

比较 *pta* 及 *ack* 敲除对钝齿棒杆菌产 L-精氨酸生理代谢的影响*

万方¹ 张斌¹ 陈民良² 陈进聪² 陈雪岚^{1**}

(1 江西师范大学生命科学学院 南昌 330022 2 南昌大学生命科学学院 南昌 330031)

摘要 旁支代谢途径的截断有利于目的氨基酸合成途径的集流。基于基因组尺度代谢网络模型的预测,以钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) MT-M4 为出发菌株,通过无痕敲除技术分别敲除了编码磷酸乙酰基转移酶的 *pta* 基因及编码乙酸激酶的 *ack* 基因,阻断了乙酸的合成。摇瓶发酵结果表明,*pta* 缺失菌株精氨酸产量较出发菌株提高了 25.60%,达 15.46g/L。葡萄糖转化率提高了 29.41%;*ack* 缺失菌株精氨酸产量达 13.82g/L,较出发菌株提高了 12.81%,葡萄糖转化率提高了 26.02%。同时,*pta* 及 *ack* 敲除菌株的细胞生长较出发菌株均分别提高了 9.19% 及 7.71%。因此,*pta*、*ack* 的敲除不仅有利于精氨酸的合成,而且对菌体生长具有促进作用;但 *pta* 的敲除更有利于精氨酸的积累。

关键词 钝齿棒杆菌 精氨酸 无痕敲除技术 基因组尺度代谢网络模型 生理代谢

中图分类号 Q812

L-精氨酸是人和动物的半必需氨基酸,其在生物体中具有降低血氨、维持体内氮平衡的作用^[1];作为 NO 的前体物质,具有舒张血管的功能^[2];同时还可以通过增强机体免疫^[3],预防癌症等。由于在生理功能方面扮演的重要角色,其在食品及医药工程中应用广泛。现今,微生物发酵是工业生产精氨酸的主要来源。随着全球 L-精氨酸需求地不断增大,如何通过代谢工程进行分子育种选育高产 L-精氨酸菌株成为研究的热点。目前,科研工作者主要通过加强精氨酸生物合成途径的代谢流量获得高产精氨酸菌株。例如,敲除负调控基因 *argR*^[4-5];对精氨酸反馈抑制的关键酶基因 *argB* 进行定点突变,降低 ArgB 对精氨酸的敏感性^[6];过表达 L-精氨酸合成相关的基因簇 *argCJBDF-argGH*^[7]。此外,谷氨酸是精氨酸和脯氨酸生物合成共同竞争的前体物质,李小曼等^[8]通过敲除编码 γ -谷氨酰激酶的 *proB* 基因,从而使代谢通量流向精氨酸的合成途径,精氨酸产量达到了 13.78g/L,较出发菌株提高

了 13.6%。因此,旁支代谢途径的切断,对 L-精氨酸合成网络的集流是必要的。

L-精氨酸生物合成网络涉及糖酵解、磷酸戊糖途径和三羧酸循环(tricarboxylic cycle, TCA)等主要代谢途径。乙酰 CoA 不仅是 TCA 循环的前体物质^[9],其还可以通过 *pta* 基因编码的磷酸乙酰基转移酶及 *ack* 基因编码的乙酸激酶合成乙酸^[10]。因此,降低乙酰 CoA 的分解途径,提高其通往 TCA 循环的代谢通量是精氨酸集流的必要条件之一。本课题组前期通过基因组尺度代谢网络模型(genome scale metabolism network model, GSMN)预测提高精氨酸产量的 64 个敲除位点中,对代谢通量影响值较高的包括参与脯氨酸合成途径的 *proC*、天冬氨酸合成的 *lysA*、乙酸合成的 *pta* 和 *ack* 等基因。其中,*pta* 对代谢通量的影响值为 -118.16, *ack* 对代谢通量的影响值为 118.16,两者绝对值大小一致且影响较大,表明二者敲除都对精氨酸的合成有一定的促进作用。因此,本研究拟通过无痕敲除技术分别敲除 *pta* 和 *ack* 基因,比较二者分别敲除后对细胞生理代谢及精氨酸积累的影响,从中挑选更有利于提高精氨酸产量的敲除为后续工作服务。

收稿日期:2015-05-18 修回日期:2015-06-15

* 国家自然科学基金资助项目(31360219,30960012)

**通讯作者,电子信箱:xuelanchen162@163.com

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 本实验所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 实验所用的菌株和质粒
Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Clone host strain	Stored in our lab.
<i>C. crenatum</i> MT-M4	<i>C. crenatum</i> with <i>argR</i> lethal mutation and <i>argB</i> site-directed mutation for over-producing L-arginine	Stored in our lab.
<i>C. crenatum</i> MT-M4 Δ <i>pta</i>	<i>C. crenatum</i> MT-M4 with <i>pta</i> deletion	This study
<i>C. crenatum</i> MT-M4 Δ <i>ack</i>	<i>C. crenatum</i> MT-M4 with <i>ack</i> deletion	This study
Plasmids		
pMD18-T	T-vector,2.7kb,AmpR, <i>lacZ</i>	TaKaRa Co.
pK18 <i>mobsacB</i>	Mobilizable <i>E. coli</i> vector, KmR, <i>sacB</i>	Stored in our lab.
pK18 <i>mobsacB</i> - Δ <i>pta</i>	pK18 <i>mobsacB</i> with the flanking regions of the <i>C. crenatum</i> MT-M4 <i>pta</i> gene	This study
pK18 <i>mobsacB</i> - Δ <i>ack</i>	pK18 <i>mobsacB</i> with the flanking regions of the <i>C. crenatum</i> MT-M4 <i>ack</i> gene	This study

1.1.2 主要试剂及仪器 2 \times Taq Mix 购自上海近岸科技有限公司;PCR 产物纯化及切胶回收试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;T4 DNA ligase、限制性内切核酸酶(*Hind*III 和 *Xba*I)均购自 TaKaRa 公司;引物的合成及 DNA 测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成;其余试剂均为国产分析纯。

主要仪器包括培养箱、PCR 仪、电泳仪、电转仪、冷冻离心机、紫外分光光度计、恒温摇床、酶标仪等。

1.1.3 培养基及培养条件 LB 培养基用于钝齿棒杆菌和大肠杆菌的培养。LB 感受态培养基用于钝齿棒杆菌电转感受态细胞的制备,配方为含 1% Tween80 及 3% 甘氨酸的 LB 培养基;SOC 培养基用于钝齿棒杆菌感受态细胞电转后的复苏,配方(g/L)如下:蛋白胨 20,酵母粉 5,葡萄糖 3.6,氯化钠 0.5,氯化镁 0.95,氯化钾 0.186,硫酸镁 1.2。

种子培养基用于 *C. crenatum* 的扩大培养,其配方如下(g/L):葡萄糖 30,玉米浆 25,硫酸铵 45,磷酸二氢钾 0.5,MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.5,尿素 1.5,pH7.2,装液量 30ml/250ml 锥形瓶,115℃灭菌 10min;发酵培养基用于 L-精氨酸的发酵,其配方如下(g/L):葡萄糖 120,玉米浆 25,硫酸铵 45,磷酸二氢钾 0.05,MgSO₄ \cdot 7H₂O 0.5, CaCO₃ 30, pH7.2,装液量 25ml/250ml 挡板三角瓶,

115℃灭菌 10min。

培养温度:大肠杆菌 37℃,钝齿棒杆菌 30℃。抗生素的工作浓度:氨苄青霉素 100 μ g/ml,卡那霉素 25 μ g/ml。

1.1.4 引物 由于钝齿棒杆菌与谷氨酸棒杆菌 DNA 序列的高度同源(99%)^[11],本研究根据谷氨酸棒杆菌全基因组(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BX927147.1>)序列信息,利用 Oligo 软件设计用于扩增 *pta* 和 *ack* 基因的上、下同源臂的引物,所有引物及测序工作均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。本实验所用引物见表 2。

1.2 方 法

1.2.1 *pta* 与 *ack* 基因敲除质粒的构建 以 *pta* 基因敲除质粒的构建为例,将 *C. crenatum* MT-M4 单菌落作为模板,采用引物对 *pta*-up-F/*pta*-up-R 和 *pta*-down-F/*pta*-down-R 分别通过 PCR 扩增 *pta* 的上下同源臂。利用 PCR 产物回收试剂盒回收 *pta* 的上下同源臂,并等摩尔数混合,以引物对 *pta*-up-F/*pta*-down-R 进行重叠 PCR (overlap PCR),通过切胶回收获得 *pta* 同源片段。将此同源片段连接到 pMD18-T 载体上并导入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,以 M13 通用引物筛选阳性克隆子,并进行测序验证。验证正确后,提取质粒,以 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切获得酶切后的 *pta* 同源片段,然后与经同样

表 2 本实验所用引物

Table 2 The primers used in this work

Primers	Sequences(5'-3')	Restriction sites
<i>pta</i> -up-F	CGCAAGCTT GCTTCGATGGATTGCGATTGG	<i>Hind</i> III
<i>pta</i> -up-R	CTTGAGCAGCCAGTTTTCAAAGAGTTCGGCGCTCATGACTGGTTC	
<i>pta</i> -down-F	GAAAACTGGCTGCTCAAGAGCTAATGGCATTGGCAC	
<i>pta</i> -down-R	GCATCTAGAGGTGGAAGTGAGTGAAGAAAC	<i>Xba</i> I
<i>ack</i> -up-F	CGCAAGCTTCTGAACAGCTTGCTGAAATCG	<i>Hind</i> III
<i>ack</i> -up-R	GAGTTCAAAAACAAGTGCCAATGCCATTAGCTGCGCTCCTCC	
<i>ack</i> -down-F	GGCATTGGCACTTGTTTTGAACTCTTCGCTTAGCTCTCCTGGTTAG	
<i>ack</i> -down-R	GCATCTAGATTGACTTTGGGCGAGTTAGG	<i>Xba</i> I
M13 (-47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
M13 (RV-M)	GAGGGGATAACAATTTACACAGG	

Note: Bold bases indicated restrict sites. Underlined bases indicated complementary sequences for overlap PCR

双酶切的 pK18*mobsacB* 进行酶连反应后导入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。通过 M13 引物筛选阳性克隆子后利用质粒提取试剂盒提取质粒,获得 *pta* 基因敲除质粒 pK18*mobsacB*- Δ *pta*。

ack 基因敲除质粒 pK18*mobsacB*- Δ *ack* 的构建如上所述。

1.2.2 *pta* 与 *ack* 基因敲除菌株的构建 *pta* 与 *ack* 基因的敲除采用无痕敲除技术,第一次同源重组利用卡那霉素抗性作为正向筛选标记。第二次利用蔗糖致死基因 *sacB* 作为反向筛选标记。以 *pta* 敲除菌株的构建为例,具体方法如下:在电压 3 000V、电击时间 5ms 的条件下进行电转,将敲除质粒 pK18*mobsacB*- Δ *pta* 导入 *C. crenatum* MT-M4 感受态细胞。复苏后的感受态细胞涂布在含卡那霉素 (10 μ g/ml) 的 LB 平板上,通过引物对 *pta*-up-F/*pta*-down-R 筛选阳性单交换子。将此单交换子接种于 5ml LB 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、220r/min 过夜培养,培养液稀释 100 倍后涂布于含 10% 蔗糖的 LB 平板,诱导第二次同源重组。通过引物对 *pta*-up-F/*pta*-down-R 筛选阳性双交换子,从而获得 *pta* 基因敲除菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*。

ack 基因敲除菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 的构建如上所述。

1.2.3 发酵实验 将基因缺失菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 与出发菌株 *C. crenatum* MT-M4 划线培养至 LB 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 48h。挑取单菌落接种到 5ml LB 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、220r/min 培养 24h。取 1ml 菌液接种到 30ml 种子培养基,30 $^{\circ}$ C、

220r/min 培养 24h。以 10% 的接种量接种到 25ml 的发酵培养基,30 $^{\circ}$ C、200r/min 发酵 108h,每隔 12h 取样 200 μ l。

1.2.4 菌体生长量的测定 将离心后的菌体加 1ml 0.125mol/L HCl 中和过量的 CaCO₃。稀释适当倍数后测定其 OD₅₆₂。按公式 1OD = 0.375g 菌体计算干重^[12]。

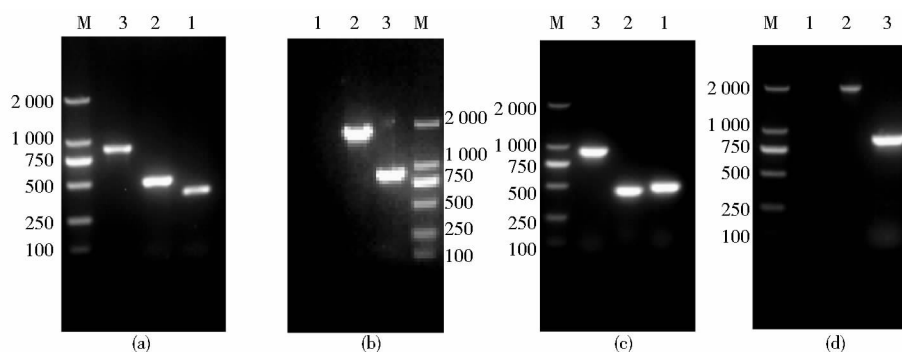
1.2.5 L-精氨酸产量的测定 发酵液中 L-精氨酸的测定采用改良的坂口试剂法^[13]。将发酵液用超纯水稀释适当的倍数至 250 μ l,然后加入 1ml 0.375mol/L 的 NaOH 及 250 μ l 的坂口试剂混匀,30 $^{\circ}$ C 水浴 20min,测定其 OD₅₂₀。

1.2.6 葡萄糖含量的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法^[14]测定发酵液中的残糖量。将发酵液用超纯水稀释适当的倍数至 1ml,加入 750 μ l 的 DNS 试剂沸水浴 5min,迅速冷却至室温,再稀释适当的倍数后测定其 OD₅₄₀。

2 结 果

2.1 *pta* 与 *ack* 基因敲除质粒的构建

以 *C. crenatum* MT-M4 单菌落为模板,利用表 2 中的引物通过 PCR 扩增获得长为 385bp 和 477bp 的 *pta* 上下同源臂,以及长为 483bp 和 420bp 的 *ack* 上下同源臂;再通过 overlap PCR 获得长为 862bp 的 *pta* 同源片段,以及长为 903bp 的 *ack* 同源片段。其琼脂糖凝胶电泳结果如图 1(a) 和 (c) 所示。将同源片段切胶回收后,按 1.2.1 方法所述获得敲除质粒 pK18*mobsacB*- Δ *pta* 和 pK18*mobsacB*- Δ *ack*。

图 1 *pta* 与 *ack* 基因敲除菌株的 PCR 鉴定Fig. 1 The identification of the strains with the *pta* or *ack* deletion by PCR

(a) M: DL2000 marker; 1: *pta*-up; 2: *pta*-down; 3: *pta* fusion fragment (b) M: DL2000 marker; 1: Negative control; 2: *C. crenatum* MT-M4; 3: *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta* (c) M: DL2000 marker; 1: *ack*-up; 2: *ack*-down; 3: *ack* fusion fragment (d) M: DL2000 marker; 1: Negative control; 2: *C. crenatum* MT-M4; 3: *C. crenatum* MT-M4 Δ *ack*

2.2 *pta* 与 *ack* 基因敲除菌株的筛选和鉴定

敲除质粒 pK18mobsacB- Δ *pta* 与 pK18mobsacB- Δ *ack* 通过电转的方式导入 *C. crenatum* MT-M4, 利用引物对 *pta*-up-F/*pta*-down-R 及 *ack*-up-F/*ack*-down-R 进行阳性双交换子的筛选。由于 *pta*、*ack* 基因的敲除, 阳性双交换菌株仅能扩增到与同源臂片段长度一致的片段, 分别为 862bp、903bp; 而对照组 *C. crenatum* MT-M4 则扩增到长度为 1 811bp 的包含完整 *pta* 的片段以及长为 2 080bp 包含完整 *ack* 基因的片段。琼脂糖凝胶电泳结果[图(1b)、(1d)]与预期结果一致, 表明重组菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta* 与 *C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 构建成功。

2.3 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 与 *C. crenatum* MT-M4 精氨酸发酵实验分析

为了探究 *pta*、*ack* 基因敲除对钝齿棒杆菌生理代谢的影响, 以出发株 *C. crenatum* MT-M4 为对照组, 基因缺失菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 为实验组, 在葡萄糖为唯一碳源的条件下进行摇瓶发酵实验, 并比较两基因缺失菌株的菌体生长、精氨酸产量及葡萄糖消耗等的情况。如图 2(a) 所示, *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta* 与 *C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 的菌体生长速率基本一致, 108h 菌株生长量分别达到 10.34g/L、10.20g/L, 较出发菌株分别提高了 9.19%、7.71%; 图 2(b) 所示, 两基因缺失菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 与出发株 *C. crenatum* MT-M4 的葡萄糖消耗基本一致; 如图 2(c) 所示, *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack*

的精氨酸产量较出发菌株分别提高了 26.20% 和 12.81%, 达 15.46g/L 和 13.82g/L。由表 3 可以看出, *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack* 的葡萄糖转化率 (yield on glucose) 分别提高了 29.41%、11.76%, 产率 (specific yield) 分别提高了 16.28%、4.65%。由此可见, *pta*、*ack* 的敲除不仅有利于精氨酸的积累, 同时能够促进细胞的生长及提高葡萄糖转化率; 但 *pta* 的敲除更有利于碳源流向精氨酸的合成。

3 讨 论

GSMN 模型作为重要的系统生物学分析工具, 是以物种的全基因组序列和代谢通量分析方法为基础, 构建基因-蛋白质-代谢反应三者的相互关系, 并结合一系列的能量和前体代谢物的生化反应, 重构模拟物种的代谢网络^[15]。因此这为研究微生物的代谢网络, 选育高产菌株提供了有力的育种手段。现今, 许多科研工作者致力于基因组尺度代谢网络模型指导微生物的分子育种。例如, Huang 等^[16] 对链霉菌在基因组尺度代谢通量分析指导下进行 *gdhA* 的敲除以及 *dahp*、*accA2*、*zwf2* 的过表达, 其 FK506 产量提高了 47%; Li 等^[17] 在 GSMN 模型分析的指导下对 *Bacillus subtilis* 进行 *ldh* 与 *pdhC* 基因的双敲除, 其异丙醇产量提高了 70%。本研究基于基因组尺度代谢网络模型的指导, 对编码乙酸合成途径的两个酶的基因进行敲除, 构建了 *pta* 和 *ack* 基因缺失菌株 *C. crenatum* MT-M4 Δ *pta*、*C. crenatum* MT-M4 Δ *ack*。发酵结果显示, 其精氨酸产量分别提高了 26.20%、12.81%。这说明通过 GSMN

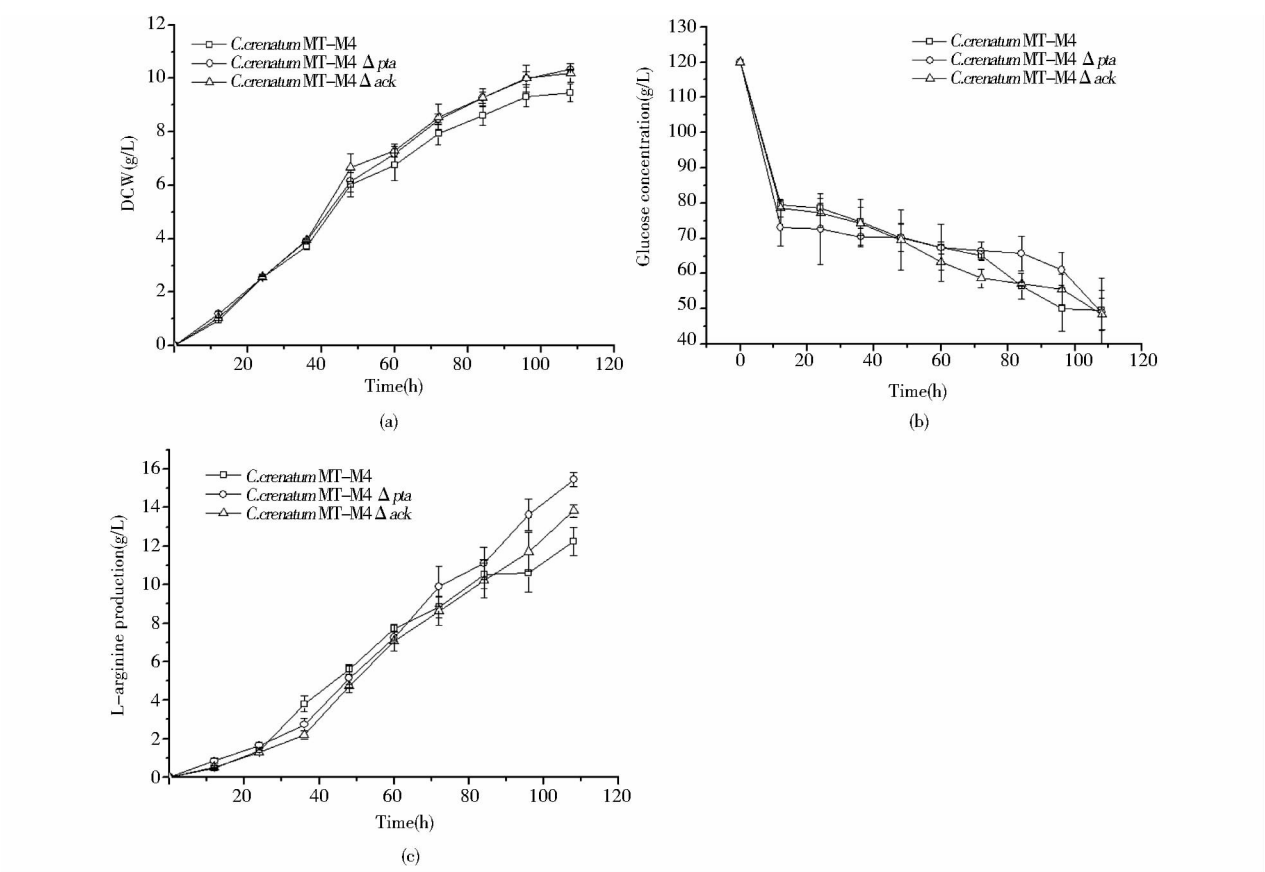


图 2 两基因缺失菌株与出发菌株 L-精氨酸发酵的比较

Fig. 2 Comparison of L-arginine fermentation between gene deletion strains and original strain

(a) Cell concentration (b) Glucose concentration (c) L-arginine production

表 3 两基因缺失菌株与出发菌株 L-精氨酸发酵相关参数的比较

Table 3 Comparison of relevant parameters of L-arginine fermentation between gene deletion strains and original strain

Strain	Maximum DCW (g/L)	Glucose consumed (g/L)	Maximum arginine (g/L)	Yield on glucose (g/g)	Specific yield (g/g)
<i>C. crenatum</i> MT-M4	9.47 ± 0.33	70.30 ± 5.65	12.25 ± 0.75	0.17 ± 0.03	1.29 ± 0.05
<i>C. crenatum</i> MT-M4 Δpta	10.34 ± 0.02	70.98 ± 9.64	15.46 ± 0.37	0.22 ± 0.05	1.50 ± 0.06
<i>C. crenatum</i> MT-M4 Δack	10.20 ± 0.35	71.50 ± 4.59	13.82 ± 0.33	0.19 ± 0.02	1.35 ± 0.06

对基因改造靶点的预测是准确的。这也为今后通过分子育种获得更高产精氨酸的钝齿棒杆菌提供了精确的指导。

pta 和 *ack* 分别编码乙酸合成途径的两个重要酶--磷酸乙酰基转移酶和乙酸激酶。*pta* 和 *ack* 基因的缺失,阻断了精氨酸合成的旁支代谢途径--乙酸合成途径,降低了乙酰 CoA 分解途径,这不仅有利于乙酰 CoA 流往 TCA 循环,为精氨酸的合成提供更多的前体物质 α -酮戊二酸,而且也作为精氨酸合成途径的第一步反应

谷氨酸生成乙酰谷氨酸提供了更多的底物。因此,*pta* 和 *ack* 基因的敲除均有利于精氨酸的合成。而 *pta* 的敲除更有利于精氨酸的积累,这可能是因为 *pta* 编码乙酸合成途径的第一个酶,它的敲除节约了更多碳流,使代谢通量更多的流向 TCA 循环,从而更有利于精氨酸的合成。

基因敲除可能会引起营养缺陷,从而抑制细胞的生长。例如, Kimura 等^[18] 敲除了 *dtsR1* 基因,发现细胞生长急剧下降,这是由于该基因的缺失造成菌株成为

脂肪酸营养缺陷型菌,需外源添加脂肪酸恢复细胞的生长。而本研究通过敲除 *pta*、*ack* 基因阻断乙酸合成途径,发现菌体生长不但没有受到抑制,反而有所提高了。究其原因可能是乙酸的合成会降低胞内 pH,而钝齿棒杆菌生长的最适 pH 为 6.5 ~ 7.0^[19],且精氨酸的前体物质谷氨酸合成的关键酶谷氨酸脱氢酶在 pH 中性条件下酶活最高,而 pH 降到 6.5 时酶活下降近一半^[20]。由此可见胞内 pH 对精氨酸合成具有显著影响。乙酸合成途径的阻断使得细胞内的 pH 维持在近中性范围,不仅有利于细胞进行各项生命活动从而促进细胞的生长,而且有利于精氨酸的合成。因此,结合基因组尺度代谢网络模型的预测,切断竞争之路,是实现一种既利于菌体生长又利于目的产物积累的分子育种方式。

参考文献

- [1] Batshaw M L, MacArthur R B, Tuchman M. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders: twenty years late. *The Journal of Pediatrics*, 2001, 138(1): 46-55.
- [2] Ignarro L J, Buga G M, Wei L H, et al. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(7): 4202-4208.
- [3] Zhu X, Pribis J P, Rodriguez P C, et al. The central role of arginine catabolism in T-cell dysfunction and increased susceptibility to infection after physical injury. *Annals of Surgery*, 2014, 259(1): 171-178.
- [4] Park S H, Kim H U, Kim T Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nature Communications*, 2014, 5: 4618.
- [5] 陈雪岚,汤立,焦海涛,等. 钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株的构建及其对精氨酸生物合成途径相关基因转录水平的影响. *微生物学报*, 2013, 53(1): 92-98.
Chen X L, Tang L, Jiao H T, et al. Construction of *Corynebacterium crenatum* AS 1. 542Δ*argR* and analysis of transcriptional levels of the related genes of arginine biosynthetic pathway. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(1): 92-98.
- [6] Xu M, Rao Z, Dou W, et al. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 255-266.
- [7] Xu M, Rao Z, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC ~ H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(3): 495-502.
- [8] 李小明, 赵智, 张英姿, 等. γ-谷氨酰激酶基因敲除对产 L-精氨酸钝齿棒杆菌 8-193 生理代谢的影响. *微生物学报*, 2011, 51(11): 1476-1484.
Li X M, Zhao Z, Zhang Y Z, et al. Effect of gamma-glutamyl kinase gene knock-out on metabolism in L-arginine-producing strain *Corynebacterium crenatum* 8-193. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(11): 1476-1486.
- [9] Owen O E, Kalhan S C, Hanson R W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(34): 30409-30412.
- [10] Schmidt M, Schönheit P. Acetate formation in the photoheterotrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* involves an archaeal type ADP-forming acetyl-CoA synthetase isoenzyme I. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 349(2): 171-179.
- [11] Dou W, Xu M, Cai D, et al. Improvement of L-arginine production by overexpression of a bifunctional ornithine acetyltransferase in *Corynebacterium crenatum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(3): 845-855.
- [12] Xu H, Dou W, Xu H, et al. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced L-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43(1): 41-51.
- [13] Liang X H, Sun J L, Chen S L, et al. Determination L-arginine from grape juice with sakaguchi reaction. *Advanced Materials Research*, 2013, 662: 301-304.
- [14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [15] 王晖, 马红武, 赵学明. 基因组尺度代谢网络研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1340-1348.
Hui W, Ma H W, Zhao X M. Progress in genome-scale metabolic network: a review. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(10): 1340-1348.
- [16] Huang D, Li S, Xia M, et al. Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 1-18.
- [17] Li S, Huang D, Li Y, et al. Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 101-122.
- [18] Kimura E, Abe C, Kawahara Y, et al. A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 234(1): 157-161.
- [19] 苏令鸣, 王宜敏, 刘铁敏, 等. L-精氨酸产生菌的选育及其发

醇条件的研究. 工业微生物, 2002, 32(1): 1-4.

Su L M, Wang Y M, Liu T M, et al. Studies on the breeding of L-arginine-producing mutant and its fermentation conditions. Industrial Microbiology, 2002, 32(1): 1-4.

[20] Shiio I, Ozaki H. Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. J Biochem, 1970, 68(5): 633-647.

Comparsion of the Effects of *pta* and *ack* Deletion on Physiological Metabolism of L-arginine-producing Strain *Corynebacterium crenatum*

WAN Fang¹ ZHANG Bin¹ CHEN Min-liang² CHEN Jin-cong² CHEN Xue-lan¹

(1 College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

(2 College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract The disruption of competitive metabolic pathways is conducive to the carbon flux converted into the purpose amino acid biosynthetic pathway. In the present study, based on the prediction of genome-scale metabolic network model, markless knock-out technology to construct separately recombinant strains *C. crenatum* MT-M4 Δpta and *C. crenatum* MT-M4 Δack which led to interdict the acetic acid biosynthetic pathway were employed. As shake-flask fermentation results shown, L-arginine production of *C. crenatum* MT-M4 Δpta was significantly increased by 25.60% higher than that of original strain, reached to 15.46g/L with glucose transformation rate increased by 29.41%. L-arginine production of *C. crenatum* MT-M4 Δack was 13.82g/L which was 12.81% higher than that of original strain, with glucose transformation rate increased by 26.02%. In addition, the growth of *C. crenatum* MT-M4 Δpta and *C. crenatum* MT-M4 Δack was increased by 9.19% and 7.71%, respectively. Thus, *pta* and *ack* deletion was not only beneficial to the improvement of L-arginine production, but also conducive to the cell growth. However, *pta* deletion compared with *ack* deletion was more conducive to L-arginine accumulation.

Key words *C. crenatum* L-arginine Markerless knock-out technology Genome-scale metabolic network model Physiological metabolism