

# 谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环与谷氨酸合成 Glyoxylate Cycle is Required for the Overproduction of Glutamate but is not Essential for *Corynebacterium glutamicum* Growth on Glucose

余秉琦, 沈 微, 王正祥, 诸葛健\*

YU Bing-Qi, SHEN Wei, WANG Zheng-Xiang and ZHUGE Jian\*

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

**摘 要** 为阐明谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环与菌体的生长以及谷氨酸合成之间的关系, 以谷氨酸棒杆菌基因组测序用典型菌株 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 为出发菌株, 构建了乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株 *Corynebacterium glutamicum* WT $\Delta$ A。该菌株没有异柠檬酸裂解酶活性, 不能在以乙酸盐为唯一碳源的基本培养基上生长。与出发菌株 ATCC 13032 相比, WT $\Delta$ A 在以葡萄糖为唯一碳源的培养基上生长时不受影响, 说明谷氨酸棒杆菌并不需要乙醛酸循环途径提供菌体生长所需的能量和生物合成反应所需的中间产物。但是, 与出发菌株 ATCC 13032 相比, WT $\Delta$ A 的谷氨酸合成能力大幅下降。

**关键词** 谷氨酸棒杆菌, 乙醛酸循环, 异柠檬酸裂解酶, 谷氨酸

中图分类号 Q591 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0270-05

**Abstract** The glyoxylate cycle was hypothesized to be indispensable for glutamate overproduction in coryneform bacteria, for it was thought to fulfill anaplerotic functions and to supply energy during the growth phase. During glutamate overproduction phase, however, it has been noted that the high level of the cycle is detrimental to the glutamate production. In order to clarify the relationship between the glutamate production and the glyoxylate cycle, a chromosomal *aceA*-disrupted mutant of wild-type *C. glutamicum* ATCC 13032 was constructed. The isocitrate lyase (ICL) activity of the parental strain was 0.011u/mg of protein and reached 1.980u/mg of protein after acetate induction; the mutant strain WT $\Delta$ A, however, had no detectable ICL activity and was no longer able to grow on minimal medium with acetate as the sole carbon source. Compared with the wild-type *C. glutamicum* WT, the mutant strain WT $\Delta$ A, exhibited the same growth rate with glucose as the sole carbon source, indicating glyoxylate cycle is not required for its growth on glucose. On the contrary, the glutamate production in WT $\Delta$ A was severely impaired and more residual glucose was found in the fermentation broth at the end of fermentation with the mutant strain than with the wild-type strain. Further investigations into the relationship between the glutamate production and the glyoxylate cycle are under the way, which may help to elucidate the mechanism of glutamate overproduction.

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, glyoxylate cycle, isocitrate lyase, glutamate

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是 40 多年来世界氨基酸生产的主要菌株。最近 *Coryne-*

*bacterium glutamicum* ATCC 13032 的基因组测序工作已经完成<sup>[1]</sup>。该项工作的完成促进和方便了国内外

Received: August 11, 2004; Accepted: October 27, 2004.

\* Corresponding author. Tel: 86-510-5874341; E-mail: jianzhuge@hotmail.com

研究人员采用分子生物学的方法对棒杆菌做更深入的研究。

按照以往总结出的有关谷氨酸生产菌株的特点,乙醛酸循环为必需的代谢途径,这是因为以糖质原料发酵生产谷氨酸时,在谷氨酸发酵的菌体生长期,菌体需要它来提供部分能量和生物合成反应所需的中间产物,但同时指出,在菌体生长期后的谷氨酸合成期,为了大量生成和积累谷氨酸,最好封闭乙醛酸循环途径。这是因为如果三羧酸循环中的四碳二羧酸 100% 地由 CO<sub>2</sub> 固定反应供给,则糖酸转化率为 87.1%;如果四碳二羧酸 100% 地由乙醛酸循环供给,则糖酸转化率只有 54.4%<sup>[2-3]</sup>。此外,另有报道称用同位素标记的方法进行的代谢流分析表明

当谷氨酸棒杆菌在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基上生长时乙醛酸循环途径没有活性<sup>[4]</sup>。为阐明乙醛酸循环与菌体的生长以及谷氨酸合成之间的关系,我们以基因组测序用典型菌株 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 为出发菌株,采用基因敲除的方法获得乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株,然后通过比较突变株与出发菌株在生长和谷氨酸合成方面的异同,对乙醛酸循环与谷氨酸合成之间的关系做一个初步研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒:所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)/F'(traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15)</i>	Our lab
JM110	<i>dam dem thi hsdR17 supE44 leu rpsL1 lacY galK galT ara ionA thr tsxΔ(lac-proAB)/F'(traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15)</i>	Our lab
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032 WT	Type strain	CICC
ATCC 13032 WTΔA	<i>ΔaceA::Ωkm</i>	This work
Plasmids		
pUC18	Ap <sup>r</sup> , ori of ColE1	Our lab
pSKsymΩKm	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , ori of ColE1	Our lab
pA1	pUC18 carrying ATCC 13032 <i>ΔaceA</i>	This work
pAK	pUC18 carrying ATCC 13032 <i>ΔaceA::Ωkm</i>	This work

1.1.2 培养基:LB 培养基用于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的培养, LB 固体培养基添加 2% 琼脂,需要的时候,抗菌素按以下浓度添加:氨苄青霉素 100 μg/mL, 卡那霉素 50 μg/mL。用于谷氨酸棒杆菌生长曲线绘制的基本培养基:12.0g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 根据需要添加的碳源为 1.5% 葡萄糖, 1.5% 乙酸。谷氨酸发酵种子培养基:2.5% 工业葡萄糖, 0.25% 尿素, 2.5% 玉米浆, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 发酵培养基:5% 工业葡萄糖, 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2mg/L MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.3% 玉米浆, 5% CaCO<sub>3</sub>。

1.1.3 酶与试剂:限制酶、T4 DNA ligase、低熔点琼脂糖购于 TaKaRa 公司。PCR 所用试剂购于上海生物工程技术有限公司。引物合成由北京三

博远志生物技术有限责任公司完成。其它化学试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株 *Corynebacterium glutamicum* WTΔA 的构建:质粒和染色体 DNA 提取、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应、大肠杆菌的转化等常规技术的操作参照文献[5]进行。谷氨酸棒杆菌的电转化方法参照文献[6]进行。根据谷氨酸棒杆菌的异柠檬酸裂解酶基因 *aceA* 的序列设计两条引物:上游引物 P1: 5' CCCAAGCTTTGCGAAGCCAGAAGCTTTGC 3', 下游引物 P2: 5' CCGGAATTCTCTCATTGGTGGCTGGAC 3', 其中 P1 的 5' 端引入一 Hind III 酶切位点, P2 的 5' 端引入一 EcoR I 酶切位点。将扩增片段连入 pUC18 载体, 得到 pA1 质粒, 然后从位于 pA1 质粒上的 *aceA*

基因的 *Stu* I 限制酶位点将 pA1 质粒线性化,并插入经限制酶 *Sma* I 酶切的卡那抗性基因片段  $\Omega$ km,得到基因敲除质粒 pAK (Fig. 2)。将质粒 pAK 转化谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032,将在含卡那霉素的 LB 培养基上长出的单菌落分别转接到以葡萄糖和乙酸盐为唯一碳源的基本培养基上作对照培养,在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基上生长但是在以乙酸盐为唯一碳源的基本培养基上不生长的菌株为乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株。以突变株基因组 DNA 为模板,用上述引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增作为进一步的验证。

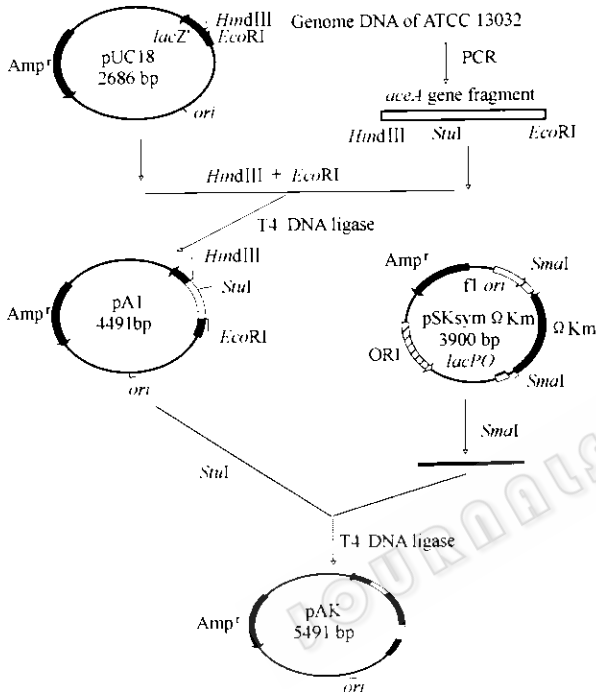


图1 异柠檬酸裂解酶基因 *aceA* 敲除质粒 pAK 的构建

Fig.1 Construction of *aceA* disruption plasmid pAK

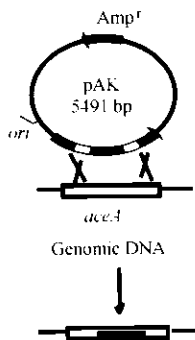


图2 基因 *aceA* 的敲除

Fig.2 *aceA* disruption

1.2.2 细胞生长曲线的绘制:将野生型菌株 *C. glutamicum* 13032 WT 和乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株 *C. glutamicum* WTΔA 分别接种在

装有含 1.5% 葡萄糖或 1.5% 乙酸的 25mL 基本培养基的 250mL 三角瓶中,并调整起始  $OD_{600}$  值为 1.5 左右;30℃, 200r/min 于摇床上进行摇瓶培养,24h 内定时测定菌液的  $OD_{600}$  值并绘制生长曲线。

1.2.3 *C. glutamicum* 13032 WT 和 *C. glutamicum* WTΔA 的摇瓶发酵及其葡萄糖和谷氨酸的测定:从新鲜的斜面培养基上接种至装有 25mL 种子培养基的 250mL 三角瓶,于 33℃, 200r/min 培养 10h,然后转接至装有 15mL 发酵培养基的 250mL 三角瓶中,并使它们的起始  $OD_{600}$  相同、为 5.0。于 33℃, 200r/min 摇瓶培养 24h,其间定期取样测定它们的  $OD_{600}$  值,残糖和谷氨酸含量。葡萄糖和谷氨酸测定采用山东省科学院生物研究所研制的 SBA-40B 型仪器。

1.2.4 粗酶液的制备:将 *C. glutamicum* 13032 WT 和 *C. glutamicum* WTΔA 接种于含 60mL 基本培养基的 500mL 三角瓶中,碳源分两种,即 1.5% 葡萄糖或 1.5% 乙酸钠,每种样品三瓶。培养至对数生长期,合并同种样品,收集细胞,用 20mL 浓度为 50mmol/L 的 Tris-HCl (pH7.6) 缓冲液洗涤 2 次,最后用 3mL 该缓冲液重悬,于 4℃ 超声波破碎 10min (工作时间),功率为 300W,工作 1s 间隔 3s,随后于 4℃, 10000r/min 离心 30min,上清液即为粗酶液。

1.2.5 细胞内异柠檬酸裂解酶 (ICL) 活性的测定:每 3mL 反应混合物中含有:① 50mmol/L MOPS (morpholinopropanesulfonic acid) 缓冲液 (pH7.5); ② 5mmol/L  $MgCl_2$ ; ③ 4mmol/L 盐酸苯胍; ④ 2mmol/L 异柠檬酸三钠; ⑤ 粗酶液。先将成分 ①、②、③和 ⑤混合并于 25℃ 保温,然后通过添加异柠檬酸三钠起始反应。于 324nm 监测产生的乙醛酸的盐酸苯胍衍生物 ( $\epsilon = 14.63cm^2 \mu mol^{-1}$ )。一个单位的酶活定义为每分钟催化产生  $1\mu mol$  的产物所需的酶量。

1.2.6 酶蛋白定量:粗酶液蛋白含量的测定采用 Bradford 法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

## 2 结果

### 2.1 乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株 *C. glutamicum* WTΔA 的构建

采用电转化法将构建的重组质粒 pAK 导入 ATCC 13032 WT 细胞。将在含卡那霉素的 LB 培养基上长出的单菌落转接至分别以葡萄糖和乙酸盐为唯一碳源的基本培养基上做对照培养。在以乙酸盐为唯一碳源的基本培养基上不长而在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基上生长的单菌落即为转化子

ATCC 13032 WT $\Delta$ A。为了做进一步的验证,以转化子的基因组 DNA 为模板,以 ATCC 13032 的基因组 DNA 为对照,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。用对照扩增出的条带应该是 1836bp 的 *aceA* 基因片段,而用转化子的基因组 DNA 为模板扩增出的条带应该是在 *aceA* 基因片段的内部插入了 1000bp  $\Omega$ Km 片段的共 2836bp 的片段,如图 3 所示。

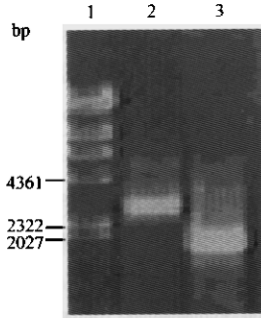


图 3 突变株 *C. glutamicum*  $\Delta$ A 的 PCR 验证

Fig. 3 PCR verification of *C. glutamicum*  $\Delta$ A

1:  $\lambda$ DNA-*Hind*III marker; 2: PCR/*C. glutamicum*  $\Delta$ A genomic DNA; 3: PCR/*C. glutamicum* WT genomic DNA

## 2.2 生长曲线的绘制

从图 4 可知,当 ATCC 13032 WT 野生型菌株和乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株 *Corynebacterium glutamicum* WT $\Delta$ A 在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基上生长时,它们的生长速度几乎相同,说明当以葡萄糖为碳源进行培养时谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 不需要乙醛酸循环为其提供生长所需的能量和代谢中间产物。当在以

乙酸为唯一碳源的基本培养基上培养时,WT $\Delta$ A 菌株由于缺乏乙醛酸循环途径而不能生长;WT 野生型菌株与以葡萄糖为碳源进行生长时比较,迟缓期延长约 15h。

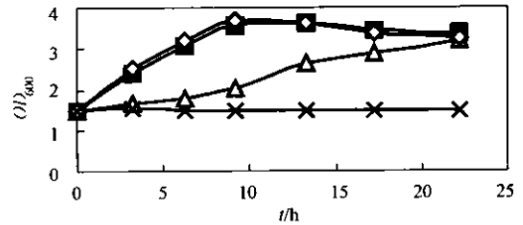


图 4 ATCC 13032 WT 野生型菌株和突变株 ATCC 13032 WT $\Delta$ A 分别在以葡萄糖和乙酸为唯一碳源的基本培养基上培养时的生长曲线

Fig. 4 Standard growth curves of *C. glutamicum* on minimal medium with glucose or acetate as sole carbon sources

■ WT/glucose;  $\triangle$  WT/acetate;  $\diamond$  WT $\Delta$ A/glucose;  $\times$  WT $\Delta$ A/acetate

## 2.3 野生型菌株 *C. glutamicum* 13032 WT 和乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌突变株 *C. glutamicum* WT $\Delta$ A 的谷氨酸合成

图 5 为谷氨酸发酵过程动态曲线。图 5(A)是菌体生长曲线,该图说明突变株 WT $\Delta$ A 与野生型菌株 WT 相比,生长情况几乎没有改变;图 5(B)是发酵过程中残糖变化的曲线,说明突变株与野生型菌株相比,耗糖速度变慢,而且发酵结束后它的残糖高于野生型菌株;图 5(C)是关于谷氨酸合成量的曲线,说明突变株的谷氨酸积累大幅下降。总之,从图 5 可知,谷氨酸棒杆菌的谷氨酸合成需要乙醛酸循环途径,但是其作用并非是维持菌体的生长。

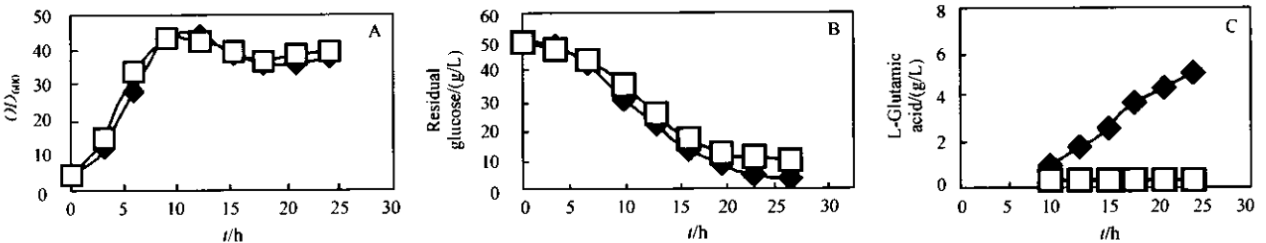


图 5 *C. glutamicum* 13032 WT 和突变株 *C. glutamicum* WT $\Delta$ A 的谷氨酸合成

Fig.5 L-Glutamate production of *C. glutamicum* 13032 WT and *C. glutamicum* WT $\Delta$ A

◆ *C. glutamicum* 13032 WT, □ *C. glutamicum* WT $\Delta$ A

## 2.4 异柠檬酸裂解酶 ICL 酶活测定

从表 2 可知异柠檬酸裂解酶基因被敲除的突变株 WT $\Delta$ A 没有异柠檬酸裂解酶活性。而野生型出发菌株 WT 生长在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基上时有微弱的异柠檬酸裂解酶活性。但是在以乙酸为唯一碳源的基本培养基上生长时由于受到乙酸盐的诱导作用而酶活大增。

## 3 讨论

自从上世纪 50 年代谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 被发现能过量合成谷氨酸以来,由于它所具有的重要经济价值而受到人们的大量研究。如今其它一些相关的菌种如 *Brevibacterium lactofermentum* 和 *Brevibacterium flavum* 也在分类上被归属于

表 2 异柠檬酸裂解酶 ICL 活性

Table 2 Specific activity of isocitrate lyase (ICL) in cell extracts of *C. glutamicum* strains grown on minimal medium of different carbon sources

<i>C. glutamicum</i> strain	Specific activity/(u/mg)	
	Glucose	Acetate
ATCC 13032 WT	0.011	1.980
ATCC 13032 WTΔA	0	0

*Corynebacterium glutamicum*<sup>[7]</sup>。尽管有许多有关谷氨酸棒杆菌的遗传和生理生化方面的知识被发现,但是,人们至今并不清楚谷氨酸棒杆菌过量合成谷氨酸的机理。过去的研究认为细胞膜通透性的增加是诱导谷氨酸过量合成的主要原因,并提出了“细胞渗漏模型”。但是新的研究表明,在生物素限量或生物素过量并添加青霉素或表面活性剂即细胞膜通透性增加而谷氨酸能过量合成的条件下,并未发现谷氨酸棒杆菌细胞膜对离子和其它氨基酸的通透性的增加。因此,研究人员推翻了“细胞渗漏模型”的假说,提出细胞内代谢流的改变是谷氨酸过量合成的主要原因<sup>[8]</sup>。

乙醛酸循环途径是谷氨酸棒杆菌谷氨酸合成的中心代谢途径之一。正如本文开头所叙述的那样,有关谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环途径的作用并不明确。通过本文所做的研究,我们认为:(1)尽管谷氨酸发酵的原料是糖质原料,但是谷氨酸棒杆菌细胞内仍然存在乙醛酸循环活性,而且起重要作用。这是因为该途径被打断后细胞的谷氨酸合成明显受到影响。另外,有关异柠檬酸裂解酶的酶活测定也表明该途径的存在,尽管没有受到“乙酸诱导”时那么高的活性。国外研究人员发现,真正对乙醛酸循环途径起诱导作用的可能是乙酰辅酶 A 或某种衍生物但不是乙酸自身<sup>[9]</sup>。无论培养基中是否添加乙酸或乙酸盐,细胞内都有乙酰辅酶 A 的存在,也就必然有乙醛酸循环途径的存在;(2)乙醛酸循环途径对谷氨酸合成的作用并非只是提供菌体生长所需的部分能量和代谢中间

产物。因为乙醛酸循环途径缺失的谷氨酸棒杆菌 WTΔA 与野生型菌株 WT 相比在葡萄糖为碳源的培养基上培养时生长并没有明显改变。我们正在对乙醛酸循环与谷氨酸合成之间的关系做进一步研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] 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. *Journal of Biotechnology*, 2003, **104**: 5-25
- [2] Chen N (陈宁). Screening and breeding of L-glutamic acid high-yield strains and studies on their fermental conditions (Ph. D. thesis). Tianjin Institute of Light Industry, 2001
- [3] Zhang KX (张克旭), Chen N (陈宁), Zhang B (张蓓) *et al.* Metabolic Control Fermentation. Chinese Light Industry Press. 1998, pp. 233-235
- [4] Volker FW, Albert AD, Hermann S *et al.* Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**: 3088-3096
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] Vertes AA, Hatakeyama K, Inui M *et al.* Replacement recombination in Coryneform bacteria: high efficiency integration requirement for non-methylated plasmid DNA. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**: 2036-2038
- [7] Liebel W, Ehrmann M, Ludwig W *et al.* Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297<sup>T</sup>, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, **41**: 255-260
- [8] Eiichiro K. Metabolic engineering of glutamate production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2003, **79**: 37-57
- [9] Wendisch VF, Spies M, Reinscheid DJ. Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch Microbiol*, 1997, **168**: 262-269