

研究报告

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶介导的 草酰乙酸回补途径对谷氨酸棒杆菌 V1 氨基酸代谢的影响

张旦旦¹ 仇爱梅¹ 鲍勇¹ 窦文芳¹ 许正宏^{2*}

(1. 江南大学药学院制药工程研究室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】谷氨酸棒杆菌是工业生产氨基酸的主要菌株,以缬氨酸高产菌株谷氨酸棒杆菌 V1 为研究对象,探讨磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PCK)介导的草酰乙酸回补途径对菌株生理特性以及主要氨基酸代谢流量的影响。【方法】通过基因工程手段,在谷氨酸棒杆菌 V1 中过表达 *pepc* (编码 PEPC)和 *pck* (编码 PCK),比较重组菌与出发菌关键酶活性、发酵特性以及主要氨基酸积累量变化。【结果】构建两株重组菌 V1-*pepc* (强化草酰乙酸回补途径)和 V1-*pck* (弱化草酰乙酸回补途径),重组菌生长均较出发菌延缓,总生物量、葡萄糖和硫酸铵消耗基本不变;过表达 *pck*, PCK 活性提高 22.8%,丙氨酸、缬氨酸、谷氨酸、精氨酸积累量分别提高了 11.8%、17.2%、27.8%和 19.5%;过表达 *pepc*, PEPC 活性提高 27.5%,同时 PC 活性降低 12.9%,天冬氨酸族和谷氨酸族氨基酸的整体流量变化不大,丙氨酸族氨基酸的整体流量降低了 14.7%。【结论】丙氨酸族氨基酸受此回补途径影响较大,天冬氨酸族氨基酸受此影响较小。

关键词: 谷氨酸棒杆菌 V1, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶, 草酰乙酸回补途径, 缬氨酸

Foundation item: National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA022102)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@163.com

Received: October 21, 2016; **Accepted:** December 21, 2016; **Published online** (www.cnki.net): January 10, 2017
基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划) (No. 2012AA022102)

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@163.com

收稿日期: 2016-10-21; **接受日期:** 2016-12-21; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-01-10

Effects of oxaloacetate anaplerotic reaction mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) on amino acid metabolism of *Corynebacterium glutamicum* V1

ZHANG Dan-Dan¹ QIU Ai-Mei¹ BAO Yong¹ DOU Wen-Fang¹ XU Zheng-Hong^{2*}

(1. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] *Corynebacterium glutamicum* is the main industry strain for production of amino acids, to explore the effects of oxaloacetate anaplerotic reaction mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) on physiological characteristics and amino acid metabolism, the valine producing strain *Corynebacterium glutamicum* V1 was studied. [Methods] Overexpressing of *pepc* encoding PEPC and *pck* encoding PCK in *Corynebacterium glutamicum* V1 by means of genetic engineering, the changes of key enzyme activities, fermentation characteristics and main amino acids accumulation were discussed compared with the original strain. [Results] Two recombinant strains V1-*pepc* (enhanced oxaloacetate anaplerotic pathway) and V1-*pck* (weakened oxaloacetate anaplerotic pathway) were constructed, both the growth trends were delayed, the total biomass and the consumption of sugar and ammonium basically unchanged; Overexpression of *pck*, the activity of PCK has 22.8% increased, the yields of alanine, valine, glutamic and arginine were increased by 11.8%, 17.2%, 27.8% and 19.5% respectively; Over expression of *pepc*, the activity of PEPC increased by 27.5%, while the activity of PC decreased 12.9%, the overall flow of aspartic and glutamic-family amino acids changes little, while the flow of alanine-family reduced by 14.7%. [Conclusion] Alanine-family amino acids are greatly influenced by this pathway while aspartate-family not.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum* V1, Phosphoenolpyruvate carboxylase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Oxaloacetate anaplerotic reaction, Valine

三羧酸循环(TCA 循环)中某些中间产物是合成许多重要有机物的前体, 如草酰乙酸(OAA)是天冬氨酸族氨基酸合成的碳架, α -酮戊二酸是谷氨酸族氨基酸合成的碳架, 而糖酵解中间产物丙酮酸是丙氨酸族氨基酸合成的碳架等。当 TCA 循环的中间产物大量消耗于有机物的合成时, 将启动草酰乙酸回补反应, 以确保 TCA 循环的正常运行, 该反应包括丙酮酸羧化酶(PC)介导的丙酮酸羧化作用、PEPC 介导的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化作用、以及由转氨酶介导的天冬氨酸转氨作用(图 1)。其中, PEPC 催化 PEP 不可逆地生成 OAA, 是细菌中 OAA 回补的重要途径, 在初级代谢中起着重要的补给作用^[1], 而磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PCK)则催化 OAA 生成 PEP 和二氧化碳, 是该回补反应的逆反应。

谷氨酸棒杆菌 V1 (*C. glutamicum* V1)是本研究室保藏的 L-缬氨酸高产菌株, 前期研究表明: 通过切断 PEPC 参与的 TCA 循环回补途径, 增加 PEP 向丙酮酸的流量, 可有效改变丙酮酸族和谷氨酸族氨基酸的代谢流量^[2]。本文以 *C. glutamicum* V1 为研究对象, 通过过量表达 PEPC (由 *pepc* 基因编码)和 PCK (由 *pck* 基因编码), 分别构建强化 OAA 回补反应和逆反应的重组菌 V1-*pepc* 和 V1-*pck*, 探讨该回补途径对菌株生理特性以及主要氨基酸代谢流量的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

所用的菌株和质粒如表 1 所示。

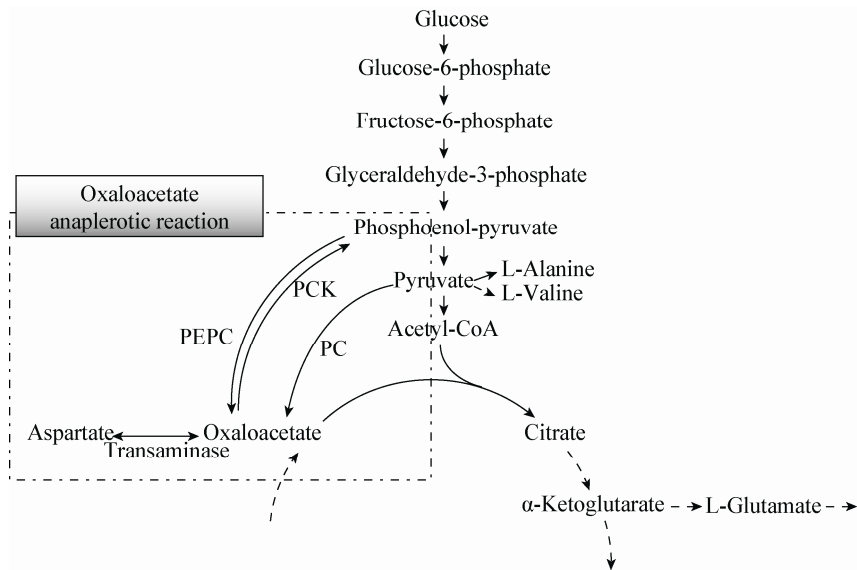


图 1 草酰乙酸回补途径

Figure 1 Oxaloacetate anaplerotic reaction

表 1 实验所用菌株和质粒		
Table 1 The strains and plasmids used in this work		
菌株和质粒	特性	来源
Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> JM109		Stored in this lab
<i>C. glutamicum</i> V1	L-Valine producer	Stored in this lab
<i>C. glutamicum</i> V1- <i>pck</i>	V1 with <i>pck</i> overexpress	This study
<i>C. glutamicum</i> V1- <i>pepc</i>	V1 with <i>pepc</i> overexpress	This study
pMD19-T vector	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , <i>lacZ</i>	TaKaRa
pJC1- <i>tac</i>	Km ^R , Mobilizable <i>E. coli</i> vector	Stored in this lab
pJC1- <i>tac-pck</i>	pJC1- <i>tac</i> with <i>pck</i> fragment from V1	This study
pJC1- <i>tac-pepc</i>	pJC1- <i>tac</i> with <i>pepc</i> fragment from V1	This study

1.2 主要试剂和仪器

T4 DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); 溶菌酶、蛋白酶 K、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; 苹果酸脱氢酶, 上海宝曼生物科技有限公司; NADH、ADP、PEP 等, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂为进口或国产分析纯生化试剂。

凝胶成像系统、基因扩增仪, Bio-Rad 公司; 台式高速冷冻离心机(5430R), 德国 Eppendorf 公司; 高效液相色谱仪, 美国戴安公司。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 培养基: (1) *C. glutamicum* V1 的摇瓶发酵培养基(g/L): 葡萄糖 125.0, (NH₄)₂SO₄ 35.0, KH₂PO₄

4.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, MnSO₄ 0.01, VH 1×10⁻⁴, 硫胺素 2×10⁻⁴, 装液量 25 mL/250 mL, pH 6.8–7.0。(2) 大肠杆菌、*C. glutamicum* V1 感受态细胞、*C. glutamicum* V1 种子培养等培养基参见文献[2]。

1.3.2 培养条件: 大肠杆菌在 37 °C、200 r/min 回旋振荡培养箱培养 12 h; *C. glutamicum* V1 和重组菌在 30 °C、120 r/min 往复振荡培养箱培养 68 h。

1.4 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作参考文献[3], 棒杆菌基因组 DNA 的提取采用上海捷瑞生物技术公司的细菌基因组提取试剂盒; 大肠杆菌的转化采用 CaCl₂ 法。

1.5 重组菌的构建

1.5.1 目的基因 *pck* 和 *pepc* 的扩增: 根据 NCBI 上公布的 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 的

pck 和 *pepc* 基因序列分别设计增强表达的上下游引物。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。P1: 5'-TCTAGAAATGACTACTGCTGCAATCAGG-3', *Xba* I; P2: 5'-GTCGACTTAAGCGTGAGCTGCTGAAT-3', *Sal* I; P3: 5'-GCTTCTAGAAATGACTGATTTTACGCGAT-3', *Xba* I; P4: 5'-GTCGACCTAGCCGGAGTTGCG-3', *Sal* I。

(1) 以 *C. glutamicum* V1 基因组为模板, P1、P2 为引物, 扩增 *pck* 基因, 扩增体系(50 μ L): 10 \times ExTaq DNA 聚合酶缓冲液 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上游引物(100 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物(100 μ mol/L) 2 μ L, 模板 2 μ L, 10 \times ExTaq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 34.5 μ L; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。(2) 以 *C. glutamicum* V1 基因组为模板, P3、P4 为引物, 扩增 *pepc* 基因, 扩增体系同(1); 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。所得目的片段两端带 *Xba* I 和 *Sal* I 限制性酶切位点。

1.5.2 重组质粒的构建: (1) 将扩增得到的 *pck* 和 *pepc* 基因分别连接至 pMD19-T 载体, 连接体系及条件参考 TaKaRa pMD19-T Vector Cloning Kit 说明书; 将连接产物转化至 *E. coli* JM109 中, 经蓝白斑筛选、*Xba* I 和 *Sal* I 双酶切验证, 获得阳性转化子; 提取重组质粒 pMD19-T-*pck*、pMD19-T-*pepc*, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。(2) 提取重组质粒 pMD19-T-*pck*、pMD19-T-*pepc* 及穿梭质粒 pJC1-*tac*, 分别利用限制性内切酶 *Xba* I 与 *Sal* I 进行双酶切, 应用上海捷瑞生物有限公司的胶回收试剂盒回收并纯化线性片段 *pck*、*pepc* 和 pJC1-*tac*, 将 *pck* 和 *pepc* 分别连接至质粒 pJC1-*tac*, 连接体系及条件参考 TaKaRa T4 DNA 连接酶说明书。连接产物转化至 *E. coli* JM109 中, *Xba* I 和 *Sal* I 双酶切验证, 获得阳性转化子 *E. coli* JM109 pJC1-*tac-pck*; *Bam*H I 单酶切验证, 获得阳性转化子 *E. coli* JM109 pJC1-*tac-pepc*。

1.5.3 重组菌的转化: 提取重组质粒 pJC1-*tac-pck*

及 pJC1-*tac-pepc*, 应用电击转化法(方法参见文献[4]), 分别转化至 *C. glutamicum* V1 感受态细胞中, 挑取转化子, 提取质粒, 经酶切验证, 得到重组菌 *C. glutamicum* V1-*pck* 和 V1-*pepc*。

1.6 酶活分析

1.6.1 丙酮酸羧化酶(PC)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC): 检测方法参见文献[2]。

1.6.2 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶: 将待测菌株接种于发酵培养基中, 生长 36 h 后, 取发酵液, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用 pH 7.5, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬后冰浴超声破碎, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 2 min 取上清液进行酶活测定。3 mL 反应体系含: 2.3 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5), 50 mmol/L MnCl₂、0.5 mol/L NaHCO₃、0.5 mol/L NaPEP、50 mmol/L ADP、5 mmol/L NADH、500 U/mL 的苹果酸脱氢酶各 100 μ L、最后加入粗酶液 100 μ L 启动反应, 于 25 $^{\circ}$ C、340 nm 处, 每 30 s 测定一次吸光值, 持续 3 min。

活力单位定义: 一个活力单位(U)为上述细胞处理和反应条件下, 每分钟消耗 1 μ mol NADH 所需的酶量。

1.6.3 粗酶液中总蛋白含量的测定: 采用考马斯亮蓝法^[5]。

1.7 发酵液中氨基酸浓度测定

采用高效液相色谱分析仪^[6]。

1.7.1 样品预处理: 取适当稀释的发酵上清液 200 μ L, 加入 20 μ L 正亮氨酸内标溶液, 先后加入 100 μ L 三乙胺乙腈和异硫氰酸苯酯乙腈, 混匀后室温静置 1 h。反应混合液中加入 400 μ L 正己烷, 剧烈振荡, 室温下静置 5–10 min, 12 000 r/min 离心 15 min。吸取下层液体, 用 0.45 μ m 有机小滤膜过滤除杂, 置于进样瓶中密封。

1.7.2 液相条件: 色谱柱: VensuSilAA, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.76%无水乙酸钠, 0.7%乙腈; 流动性 B: 80%乙腈; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L。流动相梯度洗脱程序: 0–4 min, 100%流动相 A; 4–16 min, 97%流动

相 A; 16–17 min, 89%流动相 A; 17–32 min, 79%流动相 A; 32–34 min, 66%流动相 A; 34–38 min, 100%流动相 B; 38.01, 100%流动相 A。

2 结果与分析

2.1 重组菌 *C. glutamicum* V1-*pck* 和 V1-*pepc* 的构建

扩增 *C. glutamicum* V1 的 *pck* 和 *pepc* 基因, 分别连接至载体 pMD19-T, 将连接产物转化至 *E. coli* JM109 中, 经蓝白斑筛选、质粒酶切验证, 获得阳性转化子 *E. coli* JM109 pMD19-T-*pck* (图 2A) 和 *E. coli* JM109 pMD19-T-*pepc* (图 2B)。

提取上述重组质粒 pMD19-T-*pck*、pMD19-T-*pepc* 及空质粒 pJC1-*tac*, 分别利用限制性内切酶 *Xba* I 与

Sal I 进行双酶切, 回收并纯化线性片段 *pck*、*pepc* 和 pJC1-*tac*, 将 pJC1-*tac* 分别与 *pck* 和 *pepc* 混合后置于连接体系中过夜连接, 连接产物转化至 *E. coli* JM109, 经培养过夜、质粒酶切验证, 得到阳性转化子 *E. coli* JM109 pJC1-*tac-pck* (图 3A) 和 *E. coli* JM109 pJC1-*tac-pepc* (图 3B), 表明重组质粒构建成功。

提取重组质粒 pJC1-*tac-pck* 及 pJC1-*tac-pepc*, 分别转化至 *C. glutamicum* V1 感受态细胞中, 挑取转化子, 提取质粒, 经酶切验证, 得到重组菌 *C. glutamicum* V1-*pck* 和 V1-*pepc*。经检测, 重组菌 V1-*pck* 的 PCK 酶活较出发菌株提高了 22.8%, 重组菌 V1-*pepc* 的 PEPC 酶活较出发菌株提高了 27.5% (表 2), 表明重组菌构建成功。

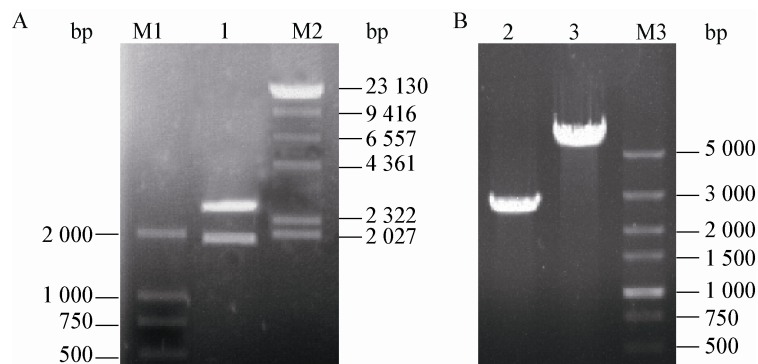


图 2 pMD19-T-*pck* (A) 和 pMD19-T-*pepc* (B) 酶切验证图

Figure 2 Digestion patterns of plasmid pMD19-T-*pck* (A) and plasmid pMD19-T-*pepc* (B)

注: M1: DL2000; M2: λDNA/*Hind* III; M3: DL5000 分子量标准; 1: 重组质粒 pMD19-T-*pck* *Xba* I 与 *Sal* I 双酶切产物; 2: 质粒 pMD19-T-*pepc* 单酶切产物; 3: 质粒 pMD19-T-*pepc* *Xba* I 与 *Sal* I 双酶切产物。

Note: M1: Markers of DL2000; M2: λDNA/*Hind* III; M3: DL5000; 1: Digestion products of plasmid pMD19-T-*pck* by *Xba* I and *Sal* I; 2: Digestion products of plasmid pMD19-T-*pepc* by *Xba* I and *Sal* I; 3: Digestion products of plasmid pMD19-T-*pepc* by *Xba* I and *Sal* I.

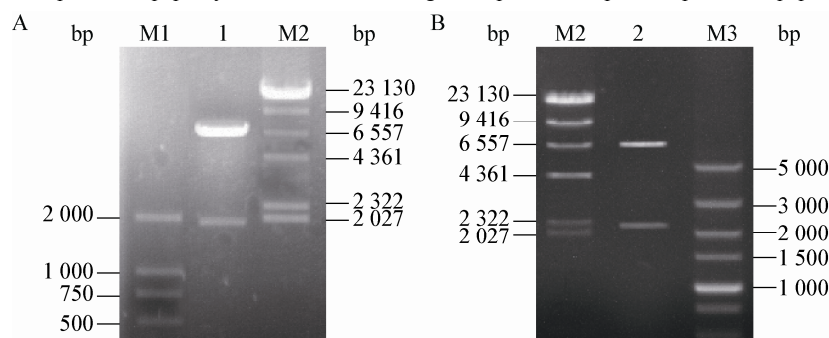


图 3 pJC1-*tac-pck* (A) 和 pJC1-*tac-pepc* (B) 的酶切验证图

Figure 3 Digestion patterns of plasmid pJC1-*tac-pck* (A) and pJC1-*tac-pepc* (B)

注: M1: DL2000; M2: λDNA/*Hind* III; M3: DL5000 分子量标准; 1: 重组质粒 pJC1-*tac-pck* *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切片段; 2: 质粒 pJC1-*tac-pepc* *Bam*HI 的单酶切产物。

Note: M1: Markers of DL2000; M2: λDNA/*Hind* III; M3: DL5000; 1: Digestion products of plasmid pJC1-*tac-pck* by *Sal* I and *Xba* I; 2: Digestion products of plasmid pJC1-*tac-pepc* by *Bam*HI.

表 2 关键酶活性测定 Table 2 Specific activity of key enzymes			
Strains	PCK (U/mg protein)	PEPC (U/mg protein)	PC (U/mg cell)
<i>C. glutamicum</i> V1	0.350±0.013	0.400±0.012	1.860±0.073
<i>C. glutamicum</i> V1- <i>pck</i>	0.430±0.011	0.390±0.015	1.930±0.059
<i>C. glutamicum</i> V1- <i>pepc</i>	0.300±0.016	0.510±0.018	1.620±0.034

2.2 重组菌的缬氨酸发酵特性变化

以出发菌株 V1 及带有空质粒的菌株 V1(pJC1-*tac*) 为对照,对重组菌株 V1-*pck* 和 V1-*pepc* 进行摇瓶发酵特性研究,结果(图 4)表明:(1) 带有空质粒的菌株 V1(pJC1-*tac*)与出发菌株 V1 的生长、葡萄糖、硫酸铵的消耗以及 L-缬氨酸的积累均无明显差异,即空质粒对菌株 V1 的生理代谢无明显影响(数据未在图中列出);(2) 两株重组菌的生长速率均较出发菌株稍缓,但其对数生长期较出发菌株延长了 8 h (从 48 h 延长到 56 h, 图 4A),进入稳定期时菌体浓度均达到 14.5 g/L 左右,从葡萄糖的消耗曲线(图 4C)分析,重组菌的耗糖速度较出发菌株慢,但到达稳定期时消耗的总糖基本相同;(3) L-缬氨酸积累曲线(图 4B)表明:发酵 40 h 时出发菌 L-缬氨酸已基本达到最大积累量,而重组菌在 40–48 h 仍处于快速生长期,并快速积累 L-缬氨酸,发酵终点 48 h 时,重组菌 V1-*pck* 的 L-缬氨酸积累量达到 32.9 g/L,较出发菌株(28.1 g/L)提高了 17%;而重组菌 V1-*pepc* 由于前期 L-缬氨酸的积累较为缓慢,48 h 时 L-缬氨酸的产量仅为 23.9 g/L,较出发菌降低了 15%。出发菌和重组菌在菌株生长的对数后期(后 8 h)均不积累缬氨酸。

2.3 草酰乙酸回补途径对菌株 *C. glutamicum* V1 主要氨基酸代谢的影响

为探讨草酰乙酸回补途径对氨基酸代谢流的影响,以发酵 48 h 的菌液样品为分析对象,比较出发菌株与重组菌主要氨基酸积累情况,结果(表 3)表明增强草酰乙酸回补途径关键酶活性可有效改变部分氨基酸代谢流向:(1) 增强 PCK 活性可促进草酰乙酸向 PEP 转化,增加丙酮酸的积累,进而增加 TCA 循环通量,使以丙酮酸为前体合成的丙氨

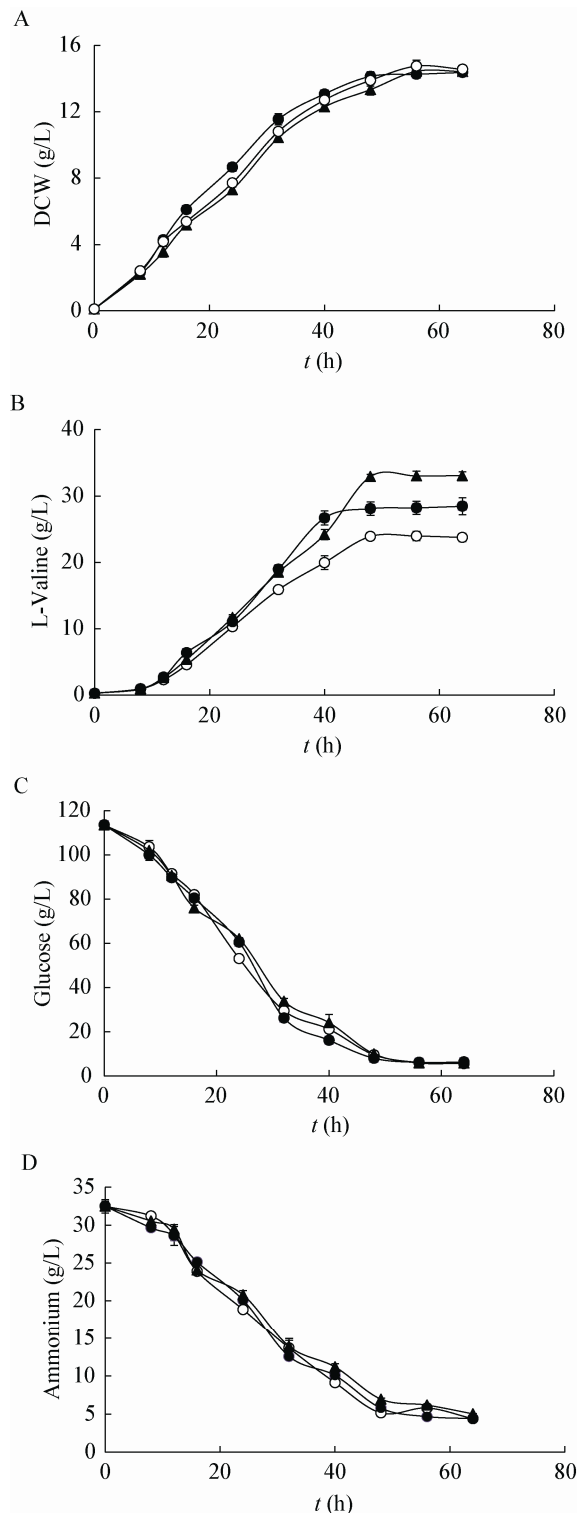


图 4 不同菌株的发酵过程曲线

Figure 4 Fermentation curve of different strains

Note: ●: *C. glutamicum* V1; ▲: *C. glutamicum* V1-*pck*; ○: *C. glutamicum* V1-*pepc*.

表 3 发酵液中的氨基酸分析
Table 3 The amino acids analysis of fermentation broth

Amino acid (g/L)		<i>C. glutamicum</i> V1	<i>C. glutamicum</i> V1- <i>pck</i>	<i>C. glutamicum</i> V1- <i>pepc</i>
Aspartate-family	Aspartic	(0.324±0.046) E-2	(0.364±0.036) E-2	(0.293±0.051) E-2
	Lysine	1.23±0.091	1.121±0.035	1.299±0.072
	Threonine	0.045±0.002	0.042±0.003	0.045±0.003
	Total	1.278	1.166 (↓8.76%)	1.348 (↑5.47%)
Alanine-family	Leucine	0.106±0.007	0.135±0.016	0.124±0.003
	Alanine	1.872±0.080	2.088±0.130	1.631±0.06
	Valine	28.094±1.020	32.932±0.340	23.913±0.24
	Total	30.072	35.155 (↑16.9%)	25.668 (↓14.7%)
Glutamic-family	Glutamic	0.181±0.020	0.232±0.0140	0.217±0.018
	Arginine	(0.869±0.043) E-2	(1.038±0.031) E-2	(0.892±0.031) E-2
	Proline	0.239±0.017	0.259±0.011	0.212±0.027
	Total	0.429	0.501 (↑16.7%)	0.438 (↑2.4%)

酸族氨基酸、和以 α -酮戊二酸为前体合成的谷氨酸族氨基酸代谢流量明显提高, 其中丙氨酸、缬氨酸、谷氨酸、精氨酸受此调控的影响最大, 分别提高了 11.8%、17.2%、27.8%和 19.5%; (2) 过表达 *pepc*, PEPC 活性提高 27.5%, 同时 PC 活性降低 12.9% (表 2), 即 PEP 到 OAA 代谢通量增加的同时, 另一回补途径即丙酮酸到 OAA 的代谢通量降低, 或使 OAA 回补途径的代谢流量控制在某一稳定水平, 致使天冬氨酸族和谷氨酸族氨基酸的整体流量变化不大, 而随着 PEP 降低, 丙酮酸随之降低, 导致丙氨酸族氨基酸的整体流量降低了 14.7%。

3 讨论

草酰乙酸回补途径是维持 TCA 循环正常运转的重要反应之一, 对氨基酸、蛋白质、脂类等有机物的代谢起着至关重要的作用。本文以缬氨酸高产菌株谷氨酸棒杆菌 V1 为研究对象, 通过过量表达 *pepc* 和 *pck* 的方法, 探讨由 PEPC 介导的 OAA 回补途径和由 PCK 介导的逆途径对菌株生理特性以及主要氨基酸代谢流量的影响。李会玉等^[7]在研究 3 种不同来源 *pepc* 基因对重组大肠杆菌生长的影响时也发现, 过表达 *pepc* 对宿主菌的生物量无影响, 如果排除质粒复制造成的代谢负荷, 甚至是促进了

宿主菌的生长, 推测是因为重排了代谢流量; 陆敏涛等^[8]、仇爱梅等^[2]等敲除棒杆菌 *pepc* 基因, 发现突变株的生长速率下降; 说明 *pepc* 活性的缺失对菌株的生长有一定的滞缓作用, 但过表达 *pepc* 对菌株生长的影响较小。

孙兰超等^[9]、姜菲等^[10]分别研究了 PEPC 活性对谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌 TCA 循环中间产物的影响, 结果均表明增强 PEPC 活性, OAA 回补途径的代谢通量增加, TCA 循环通量增加, α -酮戊二酸和苹果酸的积累量显著提高。本研究中发现, PEPC 介导的回补途径流量增加的同时, PC 介导的回补途径流量降低, 说明棒杆菌在以葡萄糖为碳源生长时, 作为回补酶, PEPC 和 PC 可以相互替代, 协同作用^[11-12], 将 OAA 回补途径的总代谢流量控制在一定范围, 这可能就是天冬氨酸族氨基酸和谷氨酸族氨基酸受此途径影响较小的原因之一。从主产物 L-缬氨酸的积累情况分析, 过量表达 *pck* 可显著提高其产量, 此结果对其他氨基酸生产菌的调控有一定的借鉴作用。

参 考 文 献

[1] Eikmanns BJ, Follettie MT, Griot MU, et al. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and

- expression[J]. Molecular and General Genetics, 1989, 218(2): 330-339
- [2] Qiu AM, Dou WF, Li H, et al. Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase gene knock-out on physiological metabolism in *Corynebacterium glutamicum* V1[J]. Microbiology China, 2012, 39(9): 1215-1224 (in Chinese)
仇爱梅, 窦文芳, 李会, 等. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除对于谷氨酸棒杆菌 V1 生理代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1215-1224
- [3] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Translated by Huang PT. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2002: 1595 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1595
- [4] Shen TX, Na SM, Xiao WZ, et al. The factors affected transformation efficiency of coryneform bacteria by electroporation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1995, 11(3): 245-249 (in Chinese)
沈天翔, 那淑敏, 肖文中, 等. 棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响[J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 245-249
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of the protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [6] Chen Q, Wang Q, Wei GQ, et al. Production in *Escherichia coli* of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with differing monomer compositions from unrelated carbon sources[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(14): 4886-4893
- [7] Li HY, Zhao P, Ge XZ, et al. Cloning and expression of three distinct phosphoenolpyruvate carboxylases in *Escherichia coli* and their influences on cell growth[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2014, 41(2): 87-92 (in Chinese)
李会玉, 赵鹏, 葛喜珍, 等. 三种不同磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆、表达及其对宿主菌生长的影响[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2014, 41(2): 87-92
- [8] Lu MT, Zhao Z, Zhang YZ, et al. Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase gene knock-out on metabolism in *Corynebacterium pectinense* PD-67[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(10): 1334-1340 (in Chinese)
陆敏涛, 赵智, 张英姿, 等. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除对北京棒杆菌 PD-67 的生理代谢的影响[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1334-1340
- [9] Sun LC, Liu T, Zhao Y, et al. Effect of enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase activity on α -ketoglutarate accumulation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 63-69, 169 (in Chinese)
孙兰超, 刘涛, 赵岩, 等. 增强磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性对谷氨酸棒状杆菌积累 α -酮戊二酸的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(6): 63-69, 169
- [10] Lou F, Li N, Zhao YJ, et al. Effects of overexpression of carboxylation pathway genes and inactivation of malic enzymes on malic acid production in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 33(11): 1539-1548 (in Chinese)
娄菲, 李宁, 赵玉蛟, 等. 过表达羧化途径及失活苹果酸酶基因对大肠杆菌好氧发酵产苹果酸的影响[J]. 生物工程学报, 2016, 33(11): 1539-1548
- [11] Petra-Wendisch P, Wendisch VF, Paul S, et al. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 1997, 143: 1095-1103
- [12] Petersen S, Graaf AA, Eggeling L, et al. *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(46): 35932-35941