

一步法生产 1,5-戊二胺谷氨酸棒杆菌 基因工程菌的构建

牛涛 黎明* 张俊环 宋馨宇 张建中

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

摘要 1,5-戊二胺是一种重要的化工原料,发酵法生产 1,5-戊二胺是一条新颖且具有潜在竞争力的生产途径。以蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*) AS1.1009 基因组为模板,通过 PCR 扩增,得到大小约为 2.2 kb 的赖氨酸脱羧酶基因 *ldc*。以大肠杆菌(*Escherichia coli*)/谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)穿梭质粒 pXMJ19 为载体,将扩增得到的目的基因片段克隆至谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂,获得重组菌株 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc*。在摇瓶发酵水平上,通过 IPTG 诱导 *ldc* 基因的表达,并采用反相高效液相色谱方法测定了发酵液中 1,5-戊二胺的含量,结果显示,经 36 h 发酵,工程菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 的 1,5-戊二胺产量为 0.96 g/L。

关键词 赖氨酸脱羧酶 谷氨酸棒杆菌 1,5-戊二胺

中图分类号 Q785 Q786

1,5-戊二胺,即尸胺是生物体内广泛存在的具有生物活性的含氮碱,为蛋白质腐败时赖氨酸在脱羧酶作用下发生脱羧反应时生成。在农业上,产物 1,5-戊二胺可用于调控植物衰老过程、促进雌雄蕊的发育,改善植物果实发育,提高果实产量^[1,2];在医学上,它也可作为一种有效治疗痢疾的药物^[3];在工业上,将 1,5-戊二胺与二元酸进行聚合反应可合成优质高分子材料——新型尼龙^[4]。此外,1,5-戊二胺是微生物细胞内调节铁离子浓度的“铁亲和系统”的主要组成成分^[5];1,5-戊二胺在关闭孔蛋白通道方面也起着重要的作用^[6];而且它还是反刍兽新月单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)、嗜碱性韦荣球菌(*Veillonella alcalescens*)、小韦荣球菌(*V. parvula*)、和解脂厌氧弧菌(*Anaerovibrio lipolytica*)等一些严格厌氧的格兰氏阴性菌的肽聚糖的组成成分^[7-9]。

自 20 世纪 30 年代,杜邦公司发明出尼龙以来,尼龙就以其优异的力学性能,良好的耐磨性和自润滑性,较好的耐腐蚀性等优点被广泛应用于航空航天,汽车

部件、机械零部件、电子电器、包装材料、胶粘剂及化妆品等领域。每年全世界大约生产 1 200 000 吨尼龙,其中尼龙-6 和尼龙-66 约占 90%。尼龙 66 是由己二胺和己二酸 1:1 聚合生成。1,5-戊二胺是赖氨酸脱羧的产物,与己二胺互为同系物,在结构上与己二胺非常相似,可以替代由石油制备的己二胺,已有技术可以将尸胺精炼后和己二酸共聚合成具有实用性的尼龙-56,尼龙-56 是一种耐高温的新型塑料^[4]。

1,5-戊二胺化学合成法采用以不可再生的战略石油作为原料,环境污染严重,无法实现可持续发展。利用生物法转化可再生资源来生产 1,5-戊二胺,具有污染小,环境友好,可持续发展等优点,如果我们能成功开发出利用微生物转化可再生资源来生产 1,5-戊二胺的方法,这无疑会在缓解能源危机和遏制全球气候变暖等方面做出重要贡献。生物法制备 1,5-戊二胺在国外也正处于起步阶段^[10-11]。国内只有蒋丽丽等^[12]利用固定化能产赖氨酸脱羧酶的蜂房哈夫尼菌细胞来制备 1,5-戊二胺的报道。然而蜂房哈夫尼菌不能积累赖氨酸,需要外加赖氨酸作为酶的反应底物,故仍无法解决原料成本过高的问题。因此构建以廉价的葡萄糖为底

收稿日期:2010-03-24 修回日期:2010-05-13

* 通讯作者,电子信箱:liming 09@tust.edu.cn

物直接生产 1,5-戊二胺的基因工程菌成为研究的热点。本课题将克隆得到的蜂房哈夫尼菌的赖氨酸脱羧酶基因连入表达载体 pXMJ19 得到重组质粒 pXMJ19-*ldc*。用电转化方法将重组质粒 pXMJ19-*ldc* 转入一能产赖氨酸的谷氨酸棒杆菌体内,使赖氨酸直接在体内脱羧生成 1,5-戊二胺。此课题在实验室水平上初步探讨了用转基因工程菌生产 1,5-戊二胺的方法,为今后我国拥有自主知识产权的 1,5-戊二胺工业化生产技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei* AS1.1009),购自中国科学院微生物研究所。*C. glutamicum* TK26₀₅₁₂、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM110、大肠杆菌/谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pXMJ19 均由本实验室保存。质粒 pGEM[®]-T Easy 购自 Promega 公司。

1.2 培养基、酶及试剂

大肠杆菌在 LB 培养基中培养,谷氨酸棒杆菌种子培养基及摇瓶发酵培养基的配制参照文献[13]。Taq DNA 聚合酶、PCR 其它试剂、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、X-gal、IPTG 均购自大连宝生物工程公司;低熔点琼脂糖回收试剂盒、氯霉素(Cm)、氨苄青霉素(Amp)购自上海生工生物工程技术有限公司;1,5-戊二胺衍生化试剂 2,4-二硝基氟苯为 Alpha 公司产品;高效液相色谱中使用的甲醇和乙腈等为国产的色谱纯溶剂;其它试剂为国产或进口的分析纯产品。

1.3 *Hafnia alvei* 基因组及质粒的提取

Hafnia alvei 基因组的提取参照文献[14],大肠杆菌质粒的提取参考文献[15],谷氨酸棒杆菌质粒的提取参考文献[16]。

1.4 *Ldc* 基因的 PCR 扩增

根据 Genbank 中 *Hafnia alvei* 赖氨酸脱羧酶基因 *ldc*(序列号:X03774)上下游序列,设计 PCR 引物,并在两引物 5'端各引入一个酶切位点,以便于目的基因片段与质粒载体的定向克隆。P1: 5'-CCAAGCTTAAAGGAGGCGCATGAATATCATTGCCATCATGAACG-3';P2:5'-CGGGATCCTTATGACTTCTTCGCGC TGAT-3'。为增强转录,用高表达基因 RBS 共有序列(粗体,与 16SrRNA 的 mRNA 结合位点相互互补^[17])代替 *ldc* 基因本身的 RBS 位点,此外 P1 引物带有一个 *Hind* III 酶切位点(下划线),P2 引物带有一个 *Bam* H I

酶切位点(下划线)。DNA 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。

PCR 采用 50 μ l 体系:ddH₂O 37 μ l,10 \times buffer 5 μ l,dNTP 5 μ l,引物 P1、P2 各 1 μ l,基因组模板 0.5 μ l,Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l。具体反应条件为:94 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C,45 s,53 $^{\circ}$ C,45 s,72 $^{\circ}$ C,90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C,10 min。

1.5 克隆载体 pGEM-T-*ldc* 的构建与鉴定

PCR 反应产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测,切下目的条带。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。与载体 pGEM[®]-T Easy 进行连接,构建重组质粒 pGEM-T-*ldc*。具体方法按照该载体试剂盒说明书进行。然后将重组质粒转化至 *E. coli* DH5 α 宿主菌中。在含 IPTG (24 mg/ml) 和 X-gal (20 mg/ml) 的 Amp (100 μ g/ml) 的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。利用蓝白斑筛选,随机挑取白色菌落提取质粒酶切验证,将酶切验证正确的重组质粒送往上海生工进行测序,并对测序结果进行分析。

1.6 重组质粒 pXMJ19-*ldc* 的构建与鉴定

重组质粒 pGEM-T-*ldc* 和 pXMJ19 分别经 *Hind* III 和 *Bam* H I 37 $^{\circ}$ C 酶解 4 h,用 DNA 回收试剂盒回收所需片段。将回收的目的片段和载体质粒连接,构建表达载体 pXMJ19-*ldc*。*C. glutamicum* 具有非常强的限制系统,能有效降解来自不同菌种的异源 DNA 或被异源甲基化修饰的 DNA,使得普通 *E. coli* 的外源 DNA 转化方法对 *C. glutamicum* 的转化效率极低。为了提高转化效率我们用大肠杆菌甲基化缺陷型菌种 JM110(*dam*⁻*dcm*⁻)作为扩增重组质粒的宿主菌。将构建好的表达载体 pXMJ19-*ldc* 转化至 *E. coli* JM110 受体菌中,并涂布到含 20 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,从平板上筛选阳性菌落,接种于含 20 μ g/ml 氯霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。从菌液中提取质粒,用 *Hind* III 和 *Bam* H I 37 $^{\circ}$ C 酶解 4 h,对酶解产物进行电泳分析。

1.7 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 工程菌的构建与鉴定

C. glutamicum TK26₀₅₁₂ 感受态细胞制备和电击转化参照 van der Rest 等^[18]的方法。电转化采用 BIORAD GenePulser Xcell 电转仪,0.1 cm 转化杯,转化条件为:电压 1.8 kV,电阻 200 Ω ,电容 25 μ F。将上述重组质粒 pXMJ19-*ldc* 电转入 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ 中,并涂布到含 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂平板上,

37℃培养过夜,从平板上筛选阳性菌落,接种于含10 μg/ml 氯霉素的LB液体培养基中,30℃振荡过夜。从菌液中提取质粒,用HindⅢ和BamHⅠ37℃酶解4 h,对酶解产物进行电泳分析。将分析结果正确的转化子命名为*C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc*。

1.8 重组菌产1,5-戊二胺摇瓶发酵培养

1.8.1 种子培养 从氯霉素平板上挑取单菌落接种至液体种子培养基(加入终浓度10 μg/ml的氯霉素),30℃,200 r/min,过夜培养。

1.8.2 摇瓶培养 按1%接种量将种子培养液转接至终体积为30ml摇瓶培养基中(加入终浓度10 μg/ml的氯霉素),30℃,200 r/min,连续培养36 h。

1.8.3 诱导表达 由于本实验选用的载体为IPTG诱导型表达质粒,重组菌在摇瓶培养至OD₆₀₀约为0.6~0.8左右时,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG,诱导重组质粒表达赖氨酸脱羧酶。

1.9 表达产物SDS-PAGE分析

鉴定为阳性的*C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc*重组菌培养至OD₆₀₀约为0.6~0.8左右时,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG继续诱导培养一定时间后,5000r/min,室温离心5 min收集菌体并重悬于适量磷酸缓冲液中,冰浴中超声处理10min后,21000r/min,4℃离心10min收集上清。取10 μl上清,加入等量的上样缓冲液,混匀后煮沸5 min,进行SDS-PAGE分析。浓缩胶浓度为8%,分离胶浓度为12%,电泳结束后用考马斯亮蓝R250染色。

1.10 相关产物分析

赖氨酸的含量通过茚三酮比色法进行测定^[19]。1,5-戊二胺的含量用RP-HPLC测定,具体按照参考文献[20]的方法进行分析。

1.11 酶活分析

发酵液4℃,10000r/min离心10 min。细胞沉淀用50 mmol/L的醋酸盐缓冲液(pH 6.0)洗一次,细胞悬液在冰上超声处理30 min(停9 s,工作9 s)。4℃,10000r/min离心10 min除去细胞碎片,上清液作为粗酶液用于酶活分析。粗酶液蛋白质含量采用Bradford法^[21]测定,以BSA为标准蛋白。通过HPLC测定产物1,5-戊二胺的量来分析赖氨酸脱羧酶的活性。反应混合液包括粗酶液、70 mmol/L的L-lysine·HCl和1 μl的磷酸吡哆醛,反应在37℃进行。反应1 h后通过添加等体积的1 mol/L K₂CO₃来终止反应。37℃ 1min催化生成1 μmol 1,5-戊二胺所需的酶量定义为1个酶活

单位。

2 结果

2.1 *Ldc* 基因的扩增与测序

以提取的*Hafnia alvei*基因组为模板,P1、P2为引物,用Taq DNA聚合酶PCR扩增赖氨酸脱羧酶*ldc*,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳验证,结果表明扩增出的片段大小与预计的大小一致,结果见图1。

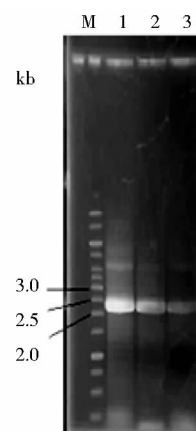


图1 PCR产物电泳图

Fig.1 PCR amplification

M:DNA marker, 1, 2, 3: PCR product

2.2 赖氨酸脱羧酶基因*ldc*序列分析

将该片段克隆至测序载体pGEM-T Easy Vector后送交测序。将PCR产物测序结果与Genbank中所提交的*ldc*原序列(序列号:X03774)进行比对,结果证实两者的相似性为99.86%。有两处发生碱基突变,439位的G变为T,相对应的氨基酸由缬氨酸变为苯丙氨酸,1103位的T变为C,相对应的氨基酸由亮氨酸变为脯氨酸。

经ExPASy数据库分析,本实验中得到的赖氨酸脱羧酶基因所编码的蛋白等电点(pI)为6.00,共编码739个氨基酸,相对分子质量83kDa。

2.3 重组质粒pXMJ19-*ldc*的构建及鉴定

用HindⅢ和BamHⅠ分别对穿梭质粒pXMJ19和经测序正确的pGEM-T-*ldc*质粒进行双酶切,用DNA回收试剂盒回收所需片段,在T4 DNA连接酶作用下,两片段通过互补的粘性末端定向连接。连接反应液转化*E. coli* JM110,并通过氯霉素抗性平板筛选出转化子。重组质粒的鉴定结果见图2。单酶切结果为一条大小约为8.8 kb的片段(*ldc* + pXMJ19),双酶切为大小约

2.23kb (两端带有引物的 *ldc*) 和 6.57 kb (线性 pXMJ19) 的两条片段。酶切结果与理论预期结果相符,表明重组质粒 pXMJ19-*ldc* 已经构建成功。重组质粒图谱见图 3。

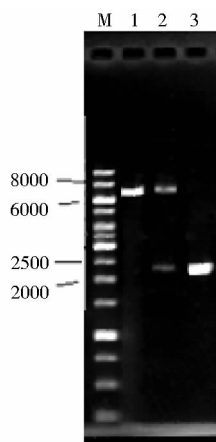


图 2 重组质粒 pXMJ19-*ldc* 的酶切验证

Fig. 2 Restriction confirmation of recombinant plasmid pXMJ19-*ldc*

M: 1 kDa DNA marker; 1: pXMJ19 digested with *Hind*III and *Bam*HI; 2: pXMJ19-*ldc* digested with *Hind*III and *Bam*HI; 3: *ldc*

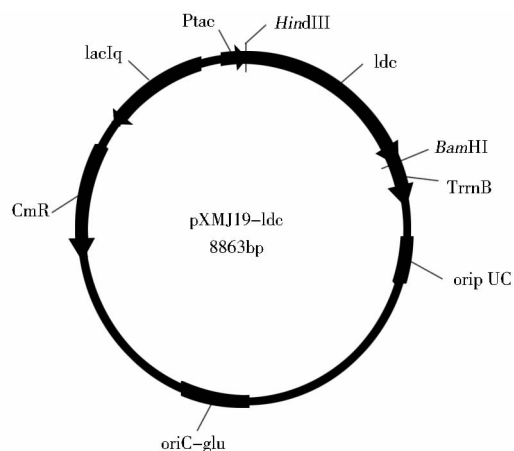


图 3 重组质粒 pXMJ19-*ldc* 图谱

Fig. 3 Physical map of *E. coli*/*C. glutamicum* shuttle vector pXMJ19

It contained *ldc* insert: genes, *tac* promoter, *rnnB* terminator and *ldc* insert are represented by black arrows indicating the direction of transcription; *oriP*UC (as a part of *E. coli* plasmid Puc19) and *oriC*. *glutamicum* (as a part of *C. glutamicum* plasmid pBL1) are shown as black boxes

2.4 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 工程菌的构建与鉴定

重组质粒 pXMJ19-*ldc* 经电击转化 *C. glutamicu*

TK26₀₅₁₂后,通过浓度为 10 μ g/ml 的氯霉素抗性平板筛选转化子。阳性菌落,接种于含 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按 1.3 节的方法从菌液中提取质粒,用 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶解并电泳。电泳结果与图 2 一致,表明重组质粒 pXMJ19-*ldc* 转化 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ 成功。

2.5 SDS-PAGE 检测

以不含任何质粒的 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ 和未经 IPTG 诱导的重组菌为对照,鉴定为阳性的 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 重组菌经 IPTG 诱导培养 2、4 和 6 h 后,收集菌体,破碎细胞后进行 SDS-PAGE 检测。从图 4 可以看出经 IPTG 诱导后,重组菌有分子量约为 83 kDa 的蛋白表达带。这表明赖氨酸脱羧酶在谷氨酸棒杆菌中得到了表达。

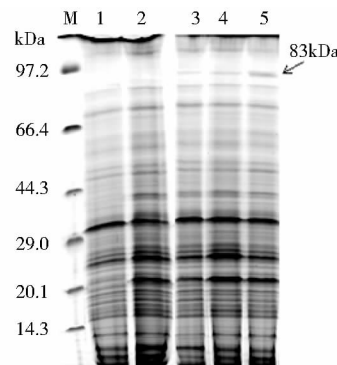


图 4 重组菌全细胞蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells

M: Protein molecular weight markers; 1: *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ (no plasmid) after 2 h induction; 2: *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* before induction; 3: *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* after 2 h induction; 4: *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* after 4 h induction; 5: *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* after 6 h induction

2.6 发酵液样品 1,5-戊二胺、赖氨酸产量分析

原始菌和工程菌分别经 36 h 发酵,测定其 1,5-戊二胺和赖氨酸产量。原始菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ 中由于没有赖氨酸脱羧酶,产生的赖氨酸不能脱羧生成 1,5-戊二胺,所以原始菌中没有检测到 1,5-戊二胺。原始菌赖氨酸的最大产量为 2.93 g/L。工程菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 在诱导表达的赖氨酸脱羧酶的催化作用下,菌体自身合成的赖氨酸不断转化成 1,5-戊二胺。工程菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* 的 1,5-戊二胺和赖氨酸产量分别为 0.96 g/L、1.61 g/L (图 5)。

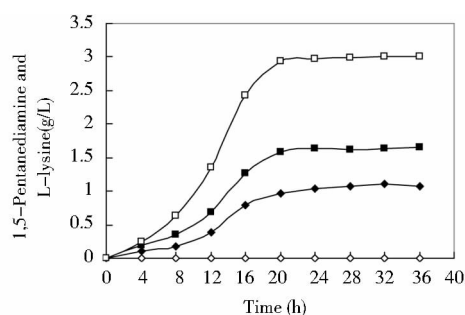


图5 重组菌和原始菌发酵液中1,5-戊二胺和赖氨酸产量的比较

Fig. 5 The comparison of the concentration of 1,5-pentanediamine and lysine between *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-ldc and *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂

◆: 1,5-pentanediamine concentration of *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-ldc; ■: L-lysine concentration of *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-ldc; □: 1,5-pentanediamine concentration of *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂; ◇: L-lysine concentration of *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂

2.7 酶活分析

通过 HPLC 测定 1,5-戊二胺计算出当葡萄糖消耗完时(24~36 h)赖氨酸脱羧酶的酶活为 45U/mg 蛋白(总酶活为 1800 U)。按理说,这样的酶活完全可以在几分钟内将所有的赖氨酸都转化为 1,5-戊二胺,但是发酵液中仍存在赖氨酸,这说明工程菌体内的赖氨酸没有完全转化为 1,5-戊二胺。我们分析问题主要出在 1,5-戊二胺的排泄上,1,5-戊二胺的 pKa 值为 9.13,因此在谷氨酸棒杆菌中 1,5-戊二胺主要以离子形式存在,然而离子形式的 1,5-戊二胺很难依靠被动运输作用通过疏水的细胞膜。我们分析由于谷氨酸棒杆菌原本不产 1,5-戊二胺,因此其本身没有进化出一套能有效排泄 1,5-戊二胺的体系,所以谷氨酸棒杆菌生成的 1,5-戊二胺很难排出体外,导致体内积聚了高浓度的 1,5-戊二胺。因为 1,5-戊二胺是赖氨酸脱羧酶的竞争性抑制剂^[22],体内积聚的高浓度 1,5-戊二胺通过竞争性抑制作用降低了赖氨酸脱羧酶的活性,这导致了工程菌体内生成的赖氨酸没有被全部转化成 1,5-戊二胺。

3 讨论

谷氨酸棒杆菌合成赖氨酸的途径是从葡萄糖开始,经糖酵解途径进入三羧酸循环,由该循环中间物草

酰乙酸经复杂的反应,最后转变为赖氨酸。然而棒杆菌属本身不含编码赖氨酸脱羧酶的基因无法将赖氨酸脱羧生成 1,5-戊二胺。基于谷氨酸棒杆菌本身具有合成赖氨酸的能力,本研究以其作为宿主菌进行 *ldc* 基因的过量表达,利用谷氨酸棒杆菌发酵过程产生的赖氨酸为底物,在 *ldc* 基因表达的赖氨酸脱羧酶的催化下,将赖氨酸脱羧生成 1,5-戊二胺,理论上可以节约添加赖氨酸的成本。

实验结果显示我们构建的工程菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-ldc 能部分地将赖氨酸转化为 1,5-戊二胺,这表明赖氨酸脱羧酶基因 *ldc* 能在谷氨酸棒杆菌中表达。经 36 h 发酵,工程菌 *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-ldc 的 1,5-戊二胺产量为 0.96 g/L。由于本实验所采用的菌株并非生产用的赖氨酸高产菌,所以 1,5-戊二胺整体产量偏低,离大规模生产还有差距。导致产量低的原因主要有:(1) *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ 赖氨酸产量本身就比较低;(2) 由于 1,5-戊二胺排泄受阻导致菌体内 1,5-戊二胺的浓度升高,并通过竞争性抑制作用降低了赖氨酸脱羧酶的活性。

后续实验中将从以下方面考虑增加 1,5-戊二胺的产量:(1)通过传统诱变或基因工程手段提高谷氨酸棒杆菌生产赖氨酸的能力,通过提高底物浓度以减弱产物 1,5-戊二胺对赖氨酸脱羧酶的竞争性抑制作用;(2)更换载体以提高赖氨酸脱羧酶基因的拷贝数或用强启动子增强赖氨酸脱羧酶基因的转录水平;(3)增加 1,5-戊二胺的排泄或筛选解除产物反馈抑制突变株以解除 1,5-戊二胺对赖氨酸脱羧酶的反馈抑制。

参考文献

- [1] 陈学好,于杰,李伶俐. 高等植物开花结实的多胺研究进展. 植物学通报, 2003, 20(1): 36-42.
Chen X H, Yu J, Li L L. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20(1): 36-42.
- [2] 王晓云,邹琦. 多胺与植物衰老关系研究进展. 植物学通报, 2002, 19(1): 11-20.
Wang X Y, Zou Q, Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(1): 11-20.
- [3] Casalino M, Latella M C, Prosseda G, et al. Molecular evolution of the lysine decarboxylase-defective phenotype in *Shigella sonnei*. International Journal of Medical Microbiology. 2005, 294: 503-512.
- [4] Kiyohiko N, Shuichi E, Yukiko M. Enzymatic method for producing cadaverine dicarboxylate and its use for the production

- of nylon. Japan, 147 688, 2003-05-26.
- [5] Francisco J, Flores J, Rincón J F. Characterization of the iron-regulated desA promoter of *Streptomyces pilosus* as a system for controlled gene expression in actinomycetes. *Microb Cell Fact*. 2003, 71: 339-349.
- [6] Delavega A L, Delcour A H. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO*, 1995, 14(23): 6058-6065.
- [7] Hirao T, Sato M, Shirahata A. Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. *Bacteriol*, 2000, 182(4): 1154-1157.
- [8] Kamio Y, Itoh Y, Terawaki Y. Chemical structure of peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*; cadaverine links covalently to the D-glutamic acid residue of peptidoglycan. *Bacteriol*, 1981, 146(1): 49-53.
- [9] Kamio Y, Nakamura K. Putrescine and cadaverine are constituents of peptidoglycan in *Veillonella alcalescens* and *Veillonella parvula*. *Bacteriol*, 1987, 169(6): 2881-2884.
- [10] Takashi M, Hideki S, Masahiro H, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(9): 2130-2135.
- [11] Tateno T, Okada Y, Tsuchidate T, et al. Direct production of cadaverine from soluble starch using *Corynebacterium glutamicum* coexpressing α -amylase and lysine decarboxylase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82: 115-121.
- [12] 蒋丽丽, 刘均忠, 沈俞, 等. 用固定化-赖氨酸脱羧酶细胞制备 1,5-戊二胺. *精细化工*, 2007, 24(11): 1080-1084.
Jiang L L, Liu J Z, Shen Y, et al. *Fine Chem Ical*s, 2007, 24(11): 1080-1084.
- [13] Tateno T, Fukuda H, Kondo A. Production of L-lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α -amylase on its cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1213 - 1220.
- [14] 吴健胜. 赖氨酸脱羧酶对水稻白叶枯病菌有机酸毒素的解毒作用及其基因的克隆和表达研究及草酸解毒菌的初步研究. 南京: 南京农业大学, 2000.
- Wu J S. Cloning and expression of the gene encoding a lysine decarboxylase and activity of the enzyme in detoxifying organic acid toxin produced by *xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and a preliminary study on detoxification of oxalate toxin by a bacterial strain. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2000.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] Santamaria R, Gil J A, Mesas J M, et al. Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130: 2237-2246.
- [17] Amador E, Castro J M, Correia A, et al. Structure and organization of the rrnD operon of *Brevibacterium lactofermentum*; analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiol*, 1999, 145: 915-924.
- [18] van der Rest M E, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenetic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotech*, 1999, 52: 541-545.
- [19] 赵传孝, 韩绍英. 食品检验技术手册. 中国食品出版社, 1990. 696-697.
Zhao C X, Han S Y. *Technical Manual of Food Analysis*. Food Publishing Company of China, 1990. 696-697.
- [20] Tateno T, Fukuda H, Kondo A. Production of L-lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α -amylase on its cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 1213-1220.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [22] Donna L S, Elizabeth A B, Breck B, et al. Purification and physical properties on inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry*, 1974, 13: 662-676.

Construction of Recombinant *Corynebacterium glutamicum* Producing 1,5-Pentanediamine by One Step Method

NIU Tao LI Ming ZHANG Jun-huan SONG Xin-yu ZHANG Jian-zhong

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

Abstract 1,5-pentanediamine is one of the most important industrial chemicals for its highly desired properties and its wide applications as a key component of an emerging polymer business. Biological production of 1,5-pentanediamine has been a novel and competitive way. An about 2.2 kb fragment of *Hafnia alvei* lysine decarboxylase gene encoding lysine decarboxylase (LDC) was proliferated by polymerase chain reaction by using chromosomal DNA of *Hafnia alvei* as the template. The obtained *ldc* fragment was inserted into *E. coli*/*C. glutamicum* shuttle vector pXMJ19 to construct an expression plasmid pXMJ19-*ldc*. It was then introduced into *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂ via electrotransformation, and a recombinant *C. glutamicum* TK26₀₅₁₂/pXMJ19-*ldc* was obtained. The 1,5-pentanediamine in the broth was detected by HPLC when the culture in the shake flask was induced with 0.5 mmol/L IPTG. The results showed that after 36 h cultivation, the recombinant strain could produce 0.96 g/L 1,5-pentanediamine.

Key words Lysine decarboxylase *C. glutamicum* 1,5-pentanediamin