(GDHt)和 1,3-丙二醇氧化还原酶(PDOR)的基因信息 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/U09771.1>), 分别设计相关基因启动子基因的特异性引物。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Descriptions	Source
Plasmids		
pDN19lacΩ	Promoterless <i>lacZ</i> gene, Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	[15]
pGEM-T Easy	Clone vector, Ap <sup>r</sup>	Promega
pYY-1	<i>dhaD</i> promoter fragment of gene on pGEM-T Easy, Ap <sup>r</sup>	This study
pYY-2	<i>dhaT</i> promoter fragment of gene on pGEM-T Easy, Ap <sup>r</sup>	This study
pYY-3	<i>dhaBCE</i> promoter fragment of gene on pGEM-T Easy, Ap <sup>r</sup>	This study
pYY-4	<i>dhaD</i> promoter fragment of gene on pDN19lacΩ, Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	This study
pYY-5	<i>dhaT</i> promoter fragment of gene on pDN19lacΩ, Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	This study
pYY-6	<i>dhaBCE</i> promoter fragment of gene on pDN19lacΩ, Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	This study
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	Strain for cloning	[16]
<i>E. coli</i> S17-1	Strain for mating conjugation	[17]
<i>E. coli</i> SM 10-λpir/pKKma	Carrying mariner transposon, Ap <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	Lab collection
<i>C. freundii</i> CF-5	Wild type strain	[18]
<i>C. freundii</i> CF-5/pYY-4	Carrying reporter gene of <i>dhaD</i> , Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	This study
<i>C. freundii</i> CF-5/pYY-5	Carrying reporter gene of <i>dhaT</i> , Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	This study
<i>C. freundii</i> CF-5/pYY-6	Carrying reporter gene of <i>dhaBCE</i> , Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	This study

1FP: 5'-CCGGAATTCCAGGATAGTTCCTCCG  
CAATGCCACG-3';

1RP: 5'-CGCGGATCCTTCTCTCCCGCCAGC  
TTCATCACGA-3';

2FP: 5'-CCGGAATTCTGTGCCGATGCCAGA  
TTTTTCCCCG-3';

2RP: 5'-CGCGGATCCGTGATATTGCCTTAA  
CCCATGCCCA-3';

3FP: 5'-CCGGAATTCGTTGGCATCTTTGGA  
AATGTAGGCT-3';

3RP: 5'-CGCGGATCCTATCAATAAACGCCA  
CAACAGGAAA-3'.

为了便于克隆和连接, 每对引物的正向引物 5' 端设计了 *EcoR* I 酶切位点, 反向引物 5' 端设计了 *Bam*H I 酶切位点。以菌株 CF-5 基因组为模板, PCR

扩增相应关键酶启动子片段, 纯化后连接到 pGEM-T Easy 载体上, 进一步亚克隆到 pDN19lacΩ 质粒上。构建的重组质粒, 通过接合的方式转至弗氏柠檬酸菌 CF-5 中。

### 1.3 突变子文库的构建

转座子文库的构建参考文献[20-21]进行。以携带转录融合报告基因的弗氏柠檬酸菌为受体菌, 以含有 Mariner 转座子的 *E. coli* SM 10-λpir 为供体菌。分别培养供体菌和受体菌, 收集菌体均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 37 °C 培养 10 h。刮取菌泥制备菌悬液, 涂布于含有相应抗生素的 LB 平板上, 37 °C 培养 2-3 d 直至长出单菌落, 即转座子突变子文库。

### 1.4 关键酶报告基因酶活的测定

关键酶报告基因酶活的测定参考文献[22-23]

进行。将 1 mL 菌液加入 3 mL 水中, 在  $OD_{600}$  测定吸光值。另取 1 mL 菌液于试管中, 向试管中加入 80  $\mu$ L 0.1% SDS, 80  $\mu$ L 氯仿, 3 mL Z-buffer, 800  $\mu$ L ONPG (4 g/L), 待反应液变黄至  $OD_{420}$  为 0.4–0.8 时, 加入 1 mol/L 碳酸钠溶液终止反应并记录反应时间。将反应液离心, 在  $OD_{420}$  下测定其吸光值。利用公式  $Mnit=(1\ 000\times OD_{420})/(T\times OD_{600})$  进行计算。

### 1.5 突变子 1,3-PDO 产量的测定

用无菌牙签分别点接突变菌株于装有 5 mL LB 的培养基, 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 12 h, 此培养液作为一级种子液。相同条件下, 按 5% 的接种量制备二级种子液。按照 5% 的接种量, 将二级种子液接种于摇瓶发酵培养基中, 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 12 h, 然后静置培养于 37  $^{\circ}$ C 的恒温培养箱, 培养时间为 24 h。最后将处理后的发酵液进行 1,3-丙二醇产量的测定。将 CF-5 作为对照, 按上述操作进行发酵培养。

1,3-丙二醇的测定: 使用 Agilent7890A 气相色谱仪测定 1,3-丙二醇的含量。样品处理过程包括离心(7 000 r/min)、过膜(0.25  $\mu$ m)以及乙酸乙酯萃取。色谱柱: HP-innowax (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m); 检测器: FID; 升温程序: 初温 100  $^{\circ}$ C 保留 1 min 以 10  $^{\circ}$ C/min 升至 230  $^{\circ}$ C 保留 2 min; 柱流速: 4 mL/min, 进样口 310  $^{\circ}$ C, 检测器 320  $^{\circ}$ C; 载气:  $N_2$  35 mL/min,  $H_2$  35 mL/min, 空气 350 mL/min, 进样量: 1  $\mu$ L。

### 1.6 突变位点基因的鉴定

参考染色体步移法(Genome walking)<sup>[24]</sup>鉴定突变位点。根据转座子 Mariner 的基因信息, 设计引物 4FP、5FP 以及 6FP, 其中 5FP 位于 4FP 下游, 6FP 位于 5FP 下游, RP 为随机引物。

4FP: 5'-TTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGG T-3';

5FP: 5'-ATTACAGTTTACGAACCGAACAGG C-3';

6FP: 5'-TTTGCGCCGACATCATAACG-3';

RP: 5'-CATCCCCCTG-3'。

采用 50  $\mu$ L PCR 体系, 从第一步(Primary)和第二步(Secondary)反应液中取 0.5  $\mu$ L 作为各自下一步的模板, 通过进行 3 轮热不对称 PCR 和巢氏 PCR, 获得已知序列的侧翼序列。具体反应步骤参见文献[25]。

### 1.7 质粒消除

采用连续传代法<sup>[26]</sup>进行质粒的消除。将菌株接种于无抗生素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养, 每 12 h 传代一次, 连续传代数代。菌液经稀释  $10^5$  倍后, 均匀涂布于 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 静置培养 12 h。随机挑取 50 个菌落, 用无菌牙签分别影印到不含抗生素和含有抗生素(Sp60Sm30)的 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 静置培养 12 h, 在不含有抗生素平板上长出菌落, 而在含有抗生素平板的相应位置上没有菌落出现的, 即为质粒丢失成功的菌株。新质粒的导入是通过接合的方法, 将含有报告基因的质粒导入已被去除质粒的菌株中。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建 1,3-丙二醇关键酶报告基因

PCR 扩增关键酶启动子片段并连接到 pGEM-T Easy 载体上, 构建了质粒 pYY-1、pYY-2 和 pYY-3。进一步亚克隆到 pDN19lac $\Omega$  质粒上, 成功构建了质粒 pYY-4、pYY-5 和 pYY-6。通过双亲接合将报告基因质粒转至菌株 CF-5 中, 成功构建了菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-4、*C. freundii* CF-5/pYY-5、*C. freundii* CF-5/pYY-6。

### 2.2 筛选关键酶表达水平提高的突变子

为了筛选菌株 CF-5 基因组中能够影响代谢 1,3-丙二醇过程中关键酶的相关调节基因, 利用转座子 Mariner 对菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-4、*C. freundii* CF-5/pYY-5、*C. freundii* CF-5/pYY-6 进行随机突变。通过双亲杂交, 构建突变子文库, 每个突变子文库共 60 000–80 000 个突变子。于不同突变子文库中分别挑选长势较好、蓝色较深的突变子。在含有抗生素的 LB 平板上连续传代纯化, 并且将纯化后的菌株进行编号。分离纯化出含甘油脱氢酶启动子报告基因的突变菌株 11 株, 含 1,3-丙二醇氧

化还原酶启动子报告基因的突变菌株 4 株, 含甘油脱水酶启动子报告基因的突变菌株 7 株。

为了筛选突变子中 1,3-丙二醇合成途径关键酶表达提高的菌株, 本实验以菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-4、*C. freundii* CF-5/pYY-5、*C. freundii* CF-5/pYY-6 为对照, 测定了突变子中报告基因所表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。结果如图 2 所示, 突变菌株 GSR7/pYY-4 和 GSR56/pYY-4 的酶活力分别为 414.6 U/mL 和 283.3 U/mL, 对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-4 的酶活力为 33.7 U/mL, 突变菌株的酶活力大约提高到对照菌株的 10 倍; 突变菌株 PDO30/pYY-5 的酶活力为 70.0 U/mL, 明显高于对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-5 的酶活力的 38.9 U/mL; 突变菌株 GL1/pYY-6、GL(2)3/pYY-6 和 GL33/pYY-6 的酶活力分别为 358.7、383.2 和 335.1 U/mL, 而对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-6 的酶活力为 28.2 U/mL, 突变菌株的酶活力提高到了对照菌株 10 倍以上, 然而其余筛选菌株的比酶活力和对照相比, 没有明显的提高。从上述结果可以看出, 利用转座子 Mariner 对影响 CF-5 关键酶基因的筛选起到了一定的作用。至少在不同的突变子文库中, 均得到了能够提高关键酶表达的突变子, 这为后续的研究奠定了基础。

### 2.3 分析突变子合成 1,3-丙二醇的水平

为了进一步验证突变菌株的突变是否与产量

相关, 本实验以菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-4、*C. freundii* CF-5/pYY-5、*C. freundii* CF-5/pYY-6 为对照, 测定了突变子产 1,3-丙二醇的能力。结果如图 3 所示, 突变菌株和对照菌株相比, 其生物量变化不明显, 这说明突变对菌株的生长影响较小; 从 1,3-丙二醇的生产能力看, 突变菌株 GSR7/pYY-4 的产量为 4.5 g/L, 对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-4 的产量为 3.1 g/L, 突变菌株 GSR7/pYY-4 的产量提高了 45%; 突变菌株 GL1/pYY-6、GL(2)3/pYY-6 和 GL33/pYY-6 的产量分别为 3.8、4.3 和 3.6 g/L, 对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-6 的产量为 2.9 g/L, 突变菌株 GL1/pYY-6、GL(2)3/pYY-6 和 GL33/pYY-6 的产量提高的幅度分别为 32%、50%和 27%; 其他突变菌株的产量与对照相比, 1,3-丙二醇产量增幅小于 3%, 可认为在误差范围内。从产量和酶活的角度看, 绝大部分酶活提高的突变株, 其产量相应的提高了, 但也有酶活提高了, 其产量变化不大的情况, 可能的原因: 弗氏柠檬酸菌代谢产生 1,3-丙二醇受多个关键酶基因调控, 从微观代谢途径上讲, 提高某个关键酶基因的表达, 可以改变该关键酶所调节的代谢通量, 但从宏观的代谢组学上讲, 某个关键酶基因表达的提高, 不能大范围改变其他代谢通路中的代谢通量, 所以在整个代谢网络中仍存在限速步骤。

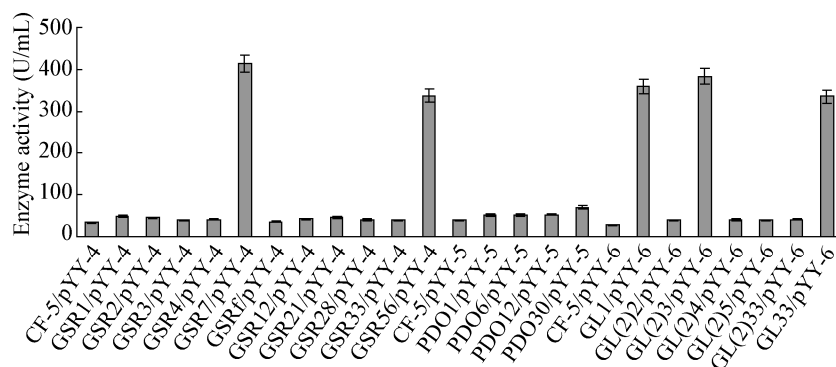


图 2 突变子关键酶基因的表达

Figure 2 Expression level analysis of key enzyme genes

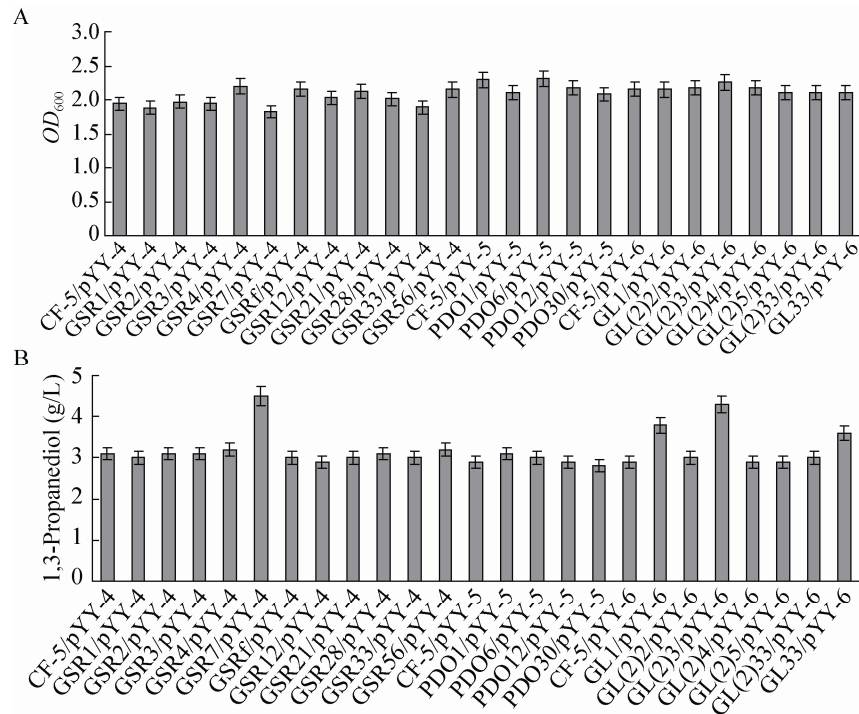


图3 突变子的发酵水平分析

Figure 3 The fermentation level analysis of mutants

Note: A: The biomass analysis; B: The 1,3-propanediol production analysis.

#### 2.4 鉴定突变子中转座子的插入位点

为了确定突变菌株的突变位点,对转座子进行基因定位,本实验利用染色体步移的方法鉴定插入突变位点旁的基因序列。以6FP为引物,对第3次PCR后纯化产物进行测序。

将测序结果在GenBank中进行同源性比对,结果如表2所示:含有甘油脱氢酶报告基因的文库中,突变菌株GSR7和GSR56的被阻断序列与*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (GenBank: CP000822.1)的序列具有同源性,并且它们的插入位点是相同的,是编码 $\beta$ -内酰胺酶(CKO\_02592)基因的第387 bp处。

含有甘油脱水酶报告基因文库中,突变菌株GL1、GL(2)3、GL33的被阻断序列与*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (GenBank: CP000822.1)具有同源性,并且它们的插入位点是相同的,是编码 $\beta$ -内酰胺酶(CKO\_02592)基因的第387 bp处。进一步分析发现, $\beta$ -内酰胺酶(CKO\_02592)基因同向下游

基因为一调节蛋白AraC(CKO\_02591)基因,这一调节蛋白的编码基因距离插入位点714 bp。插入相同位点可能的原因有:虽然理论上转座子是随机插入基因组的,但是对整个基因组而言,也存在一定的热点(Hot-spot),转座子插入这些热点的频率更高,这是一种常见现象;另外,如果突变子文库库容量足够大时,也会出现插入位点相同的菌株。

含有1,3-丙二醇氧化还原酶报告基因文库中,突变菌株PDO30的被阻断序列与*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (GenBank: CP000822.1)具有同源性,突变位点为编码二氢硫辛酰胺基转移酶(CKO\_02433)基因的第421 bp处。二氢硫辛酰胺基转移酶(CKO\_02433)基因同向下游基因为一假定蛋白(CKO\_02432)基因,这一假定蛋白的编码基因距离插入位点800 bp处。

其他突变菌株PDO1、PDO6、PDO12、GL(2)2、GL(2)4、GL(2)5、GL(2)33、GSR1、GSR2、GSR3、GSR4、GSRf、GSR12、GSR21、GSR28、GSR33

表 2 突变子的基因鉴定  
Table 2 The gene identification of the mutants

Mutant	Size (bp)	Insertion site (bp)	Protein	Downstream protein
GSR7	1 101	387	$\beta$ -Lactamase	AraC-type protein
GSR56	1 101	387	$\beta$ -Lactamase	AraC-type protein
GL1	1 101	387	$\beta$ -Lactamase	AraC-type protein
GL(2)3	1 101	387	$\beta$ -Lactamase	AraC-type protein
GL33	1 101	387	$\beta$ -Lactamase	AraC-type protein
PDO30	1 221	421	Dihydrolipoamide acyltransferase	Hypothetical protein

的被阻断序列与 *C. koseri* ATCC BAA-895 (GenBank: CP000822.1)具有同源性, 突变位点分别为 *lac I* (CKO\_02824)基因的 211、146、146、339、377、295、461、319、296、848、613、831、653、237、561 和 600 bp 处。*lac I* (CKO\_02824)基因同向下游基因为 *lac Z* (CKO\_02825)基因。经分析, 在 3 个文库中都出现了突变位点在 *lac I* 的突变菌株, 这是由于弗氏柠檬酸菌有 *lac I* 操纵子, 文库的筛选是筛选蓝色菌落, 因此筛到 *lac I* 突变是正常的。

## 2.5 突变子 1,3-丙二醇合成关键酶表达水平分析

从基因鉴定的结果来看,  $\beta$ -内酰胺酶的突变提高了甘油脱氢酶和甘油脱水酶的表达水平; 二氢硫辛酰胺基转移酶的突变提高了 1,3-丙二醇氧化还原酶的表达水平。为了进一步确定  $\beta$ -内酰胺酶的突变是否影响 1,3-丙二醇氧化还原酶的表达、二氢硫辛酰胺基转移酶的突变是否影响甘油脱氢酶和甘油脱水酶的表达, 本实验选取了突变子 GL(2)3 和 PDO30, 去除了其原有的报告基因质粒, 重新导入了相对应关键酶的质粒并测定了其  $\beta$ -内酰胺酶的酶活, 以此来确定突变位点对关键酶表达水平的影响。

结果如图 4 所示, 突变子 PDO30 重新导入质粒 pYY-4 和 pYY-6 后, 其酶活分别为 297.2 U/mL 和 236.5 U/mL, 对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-5 的酶活为 137.4 U/mL, 突变子 PDO30 的酶活为 3 783.1 U/mL, 因此二氢硫辛酰胺基转移酶的突变

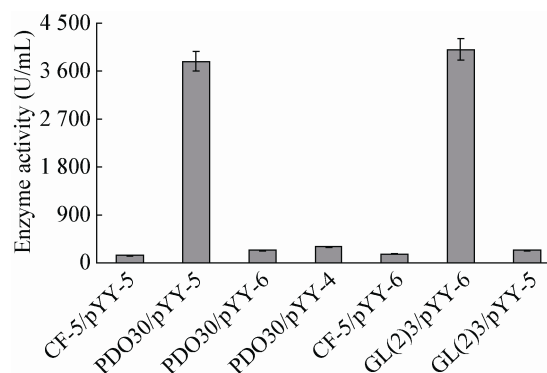


图 4 突变子关键酶表达分析

Figure 4 The expression analysis of key enzymes of mutants

不能影响甘油脱氢酶和甘油脱水酶的表达; 突变子 GL(2)3 重新导入质粒 pYY-5 后, 其酶活为 234.6 U/mL, 对照菌株 *C. freundii* CF-5/pYY-6 的酶活为 168.1 U/mL, 突变子 GL(2)3 的酶活为 4 006.6 U/mL, 因此  $\beta$ -内酰胺酶的突变也不能影响 1,3-丙二醇氧化还原酶的表达。从代谢的角度看, 代谢途径中部分关键酶活的提高对其最终发酵产量的提高影响不大, 因为还可能存在其他限速步骤, 这与本实验中部分关键酶活提高而最终发酵产量没有明显提高的事实相符合。

## 3 讨论

本实验应用转座子突变技术, 研究了弗氏柠檬酸菌株中合成 1,3-丙二醇的代谢过程, 通过利用构建的含有关键酶启动子的报告基因, 对突变株文库进行了筛选, 发现了两个影响 1,3-丙二醇代谢过程

中关键酶表达的调控基因。

首先,  $\beta$ -内酰胺酶基因的插入突变导致甘油脱水酶、甘油脱氢酶转录水平的提高,  $\beta$ -内酰胺酶是涉及菌株耐药的一类水解酶, 对其调控其他次级代谢途径的关键酶的研究未见任何报道。经分析,  $\beta$ -内酰胺酶基因的同向下游基因为一编码 AraC 家族蛋白的基因, AraC 家族蛋白编码区距离插入位点 714 bp。研究表明: AraC 家族是细菌中广泛存在的一类转录调节蛋白, 大部分属于正调控蛋白, 但也有部分属于负调控蛋白<sup>[27-28]</sup>。它们的生物学功能主要涉及碳代谢(Carbon metabolism)、压力反应(Stress response)和毒性(Virulence)<sup>[24]</sup>。本实验初步推断可能由于插入位点影响了 AraC 家族蛋白基因上游启动子功能, 导致该调节基因无法正常转录, 而该基因编码的 AraC 家族蛋白可能对于 1,3-丙二醇代谢过程中关键酶表达属于负调控, 因此,  $\beta$ -内酰胺酶突变株的甘油脱水酶、甘油脱氢酶的转录水平会提高。

其次, 二氢硫辛酰胺基转移酶基因的插入突变导致 1,3-丙二醇氧化还原酶转录水平的提高。研究表明: 二氢硫辛酰胺基转移酶是支链 $\alpha$ -酮酸脱氢酶 BCKAD 复合体的重要组成<sup>[29]</sup>。支链 $\alpha$ -酮酸脱氢酶 BCKAD 复合体是三羧酸循环的重要功能酶<sup>[30]</sup>, 它是由 3 个催化单元组成的:  $\alpha$ -酮酸脱氢酶(E1)、二氢硫辛酰胺基转移酶(E2)和二氢硫辛酰胺基脱氢酶(E3)<sup>[31]</sup>。其中 E2 催化羟乙基氧化成乙酰基, 同时转移给硫辛酰胺, 再转移给辅酶 A 生成乙酰 CoA。Yu 等<sup>[30]</sup>发现, E2 基因突变能改变碳代谢流的分配, 导致大部分 TCA 循环的中间代谢物积累性提高。我们推测, 可能由于碳代谢流的改变或是 TCA 循环过程中的某些中间代谢物的积累, 影响了相应突变菌株的 1,3-丙二醇的代谢反应, 使得 1,3-丙二醇氧化还原酶的转录水平得以提高。

突变菌株 GSR7、GSR56、GL1、GL(2)3 和 GL33 的被阻断序列均与 *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (GenBank 登录号: CP000822.1)同源, 并

且转座子插入位点相同, 在编码  $\beta$ -内酰胺酶 (CKO\_02592)基因的第 387 bp 处。但是在初步发酵中, 这些突变子合成 1,3-丙二醇的水平存在一定差别(图 3), 这可能与发酵条件没有优化相关。另外, GSR56 发酵水平最低, 也不排除在其基因组内存在其他自发突变的位点, 需要进一步实验证实。

本研究通过构建转座子突变文库, 筛选得到了影响 1,3-丙二醇代谢过程中关键酶表达水平的基因, 并初步验证了它们在 1,3-丙二醇代谢过程中的作用, 为构建 1,3-丙二醇工程菌株奠定了理论基础。

## 参考文献

- [1] Zeng AP, Biehl H. Bulk-chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2002, 74: 229-259
- [2] Li Q, Huang YN, Li ZM, et al. Co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2014, 14(1): 133-138 (in Chinese)  
李清, 黄艳娜, 李志敏, 等. 重组肺炎克雷伯菌发酵联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇[J]. *过程工程学报*, 2014, 14(1): 133-138
- [3] Abbad-Andaloussi S, Guedon E, Spiesser E, et al. Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 22(4): 311-314
- [4] Wang F, Deng WY, Yang ZQ, et al. Advances on the key enzymes of microbial production of 1,3-propanediol[J]. *Biotechnology*, 2013, 23(1): 93-96 (in Chinese)  
王飞, 邓文颖, 杨泽茜, 等. 1,3-丙二醇生物法生产中关键酶的研究进展[J]. *生物技术*, 2013, 23(1): 93-96
- [5] Yang D, Li C, Du CY, et al. High yield strategy for production of 1,3-propanediol by fermentation method[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2002, 10(20): 15-18 (in Chinese)  
杨东, 李春, 杜晨宇, 等. 发酵法生产 1,3-丙二醇的高产策略[J]. *精细与专用化学品*, 2002, 10(20): 15-18
- [6] Xia FF, Jin P, Wang LM, et al. Recent progress of metabolic regulation for glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2009, 26(10): 1-4 (in Chinese)  
夏峰峰, 金平, 王领民, 等. *Klebsiella pneumoniae* 甘油发酵代谢调控研究进展[J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(10): 1-4
- [7] Tian PF, Tan TW. Progress in metabolism and crucial enzymes of glycerol conversion to 1,3-propanediol[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(2): 201-205 (in Chinese)  
田平芳, 谭天伟. 甘油歧化为 1,3-丙二醇的代谢及关键酶研究进展[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(2): 201-205
- [8] Xu MJ, Yang TW, Rao ZM, et al. Expression, purification and enzymatic characterization of *Klebsiella* sp. glycerol dehydrogenase in *E. coli*[J]. *China Biotechnology*, 2008, 28(12): 30-35 (in Chinese)  
徐美娟, 杨套伟, 饶志明, 等. 克雷伯氏菌甘油脱氢酶 *dhaD* 的克隆表达, 纯化及酶学性质研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 30-35
- [9] Macis L, Daniel R, Gottschalk G. Properties and sequence of the coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium*



- pasteurianum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 164(1): 21-28
- [10] Wang BG, Liu M, Du CY, et al. Recent developments in microbial metabolic engineering for the production of 1,3-propanediol[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(1): 144-149 (in Chinese)  
王宝光, 刘铭, 杜晨宇, 等. 微生物法生产 1,3-丙二醇过程的代谢工程研究进展[J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 144-149
- [11] Sun B, Liu ZM, You S. Recent progress of producing 1,3-propanediol[J]. Letters in Biotechnology, 2008, 19(5): 777-780 (in Chinese)  
孙博, 刘志敏, 游松. 1,3-丙二醇生产的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 777-780
- [12] Seifert C, Bowien S, Gottschalk G, et al. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(8): 2369-2378
- [13] Johnson EA, Levine RL, Lin EC. Inactivation of glycerol dehydrogenase of *Klebsiella pneumoniae* and the role of divalent cations[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 164(1): 479-483
- [14] Malaoui H, Marczak R. Influence of glucose on glycerol metabolism by wild-type and mutant strains of *Clostridium butyricum* E5 grown in chemostat culture[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(2): 226-233
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [16] Totten PA, Lory S. Characterization of the type A flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(12): 7188-7199
- [17] Brandsma M, Wang X, Diao H, et al. A proficient approach to the production of therapeutic glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in transgenic plants[J]. The Open Biotechnology Journal, 2009, 3: 57-66
- [18] Yu Y, Shi LT, Guo WY, et al. Microbial production of 1,3-propanediol by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain CF-5[J]. Advanced Materials Research, 2014, 884: 459-464
- [19] Jin Y, Yang H, Qiao M, et al. MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(2): 399-410
- [20] Kulasekara HD, Ventre I, Kulasekara BR, et al. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(2): 368-380
- [21] Hidalgo AA, Trombert AN, Castro-Alonso JC, et al. Insertions of mini-Tn10 transposon T-POP in *Salmonella enterica* sv. typhi[J]. Genetics, 2004, 167(3): 1069-1077
- [22] Yang HJ, Li CM, Wei SD, et al. Characterization of *pcr2* gene of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 779-784 (in Chinese)  
杨洪江, 李明春, 魏东盛, 等. 铜绿假单胞菌 *pcr2*基因功能的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 779-784
- [23] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 1972: 352-355
- [24] Li FP, Wu BD, Ma ZZ, et al. Progress of chromosome walking by PCR amplification techniques[J]. China Biotechnology, 2010, 30(12): 87-94 (in Chinese)  
李付鹏, 伍宝荣, 马朝芝, 等. 基于 PCR 的染色体步移技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(12): 87-94
- [25] Liang CZ, Zhang R, Sun GQ, et al. Cloning of stress-related transcription factors gene from cotton by optimized TAIL-PCR[J]. Cotton Science, 2010, 22(3): 195-201
- [26] Wang X, Sa N, Yang JG, et al. Two methods for eliminating recombinant plasmids in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2010, 37(6): 112-115 (in Chinese)  
王熙, 萨娜, 杨建国, 等. 两种消除 *Klebsiella pneumoniae* 重组质粒的方法[J]. 北京化工大学学报, 2010, 37(6): 112-115
- [27] Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, et al. AraC/XylS family of transcriptional regulators[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 393-410
- [28] Tobes R, Ramos JL. AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 318-321
- [29] Gu CH, Cui BY, Guan PY. Application of proteomes in the research of brucellosis[J]. Disease Surveillance, 2009, 5: 373-378 (in Chinese)  
顾超慧, 崔步云, 关平原. 蛋白质组学在布鲁氏菌病研究中的应用[J]. 疾病监测, 2009, 5: 373-378
- [30] Yu H, Du X, Zhang F, et al. A mutation in the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex in *Arabidopsis* reduces plant organ size and enhances the accumulation of amino acids and intermediate products of the TCA cycle[J]. Planta, 2012, 236(2): 387-399
- [31] Luethy MH, Miernyk JA, Randall DD. The mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex: nucleotide and deduced amino-acid sequences of a cDNA encoding the *Arabidopsis thaliana* E1  $\alpha$ -subunit[J]. Gene, 1995, 164(2): 251-254