

# 谷氨酸棒杆菌 $H^+$ -ATPase 基因失活 提高谷氨酸产生量\*

张 博 李铁民\*\* 杨智勇 胡永飞 李 玉

(辽宁大学生命科学院 沈阳 110036)

**摘要** 为了证实在谷氨酸棒杆菌中,利用  $H^+$ -ATPase 基因失活构建高产谷氨酸基因工程菌的应用可行性,通过重组 PCR 技术部分缺失  $H^+$ -ATPase  $\gamma$  亚基因序列,采用插入失活方法构建  $H^+$ -ATPase 失活的谷氨酸棒杆菌。考察了其谷氨酸产生能力及对生长速率的影响。实验结果表明,  $H^+$ -ATPase 失活的谷氨酸棒杆菌在含有 100g/L 的葡萄糖培养基中摇瓶发酵,其谷氨酸最大累积量为 51.6g/L,比野生菌株提高了 42.9%。生长速率研究结果表明,  $H^+$ -ATPase 失活的谷氨酸棒杆菌生长速率略低于野生谷氨酸棒杆菌。证实了  $H^+$ -ATPase 基因失活对提高谷氨酸产量的作用,为利用  $H^+$ -ATPase 基因构建高产谷氨酸基因工程菌株提供了科学依据。

**关键词** 谷氨酸棒杆菌 谷氨酸 插入失活  $H^+$ -ATPase 基因 生长速率

**中图分类号** Q789

ATP 合酶可分为储能 F-型、质膜 P-型和液泡 V-型三类,其中 F-型 ATP 合酶( $H^+$ -ATPase 或  $F_1F_0$ -ATP 合酶)是细菌参与能量代谢的关键酶<sup>[1]</sup>。 $H^+$ -ATPase 在不同种属的细菌中其结构相似,均由  $F_0$  和  $F_1$  两部分组成。大肠杆菌的  $F_1F_0$ -ATP 合酶结构最简单,由 8 个亚基组成,包括  $F_0$  中的  $\alpha, \beta, c$  三个亚基和  $F_1$  中的  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  五个亚基<sup>[2]</sup>。 $F_0$  插入内膜构成 ATPase 的质子通道,  $F_1$  则含有 ATP 水解的催化位点。该酶的主要功能是为细胞代谢提供能量,维持细胞内的 pH 稳定,并可调节产生运输系统所需的质子动力势<sup>[3]</sup>。

研究表明,  $H^+$ -ATPase 缺失的大肠杆菌在以葡萄糖为底物进行发酵时,由于  $H^+$ -ATPase 的缺失使其能量供应能力减弱,促进了细菌呼吸率的增加和与呼吸相关基因的表达,其糖发酵产物丙酮酸的产量显著增加,但菌体的生长速率与其亲本菌株相比有所下降<sup>[4,5]</sup>。近年的研究表明,  $H^+$ -ATPase 缺失的菌株可明显提高大肠杆菌的丙氨酸产量<sup>[6]</sup>。对  $H^+$ -ATPase 缺失的枯草芽孢杆菌研究表明,  $H^+$ -ATPase 的缺失不仅能

使发酵产物丙酮酸量增加,也能增加代谢产物中乙酸盐的产量<sup>[7]</sup>。

Sekine 等<sup>[8]</sup>发现一株带有自发新霉素突变的谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum* ATCC14067),该菌株对葡萄糖的消耗比较亲本菌株高 2 倍,但其生长率比亲本菌株低,且  $H^+$ -ATPase 活性降低了 25%。通过研究发现,在  $H^+$ -ATPase 的  $\gamma$  亚基因序列中有一个点突变。后经发酵条件优化,该菌株的谷氨酸产量提高一倍以上<sup>[9]</sup>,但  $H^+$ -ATPase 活性是否与谷氨酸产生存在必然联系目前尚不清楚。为此,以谷氨酸棒杆菌标准菌株 ATCC 13032 为研究对象,通过插入失活  $H^+$ -ATPase 基因证实了  $H^+$ -ATPase 在谷氨酸产生中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。大肠杆菌 JM109、DH5 $\alpha$ 、质粒 pMD18-T Simple 均由宝生物工程(大连)有限公司提供。质粒 pk19mobsacB 由德国 Kalinowski 教授惠赠。

1.1.2 培养基 LB 培养基和发酵培养基。发酵培养

收稿日期:2010-08-02 修回日期:2010-09-29

\* 辽宁省科技厅自然科学基金(20082501)、沈阳市科技局计划(1091187-1-00)资助项目

\*\* 通讯作者,电子信箱:tieminli@lnu.edu.cn

基为(1L):100g 葡萄糖,45g 硫酸铵,1g 磷酸二氢钾,0.4g 七水硫酸镁,10 mg 七水硫酸铁,10 mg 五水硫酸锰,200  $\mu$ g 尿素,生物素 2.5  $\mu$ g,13.8ml 豆饼水解液(保证总氮 35g/L),50g 碳酸钙,氢氧化钾调 pH 到 8.0。根据实验要求,在培养基中加入 25  $\mu$ g/ml 卡那霉素。

1.1.3 酶与试剂 限制性内切酶、Pyrobest™ DNA Polymerase、DNA Ligation Kit Ver. 2.1、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 等为宝生物工程(大连)有限公司产品;胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.1.4 引物设计与合成 根据 GenBank 中 *atp* 部分基因序列设计引物 P1:5'-**CCCCGG** CGCGACCTGGAAGCA TT-3' 和 P2:5'-**TCTAGA** GCCGATCTT TCC A CCCTTAA C-3',3',5'端分别加 *Sma*I 和 *Xba*I 酶切位点序列(阴影标记)。测序用引物 RV-M 位于克隆载体 pMD18-T Simple *Sma*I 酶切位点上游,M13-47 位于克隆载体 pMD18-T Simple *Xba*I 酶切位点下游,具体序列为:RV-M:5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3',M13-47:5'-GAGCGGATAACAATT TCACAGG-3',上述引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

## 1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pMD18-T simple-*atp* 的构建 以谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组 DNA 为模板,用引物 P1/P2 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:98℃ 预变性 10min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环后,72℃ 再延伸 2min。回收 *atp* 基因片段,3'末端加“A”反应后与 pMD18-T simple 连接,得到重组质粒 pMD18-T simple-*atp*。

1.2.2 重组自杀载体 pk19mobsacB-*atp* 的构建 用限制性内切酶 *Sma*I 和 *Xba*I 分别酶切克隆重组质粒 pMD18-T simple-*atp* 和自杀载体 pk19mobsacB,琼脂糖凝胶电泳后,分别切胶回收基因片段,用去磷酸化试剂盒处理切胶回收 1kb 左右大片段后,采用 DNA 片段连接试剂盒将 *atp* 基因片段与自杀载体 pk19mobsacB 连接。得到重组自杀载体 pk19mobsacB-*atp*。

1.2.3 重组自杀载体 pk19mobsacB-*atp* 转化谷氨酸棒杆菌<sup>[10]</sup> 挑取新鲜平板上的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 加到含有 0.5% 葡萄糖的 2ml 液体 LB 培养基,30℃,200r/min 过夜培养。按 1% 接种量转接到含 3% 甘氨酸和 0.1% Tween80 的 50ml 液体 LB 培养基中,30℃,200r/min 培养至细胞 OD<sub>600</sub> 达 0.6。将菌液冰浴 15min,

离心收集菌体。在 4℃ 条件下,用 0.2ml10% 甘油重悬细胞,分装到 1.5ml 管中,每管 80  $\mu$ l, -80℃ 冰箱保存待用。转化时将其冰浴融化,加入 1  $\mu$ l 质粒 DNA 后混合,转移至预冷的 0.1cm 电击杯中,于 1.8kV,5ms 条件下电击细胞,之后立即加入含 0.5% 葡萄糖的 LB 液体培养基 1ml,混匀,转入 1.5ml 管后,46℃ 水浴 6min,再 30℃ 水浴 1h,离心收集菌体,涂布于含 0.5% 葡萄糖和 25  $\mu$ g/ml 卡那霉素的固体 LB 培养基上,30℃ 培养 36h。

1.2.4 谷氨酸测定<sup>[11]</sup> 采用大肠杆菌 L-谷氨酸脱羧酶解法使谷氨酸分解成 CO<sub>2</sub> 气体,用微量呼吸检测仪定量测定菌株产生的 CO<sub>2</sub> 量,根据反应方程式计算出谷氨酸含量。实验重复三次,实验数据为三次实验的平均值。

1.2.5 生长曲线测定<sup>[12]</sup> 以野生菌株作对照,测定重组菌株的生长曲线,实验重复三次,实验数据为三次实验的平均值。

## 2 结果

### 2.1 *atp* 基因部分序列克隆

以谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum* ATCC13032)基因组 DNA 为模板,以 P1/P2 为引物,PCR 扩增出 *atp* 基因中部分序列。实验结果表明,扩增的基因片段大小与预期的片段大小(1kp)一致(图 1)。

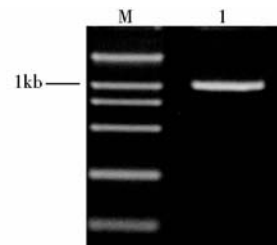


图 1 *atp* 基因的部分序列 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification of *atp* gene fragment

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR amplification fragment of *atp* gene

### 2.2 重组自杀载体 pk19mobsacB-*atp* 的构建及鉴定

重组质粒 pMD18-T Simple-*atp* 经 *Sma*I 和 *Xba*I 分别消化后,琼脂糖凝胶电泳(图 2)。切胶回收 1kb *atp* 基因片段。用 *Sma*I 和 *Xba*I 消化自杀载体 pk19mobsacB,进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收 5.6kb 大片段,去磷酸化处理后,与 1kb *atp* 基因片段进行连接,得到重组自杀载体 pk19mobsacB-*atp*。*Sma*I 和 *Xba*I 双酶切鉴定重组自杀载体(图 3)。

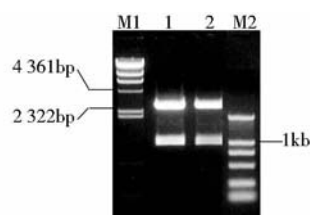


图2 克隆质粒 pMD18-Tsimple-atp 酶切电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pMD18-Tsimple-atp

M1:  $\lambda$ -Hind III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker;  
1, 2: pMD18-Tsimple-atp digested by *Sma*I and *Xba*I

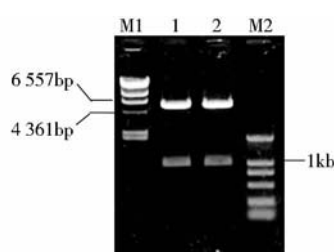


图3 重组自杀载体酶切鉴定图

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid digested with *Sma*I and *Xba*I

M1:  $\lambda$ -Hind III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker;  
1, 2: pk19mobsacB-atp by digested with *Sma*I and *Xba*I

### 2.3 *atp* 基因失活谷氨酸棒杆菌鉴定

利用引物 P1/P2, 菌落 PCR 鉴定抗生素筛选得到的阳性克隆。大片段是从基因组上扩增的片段 (1 979bp), 小片段为重组自杀载体上扩增的片段 (1kb)。由图 4 可见, 1~3 号菌株均为阳性克隆株。

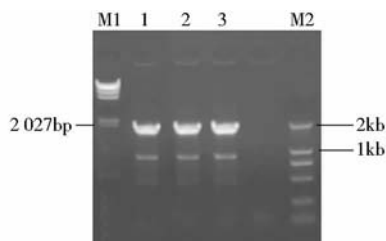


图4 重组谷氨酸棒杆菌 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant *C. glutamicum* by PCR

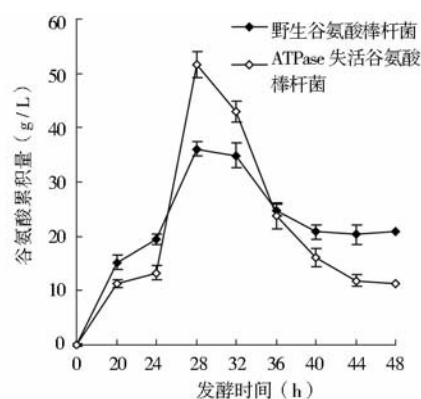
M1:  $\lambda$ -Hind III DNA marker; M2: DL2000 DNA marker;  
1, 2, 3: Recombinant *C. glutamicum* with pk19mobsacB- $\Delta$ atp gene

### 2.4 *atp* 基因失活对谷氨酸棒杆菌产谷氨酸的影响

基因失活谷氨酸棒杆菌和野生谷氨酸棒杆菌分别连续培养 48 h, 从摇瓶培养 20 h 起开始取样, 每隔 4 小

时取样一次 (24 h, 28 h, 32 h, 36 h, 40 h, 44 h, 48 h), 分别测定谷氨酸含量。

谷氨酸棒杆菌在发酵 20h 后开始累积谷氨酸 (图 5), 在发酵 28h 时谷氨酸累积量达到最大, *atp* 基因失活的谷氨酸棒杆菌在发酵过程中谷氨酸的累积量明显高于野生的谷氨酸棒杆菌, 最大累积量为 51.6 g/L, 而野生谷氨酸棒杆菌谷氨酸最大累积量为 36.1 g/L, 比野生菌提高了 42.9%。

图5 *atp* 基因失活谷氨酸棒杆菌的谷氨酸产生动力学曲线Fig. 5 Dynamic curves of glutamate production in *C. glutamicum* with  $\Delta$ atp

### 2.5 *atp* 基因失活对谷氨酸棒杆菌生长速率的影响

为了考察基因失活对重组谷氨酸棒杆菌生长的影响, 在摇瓶发酵的条件下, 测定重组谷氨酸棒杆菌的生长曲线, 同时以野生型谷氨酸棒杆菌作对照。将重组谷氨酸棒杆菌与野生谷氨酸棒杆菌在摇瓶培养条件下连续培养 24h, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 和 24h 测定培养液的 OD<sub>600</sub> 值。

野生谷氨酸棒杆菌和 *atp* 基因失活谷氨酸棒杆菌的生长曲线趋势一致 (图 6), 都在 2h 进入对数期, 12h 达到稳定期, 但在稳定期, 同一时间内 *atp* 基因失活的谷氨酸棒杆菌的菌量比野生谷氨酸棒杆菌少, 但统计学分析不具显著性差异。

## 3 讨论

研究结果表明, *atp* 基因失活的谷氨酸棒杆菌其谷氨酸最大产量与其亲本菌株相比提高了 42.9%, 与 Aoki 等<sup>[9]</sup>报道的谷氨酸棒杆菌 ATCC 14067 自发突变株产谷氨酸量 (提高 53.86%) 基本相近。虽然对其确切机制尚不清楚, 但认为  $H^+$ -ATPase 活性的降低提高

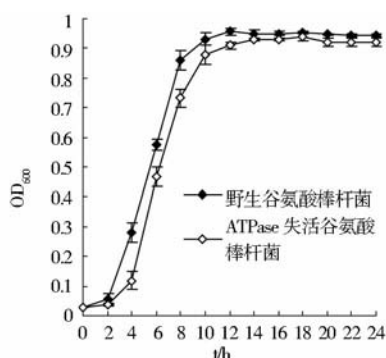


图6 *atp* 基因失活谷氨酸棒杆菌的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of the *C. glutamicum* with *atp* gene inactivation

谷氨酸产量与谷氨酸棒杆菌代谢途径中的底物水平磷酸化途径有关。细胞中能量的产生主要依靠两种途径,即氧化磷酸化途径和底物水平磷酸化途径,在氧化磷酸化途径中 ADP 合成 ATP 需要依靠 ATP 合酶<sup>[1]</sup>,底物水平磷酸化途径则不需 ATP 合酶参与<sup>[13]</sup>。通常,野生菌株可以同时应用两个途径为菌体代谢提供能量,而  $H^+$ -ATPase 失活的谷氨酸棒杆菌可能由于缺少正常的氧化磷酸化途径,促使菌体通过底物水平磷酸化提供菌体正常代谢所需的能量<sup>[7]</sup>。糖酵解途径中的关键酶(磷酸果糖激酶 PFK-I 和丙酮酸激酶 PYK-II)是在底物水平磷酸化作用下行使其功能<sup>[14]</sup>。由于  $H^+$ -ATPase 失活的谷氨酸棒杆菌底物水平磷酸化增强,促进了糖酵解途径中的酶活性的增强,所以,通过促进菌体对糖的利用率,增加丙酮酸的大量生成,这样随着糖酵解途径和三羧酸循环中的碳流量的增加,谷氨酸前体物质  $\alpha$ -酮戊二酸的量也将增加,因此有利于谷氨酸的大量合成。另一方面,随着谷氨酸的不断合成,分泌至胞外,菌体生长环境的 pH 值降低,为了维持细胞质膜内外的 pH 值平衡,野生的谷氨酸棒杆菌谷氨酸的转运系统会吸收一部分谷氨酸进入胞内<sup>[3,6]</sup>,由于  $H^+$ -ATPase 失活的谷氨酸棒杆菌缺少 ATP 合酶所提供的转运系统所需的质子动力势,所以不能使分泌出的谷氨酸再被谷氨酸转运系统吸收,这样胞外可增加谷氨酸积累。

Sekine 等<sup>[8]</sup>的报道表明, $H^+$ -ATPase 失活的菌体的生长速率低于亲本菌株的生长速率<sup>[4-5]</sup>,这可能与  $H^+$ -ATPase 缺失的菌株缺少氧化磷酸化途径有关,致使菌体能量代谢下降,产能减少,进而导致细胞生长分裂放慢及菌体生长速率下降。实验也得到了同样的结果,但统计学分析不具显著性差异。

## 参考文献

- [1] Engelbrecht S, Junge W. ATP synthase: a tentative structural model. FEBS Lett, 1997, 414 (3): 485-491.
- [2] Senior A E. The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. Annu Rev Biophys Chem, 1990, 19: 7-41.
- [3] Kobayashi H. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. J Biol Chem, 1985, 260(1): 72-76.
- [4] Causey T B, Zhou S, Shanmugam K T. et al. Engineering the metabolism of *Escherichia coli* W3110 for the conversion of sugar to redox-neutral and oxidized products; Homoacetate production. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3): 825-832.
- [5] Causey T B, Shanmugam K T, Yomano L P, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8): 2235-2240.
- [6] Wada M, Narita K, Yokota A. Alanine production in an  $H^+$ -ATPase and lactate dehydrogenase defective mutant of *Escherichia coli* expressing alanine dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(4): 819-825.
- [7] Santana M, Ionescu M S, Vertes A, et al. *Bacillus subtilis* FOF1 ATPase: DNA Sequence of the *atp* Operon and Characterization of *atp* Mutants. J Bacteriol, 1994, 176(22): 6802-6811.
- [8] Sekine H, Shimada T, Hayashi C, et al.  $H^+$ -ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57(4): 534-540.
- [9] Aoki R, Wada M, Takesue N, et al. Enhanced Glutamic Acid Production by a  $H^+$ -ATPase-Defective Mutant of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69 (8): 1466-1472.
- [10] Dorella F A, Estevam E M, Cardoso P G, et al. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet Microbiol, 2006, 114(3-4): 298-303.
- [11] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工大学,等. 工业发酵分析. 北京:中国轻工业出版社,2004. 97-99.
- [12] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验. 第三版,北京:高等教育出版社,1999. 258-261.
- [13] Shen P, Fan X R, Li G W. Experiment of Microorganism. 3<sup>rd</sup> ed, Beijing: Higher Education Press, 1999. 258-261.
- [14] Möller D, Schauder R, Fuchs G, et al. Acetate oxidation to  $CO_2$  via a citric acid cycle involving an ATP-citrate lyase: A mechanism for the synthesis of ATP via substrate level phosphorylation in *Desulfobacter postgatei* growing on acetate and sulfate. Arch Microbiol, 1987, 148(3): 202-207.

- [14] Yokota A, Henmi M, Takaoka N, et al. Enhancement of glucose mutant defective in F1-ATPase activity. J Ferment Bioeng, 1997, metabolism in a pyruvic acid-hyperproducing *Escherichia coli* 83(2): 132-138.

## Overproduction of Glutamic Acid in *Corynebacterium glutamicum* with $H^+$ -atp Inactivation

ZHANG Bo LI Tie-min YANG Zhi-yong HU Yong-fei LI Yu

(School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

**Abstract** In order to confirm the application feasibility of overproduction of glutamic acid in *C. glutamicum* with  $H^+$ -ATP inactivation in the construction of genetically modified bacteria. The sequence encoding  $H^+$ -ATPase  $\gamma$  subunit in *C. glutamicum* ATCC13032 was partially deleted by crossover PCR, and the mutant, in which  $H^+$ -atp gene was inactivated, was obtained by insertion inactivation. The glutamic acid production and growth rate of the mutant were tested. The results showed that the maximum production of glutamic acid of the mutant was 51.6 g/L in 100 g/L glucose culture medium, with 42.9 % increase in contrast to the wild parent strain, and that growth rate of the mutant in measurement of the growth curves was lower than wild parent strain. The results suggest that  $H^+$ -atp gene inactivated in *C. glutamicum* increases glutamic acid production, and slightly reduces growth rate of the bacteria.

**Key words** *Corynebacterium glutamicum* Glutamic acid Gene inactivation  $H^+$ -ATPase gene Growth rate

## 赛默飞世尔科技收购戴安公司

赛默飞世尔科技有限公司与戴安公司近日宣布,赛默飞世尔以现金每股 118.50 美元的价格购买戴安所有已发行普通股,该价格比戴安在信息公布前最后一个交易日的股票收盘价溢价约 21%,比之前 60 个交易日平均股票收盘价溢价约 32%。赛默飞世尔希望通过节约成本、增加收入,在第三年产出 6 000 万美元协同运营效益。交易有望在第一年内每股调整后收益增长 0.13 至 0.15 美元。戴安公司位于加利福尼亚州森尼韦尔,1975 年成立后不久推出第一款水分析离子色谱系统,通过创新和全球扩张不断发展壮大。现在,公司在 6 个大洲 21 个国家拥有超过 1 600 个员工,在亚太地区具有广泛影响力,整合后,戴安会成为赛默飞世尔分析技术业务的一部分。