

不同溶氧对谷氨酸棒杆菌代谢的影响

杨艳坤[△] 王芬[△] 孙杨 刘秀霞* 白仲虎*

(江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】以谷氨酸棒杆菌为研究对象,分别控制在0、30%、50%3种溶氧水平下进行发酵,分析不同溶氧水平下代谢的变化。【方法】通过检测发酵代谢物中有机酸、氨基酸的含量,以及测定代谢途径中关键酶活性及其编码基因的表达情况来考察不同溶氧水平下物质代谢发生的变化。通过检测胞内还原力和ATP的含量来分析不同溶氧水平对能量代谢产生的影响。

【结果】谷氨酸棒杆菌代谢支路受溶氧的影响而发生改变,氨基酸、有机酸的产量也随之改变。特别是在低溶氧(0)情况下,细胞内氧化磷酸化减弱,导致维持生命活动所必需的ATP供应减少,因此细胞通过增强底物水平磷酸化来产生ATP以满足生命活动的需求。在此情况下,胞内NADH得到较多积累,TCA循环代谢流量减小,而转向糖酵解、乙醛酸循环等,并且这个过程伴随多种杂酸包括乳酸、缬氨酸、亮氨酸等的产生,必将影响目的产物的产量。【结论】研究结果对于进一步采取措施优化溶氧的控制策略,提高目的产物的产量具有指导意义。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 溶氧, 代谢物, 酶活, 关键基因

Effect of different dissolved oxygen concentrations on metabolism in *Corynebacterium glutamicum*

YANG Yan-Kun[△] WANG Fen[△] SUN Yang LIU Xiu-Xia* BAI Zhong-Hu*

(National Engineering Laboratory of Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] We cultivated *Corynebacterium glutamicum* under 0, 30 and 50% dissolved oxygen (DO) to study the change of metabolism. [Methods] The change of substance metabolism was studied by detecting the content of organic acids and amino acids, the activity of key enzymes

Foundation item: National Basic Research Program of China (No. 2013CB733602); National Natural Science Foundation of China (No. 31570034); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150148); Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51401A)

*Corresponding author: E-mail: liuxiuxia@jiangnan.edu.cn; BAI Zhong-Hu: baizhonghu@jiangnan.edu.cn
[△]These authors equally contributed to this work

Received: November 25, 2015; **Accepted:** March 01, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 11, 2016

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973计划)项目(No. 2013CB733602); 国家自然科学基金项目(No. 31570034); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20150148); 中央高校基本科研业务费专项项目(No. JUSRP51401A)

*通讯作者: E-mail: liuxiuxia@jiangnan.edu.cn; 白仲虎: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

共同第一作者

收稿日期: 2015-11-25; 接受日期: 2016-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-11

and expression of their coding genes under different DO level. Meanwhile, the effect of different DO level on energy metabolism was analyzed by detecting the content of cellular reducing power and ATP. **[Results]** DO level affected metabolism in *C. glutamicum* and the content of organic acids and amino acids was also changed. Especially under low DO level, cellular oxidative phosphorylation was weakened, resulting in the decrease of ATP provided for life activity. Therefore, the excessive substrate-level phosphorylation was needed to generate ATP for meeting the demand of life activity. In this case, the accumulation of cellular NADH increased; the flow of TCA cycle decreased and switched to the glycolysis pathway and glyoxylate cycle. As a result, a variety of organic acids and amino acids was generated, including lactate, valine and leucine and so on, which can further influence the production of target product under zero dissolved oxygen concentration. **[Conclusion]** The results are of certain guiding significance for taking further measures to optimize the control strategy of dissolved oxygen and improve product yield in fermentation of *Corynebacterium glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Dissolved oxygen, Metabolites, Enzyme activities, Key genes

谷氨酸棒杆菌是一种兼性厌氧、快速生长的革兰氏阳性菌, 1957 年首次从自然界中被分离得到, 因其过量合成谷氨酸的能力^[1]而被命名为谷氨酸棒杆菌。谷氨酸棒杆菌是氨基酸合成的重要菌株之一, 应用于氨基酸、核苷酸、生物塑料等的工业化生产, 有无孢子产生、不分泌胞外蛋白酶、转录组稳定等优点被广泛应用于代谢工程方面^[2]。

谷氨酸棒杆菌的发酵水平已经达到了一个非常高的程度, 要进一步提高有较大的困难。谷氨酸棒杆菌在发酵的过程中, 通过复杂的方式摄取碳源、氮源、氧气等营养物质来生产目的产物, 同时也有其他副产物伴随产生, 从而导致代谢的损失^[3]。影响各代谢支路的因素有很多, 包括溶氧、温度、pH、补料添加等, Dominguez 等^[4] 1993 年首次发现在溶氧不足时, 谷氨酸棒杆菌 ATCC17965 大量积累乳酸、琥珀酸和乙酸。研究表明氧气作为一种重要的代谢底物, 是发酵过程中重要的控制参数, 不同溶氧条件下, 其代谢流分布也不同, 不同生长阶段对溶氧的需求量也不同^[5]。另外酶的调节和氧化还原平衡也是两个重要的影响代谢的因素。其中酶的调节是最基本的代谢调节, 直接影响代谢路径的通量; 而氧化还原平衡是重要的约束因素^[6]。目前, 溶氧影响谷氨酸棒杆菌代谢的具体调控机制还没有被详细阐述,

李智涛等^[6]建立了谷氨酸棒杆菌 S9114 在不同溶氧条件下发酵生产谷氨酸的代谢流平衡模型。如果能监测代谢过程中中间代谢物和关键酶酶活的变化, 具体分析溶氧等条件发酵代谢的影响, 对于进一步采取措施优化溶氧的控制策略, 提高目的产物的产量具有指导意义。

本文对谷氨酸棒杆菌分别控制 0、30%、50% 3 种溶氧水平进行发酵, 研究发酵过程中的关键物质和酶活代谢的变化, 通过荧光定量 PCR 检测了关键途径中重要基因的表达情况, 以便优化菌株细胞中能量代谢与物质代谢途径, 使已有菌株的代谢流分布向有利于目的产物生成的方向移动提供了参考, 以较低的成本实现发酵水平的提高。

1 材料与方法

1.1 菌株

由实验室保藏的谷氨酸棒杆菌命名为 BZH 001, 2014 年 1 月复筛活化, -70°C 保藏。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 酵母粉 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, 1×10^5 Pa 饱和蒸气灭菌 20 min。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 1.0, 尿素 2.0, 玉米浆 30.0, 硫酸铵 20.0, pH 6.8–7.0, 1×10^5 Pa 饱和蒸气灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30.0, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 1.0, 玉米浆 15.0, 硫酸铵 20.0, 消泡剂万分之 0.5, pH 6.8–7.0, 1×10^5 Pa 饱和蒸气灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

L-谷氨酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、琥珀酸、异柠檬酸三钠、乙醛酸钠、乙酰辅酶 A、 NAD^+ 、NADH、ATP、苹果酸脱氢酶、乙醇脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶均为色谱纯, 美国 Sigma 公司; 乳酸、丙酮酸、甲醇等均为国产优级纯试剂; ATP 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测, 上海碧云天生物技术有限公司。

Applikon EZ-control 5 L 发酵罐, 荷兰 Applikon Biotechnology 公司; 安捷伦 1200 液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; 超纯水系统, 上海瑞枫生物科技有限公司; 紫外分光光度计, 上海精密仪器仪表有限公司; 化学发光免疫分析仪, 厦门天中达生物科技有限公司; Precellys 24 生物样品均质器, 法国 Bertin Technologies 公司; 高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher 公司; StepOnePlus™ 荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 美国应用生物系统公司。

1.4 培养方法

1.4.1 种子培养: -70°C 保藏甘油管一只, 倒入装有 30 mL 一级种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 30°C 、230 r/min 培养 12 h, 按 10% 接种量接于装有 200 mL 二级种子培养基的 1 000 mL 带挡板摇瓶中, 30°C 、230 r/min 培养 12 h, 镜检细胞无杂菌。

1.4.2 发酵培养: 在 5 L 发酵罐中, 30°C 下进行, 实际发酵液量在 2.0 L 左右, 调节搅拌速度分别控制溶氧在 0、30%、50%, 重复发酵 3 次。自动添加 17% 磷酸、纯氨水, 维持 pH 在 6.8 左右, 补料 300 g/L 葡萄糖, 并在 20 h 时以 4 mL/h 速度添加。

1.5 分析方法

1.5.1 菌浓、残糖、总蛋白的测定: 菌浓采用吸光度法测定, 葡萄糖的测定参照 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)^[7], 总蛋白参照 Bradford 方法^[7]。

1.5.2 氨基酸、有机酸测定: 参照刘志成等^[8]的测定方法。色谱柱采用安捷伦 Agilent 1260, Hypersil GOLD (C_{18}) 250 mm \times 4 mm \times 5 μm , 紫外检测器; 检测波长 215 nm; 柱温 30°C ; 进样量 20 μL ; 流动相: 0.01 mol/L KH_2PO_4 (pH 2.5): 甲醇=97:3; 流速: 0.60 mL/min。

1.5.3 酶活测定: 粗酶液提取方法。细胞的收获: 取发酵液 1 mL, 8 000 r/min 离心 5 min, 用浓度 0.2% KCl 洗涤 3 次, 洗涤后可于 -20°C 中保存。

酶蛋白提取。将收获的细胞重悬于 1 mL 的 pH 7.5、含浓度 30% 甘油的 50 mmol/L Tris-HCl 中。采用高通量破碎法破碎细胞, 6 200 r/min 工作 20 s, 液氮放置 30 s, 重复 10 次。于 4°C 、10 000 r/min 离心 15 min, 上清即为粗酶液。测总蛋白后置于冰上待测各酶活性。此外, 可将酶液 -20°C 保存。

谷氨酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶活性检测。参照余秉琦等^[9]和阮红^[10]的测定方法。

丙酮酸羧化酶活性检测。参照郜培等^[11]的测定方法。

1.5.4 NAD^+/NADH 、 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 测定: 参考文献^[12]。取 1 mL 菌液, 8 000 r/min 离心 5 min, 去上清, PBS 洗 3 遍, 再重悬, 用高通量破碎仪破碎, 同 1.5.3。

ATP 测定: 由碧云天 ATP 检测试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测, ATP 是根据萤火虫荧光素酶催化荧光素产生荧光时需要 ATP 提供能量测定。

1.5.5 总 RNA 提取及 RT-PCR 验证: TRIzol 法提取 RNA^[13], 反转录成 cDNA, AB Applied Biosystems 使用说明书进行 qRT-PCR。选取了主要代谢途径中的 7 个关键基因进行表达分析, 根据 NCBI 上提供的目的基因的碱基序列设计了本实验中的特异性引物序列(表 1)。

2 结果与分析

2.1 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌菌体生长、耗糖的影响

溶氧对于菌体的生长有很大的影响, 在生长期必需满足菌体呼吸的需氧量, 若得不到满足,

表 1 Real-time PCR 所用的特异性引物
Table 1 The special primers used for real-time PCR

基因名称	序列
Gene symbol	Sequence (5'→3')
NCgl0909	FR ATGATGCTGACCACCCACTACC CACGAAACTGATGATCGACTTCTC
NCgl2247	FR AGAAGCAATCCTGCTGGAACCC GGTGTGAGTCCGAACAGTTAGAG
NCgl2008	FR GCCGTGCAGTCGGTATTCTC GCGTTCCTCTACATCGTCAA
NCgl2810	FR GCGAACTCTACGAAGTGGCA CCTTGGCGTCGATAATGTG
NCgl2167	FR AGCCCTCGGATGACTCTAA ACGACGGTAACGCTTCTC
NCgl2248	FR GCGTTCGCTCTGAGTTCCC CCATTGCGCCGAGTTCCTT
NCgl1858	FR CTTGAAGCATTCCAGAGTC CCATTGGAGCCATAACCC

则菌体呼吸受到影响进而抑制生长。图 1 是 3 种溶氧水平下发酵过程中的菌浓、干重及残糖的变化曲线图。

从图 1A 可以看出，3 种溶氧条件下发酵初期生长迅速，0 溶氧下菌体在 20 h 进入平稳期后菌浓

基本保持不变，可见生长期被延长，代谢较缓慢。而 DO 为 30%和 50%下菌体在生长后期开始衰亡，菌浓差异不大，但是在氧气进一步限制的条件下(0)，最高菌浓仅为高溶氧条件下的 44.7%。可见，溶氧对于菌体的生长有很大的影响，前期低溶氧抑制菌体的生长，而中后期高溶氧不利于菌体的存活。可能是因为发酵前期菌体大量繁殖，需氧量也很大，但随着菌浓的升高，细胞繁殖到一定浓度，开始衰老，呼吸强度也下降，所以需氧量也下降。另外，产酸中后期，高溶氧剧烈的通气和搅拌会加剧菌体的死亡速度和发酵活性的衰减^[14]。

如图 1B 所示，不同溶氧下相应的菌体干重也有差别，但变化趋势和菌浓相似，DO 为 0 时后期的菌体干重也相应地保持平稳，谷氨酸棒杆菌是兼性厌氧菌，因此在氧限制的条件下仍可生长。进一步分析耗糖情况，发现 0 溶氧条件下发酵初期

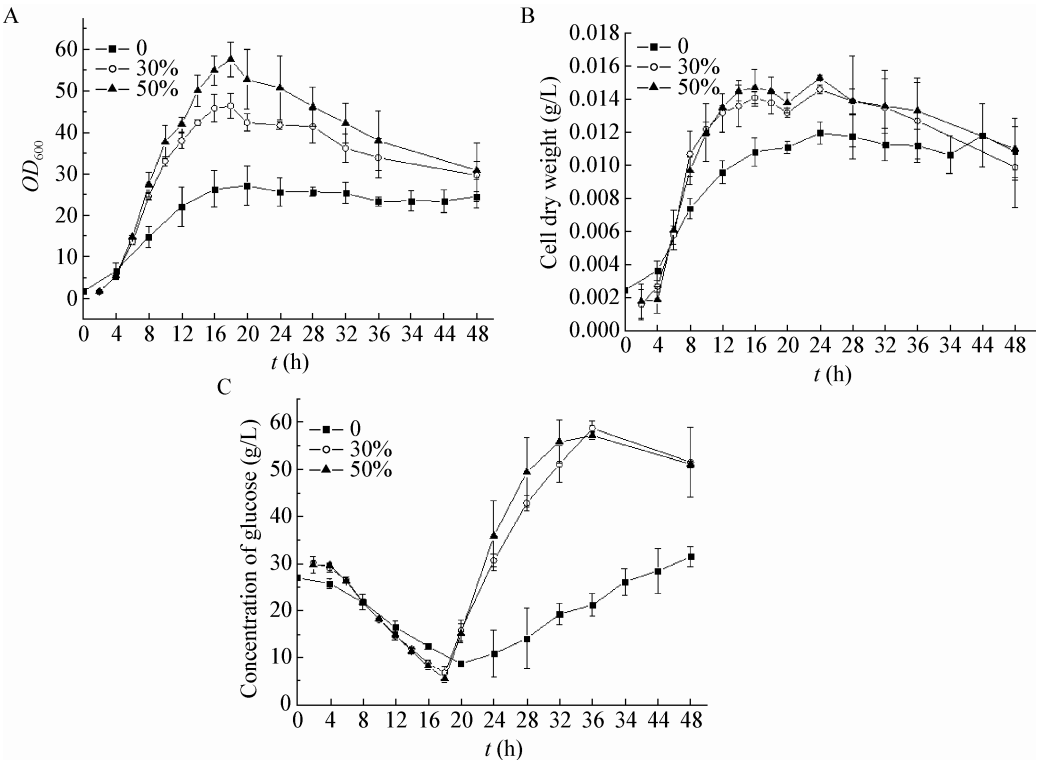


图 1 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌菌浓、干重及残糖的变化影响

Figure 1 Profiles of regular parameters under different dissolved oxygen concentrations

注：A：不同溶氧条件下 OD_{600} 的变化；B：不同溶氧条件下的细胞干重(CDW)；C：不同溶氧条件下的残糖含量。
Note: A: Changes of OD_{600} under different dissolved oxygen concentrations; B: Changes of cell dry weight under different dissolved oxygen concentrations; C: Concentration of glucose under different dissolved oxygen concentrations.

比高溶氧的耗糖速率慢,到 20 h 时含糖量都已达到 10.00 g/L 以下。发酵后期 0 溶氧条件下的耗糖速度加快,可能是因为 TCA 氧化途径反应停滞,糖酵解途径加强,从而表现为耗糖加快^[14]。

2.2 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌生产氨基酸、有机酸的影响

谷氨酸棒杆菌代谢支路会受溶氧的影响而改变,氨基酸有机酸的产量也会改变。如图 2A 可知,在 3 种溶氧水平下,胞内谷氨酸含量相对于其他氨基酸都较高。30%溶氧条件下 8 h 之后谷氨酸迅速增加,而 50%溶氧条件下在 16 h 之后才逐渐增加,与谷氨酸脱氢酶活性变化趋势相似,进入

稳定期后产量维持在 0.60–0.75 g/L 之间。在 30%和 50%溶氧条件下,胞外谷氨酸含量均高于 0 条件下,与胞内相反,可能是由于高溶氧条件下呼吸强度高,TCA 循环加强,合成代谢也相应增强。这种情况可以看出 0 溶氧条件下谷氨酸大部分都没有分泌到胞外而滞留在细胞内,这除了与外界渗透压、电化学介质和胞内产物积累有关^[15],也可能与 0 溶氧条件下使谷氨酸棒状杆菌谷氨酸跨膜转运弱化有关。

如图 2B 所示,在溶氧 0 的条件下能检测到,而在 30%和 50%溶氧条件下检测不到胞内外氨基酸含量变化。由图 2B 可知,胞内外的精氨酸含量都

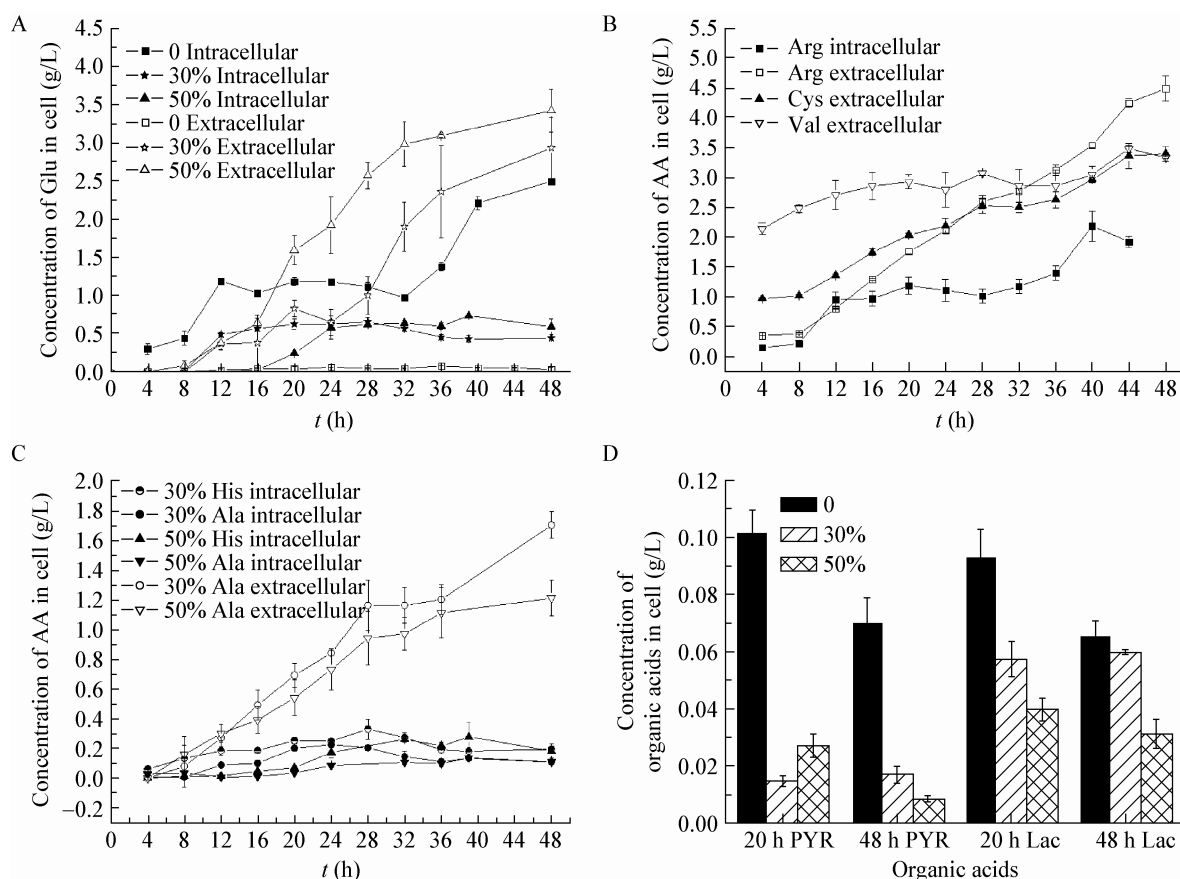


图 2 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌胞内外物质的影响

Figure 2 Profiles of intracellular and extracellular metabolites under different dissolved oxygen concentrations

注: A: 不同溶氧条件下胞内外谷氨酸的含量变化; B: 溶氧为 0 情况下检测的胞内外氨基酸的含量变化; C: 溶氧为 30%、50%情况下检测的胞内外氨基酸的含量变化; D: 不同溶氧条件下检测的胞内有机酸(PYR: 丙酮酸; Lac: 乳酸)的含量变化。

Note: A: The content of intracellular and extracellular glutamate under different dissolved oxygen concentrations; B: The content of intracellular and extracellular AA under 0 dissolved oxygen concentrations; C: The content of intracellular and extracellular AA under 30% and 50% dissolved oxygen concentrations; D: The content of intracellular and extracellular organic acids under different dissolved oxygen concentrations.

很高, 从 8 h 开始生成速率迅速加快, 20 h 达到 1.29 g/L 左右, 最终达到 4.50 g/L。另外胞外缬氨酸和半胱氨酸含量也很高, 其他的氨基酸包括亮氨酸、酪氨酸等都有一定的存在, 但含量不高(图中未显示)。这些氨基酸大多是由 TCA 循环外的丙酮酸、磷酸烯醇式丙酮酸等为底物合成的, 可以进一步验证 TCA 循环的碳外溢。与之不同, 图 2C 所示, 在 DO 为 30% 和 50% 的情况下, 胞内外主要产生组氨酸、丙氨酸等, 丙氨酸直接由丙酮酸与谷氨酸转氨基形成, 所以这两种情况下丙氨酸随着谷氨酸的含量升高而相应升高。0 溶氧条件下更容易生成一些杂酸, 对于菌株生产某一目的产物不利。

除氨基酸之外, 在细胞内还检测到乳酸等有机酸, 发现乳酸与其他物质相比含量最高, 可见其是生产目的产物时的主要副产物。由图 2D 可知, 0 溶氧情况下 20 h 和 48 h 最后积累的乳酸比高溶氧情况下多, 丙酮酸含量也较高。这是由于低溶氧情况下糖酵解途径加强, 转向乳酸的生成和 TCA 还原臂^[16]上有机酸的生成。

2.3 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌关键酶活的影响

酶活性是反映代谢途径强弱的标志之一, 酶的调节直接影响代谢路径的通量, 由酶活性的变化可以间接得出代谢途径的强弱^[11], 所以在发酵过程中测定了相关的酶活。

如图 3A 所示, 丙酮酸羧化酶催化丙酮酸生成草酰乙酸, 30% 和 50% 菌体生长迅速, 进入生长对数期后, TCA 循环通量加大, 需要大量的草酰乙酸维持, 所以丙酮酸羧化酶酶活性迅速升高, 最高达到 0.10 U/mg。谷氨酸棒杆菌在发酵的过程中, 为保持柠檬酸循环的正常运转, 失去的中间产物必需及时补充。其中最重要的添补反应是由丙酮酸羧化酶催化的, 循环中的任何一种中间产物缺乏都会引起乙酰-CoA 浓度的升高, 从而激活丙酮酸羧化酶促使草酰乙酸增加^[17]。所以高溶氧的情况下, 菌体 TCA 循环代谢较快, 中间产物消

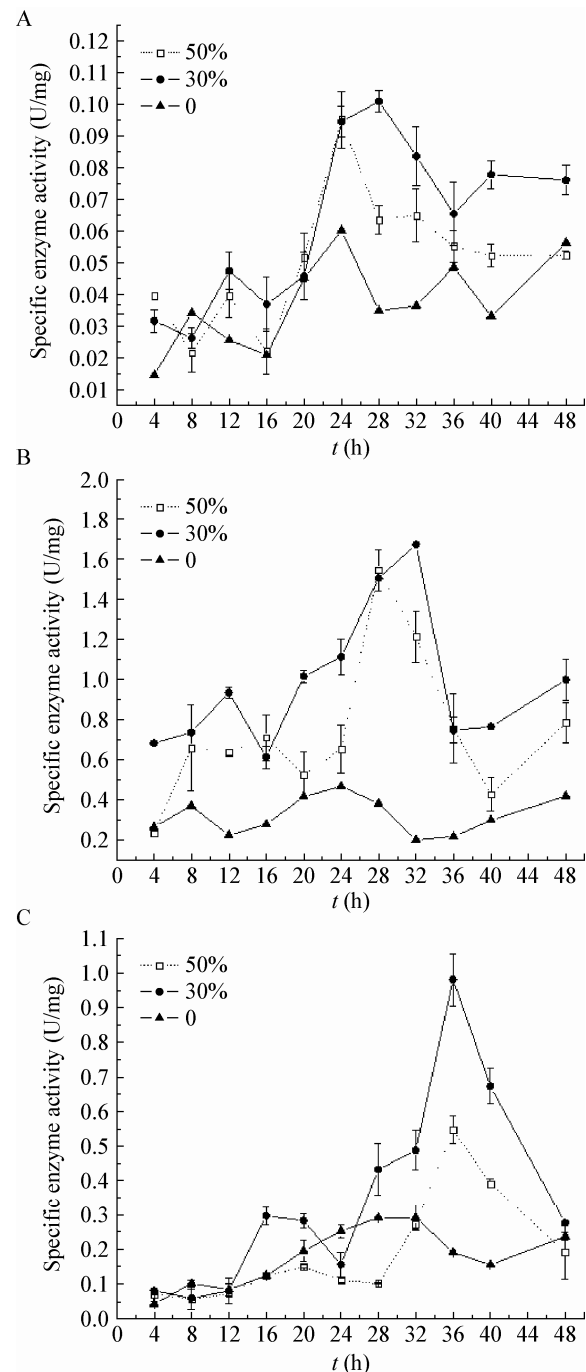


图 3 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌胞内酶活的影响

Figure 3 Profiles of enzyme activities under different dissolved oxygen concentrations

注: A: 不同溶氧条件下丙酮酸羧化酶的酶活变化; B: 不同溶氧条件下异柠檬酸脱氢酶的酶活变化; C: 不同溶氧条件下谷氨酸脱氢酶的酶活变化。

Note: A: Changes of PC activities under different dissolved oxygen concentrations; B: Changes of ICDH activities under different dissolved oxygen concentrations; C: Changes of GDH activities under different dissolved oxygen concentrations.

耗大,引起丙酮酸羧化酶酶活的升高,而低溶氧情况则相反。

如图 3B、C 所示,异柠檬酸脱氢酶是三羧酸循环中的一个重要的酶,催化异柠檬酸脱羧生成 α -酮戊二酸,谷氨酸脱氢酶是催化 α -酮戊二酸生成谷氨酸的酶。发现低溶氧下(0)谷氨酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶活性较低,30%和 50%情况下谷氨酸脱氢酶酶活变化规律大致相同,从 12 h 酶活性提高,相应的谷氨酸的生产量也从 12–14 h 增加,但 DO 为 50%时酶活总体又比 30%的低,因为供氧过量的情况下不利于 α -酮戊二酸进一步还原氨基化合成谷氨酸^[18]。在发酵初期(8–16 h)代谢更多地流向乙醛酸循环,产酸期(20 h)后,碳源流向乙醛酸循环的量减少,从而异柠檬酸脱氢酶被激活^[18],在 32 h 时 DO 为 30%条件下达到 1.67 U/mg,异柠檬酸更多地转化成 α -酮戊二酸。乙醛酸循环是 TCA 循环补充四碳二羧酸的途径之一,菌体生长期需要它提供部分能量和生物合成反应所需的中间产物,从三羧酸循环中的异柠檬酸出发,由异柠檬酸裂解酶与异柠檬酸脱氢酶竞争底物异柠檬酸^[18]。

2.4 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌能量代谢的影响

溶氧对谷氨酸棒杆菌发酵过程的调控实际是对胞内能量水平的调控,并影响胞内 NADH 的再

氧化途径,能量和 NADH 协同影响各个胞内生物反应过程^[19]。胞内氧化还原平衡对细胞代谢起着重要的约束作用,特别是在溶氧限制的情况下,胞内 NADH 不能被呼吸链及时消耗而大量积累, TCA 循环基本处于关闭状态,代谢流向还原路径分流^[2]。

如图 4A 所示,高溶氧下 NAD^+/NADH 比值较高,最高达到 27.77,30%和 50%溶氧下整个发酵过程比值都在 1 以上。而低溶氧下,氧化还原电势较高,处于还原态,另外 NADH 是乳酸脱氢酶催化丙酮酸生成乳酸的辅因子。溶氧为 0 的情况下,有利于乳酸脱氢酶活性升高,从而使乳酸积累。同时,高氧化还原电势会抑制 TCA 循环,使柠檬酸和 α -酮戊二酸的量减少,继而谷氨酸的产量也下降^[2]。

谷氨酸棒杆菌在代谢过程中伴随物质代谢的氧化还原,电子最终传给氧,一部分以热的形式释放到环境中,一部分以化学能的形式储存在能量载体内,形成细胞可以直接利用的生物能——ATP^[15]。如图 4B 所示,50%的溶氧条件下 ATP 含量最高,从 8 h 开始含量迅速提高,充足的 ATP 供给细胞正常代谢,但氧化磷酸化也会分配大量的 NADH。过低的溶氧(0)会导致胞内 ATP 供应不足,细胞会更多地进行底物水平磷酸化以合成

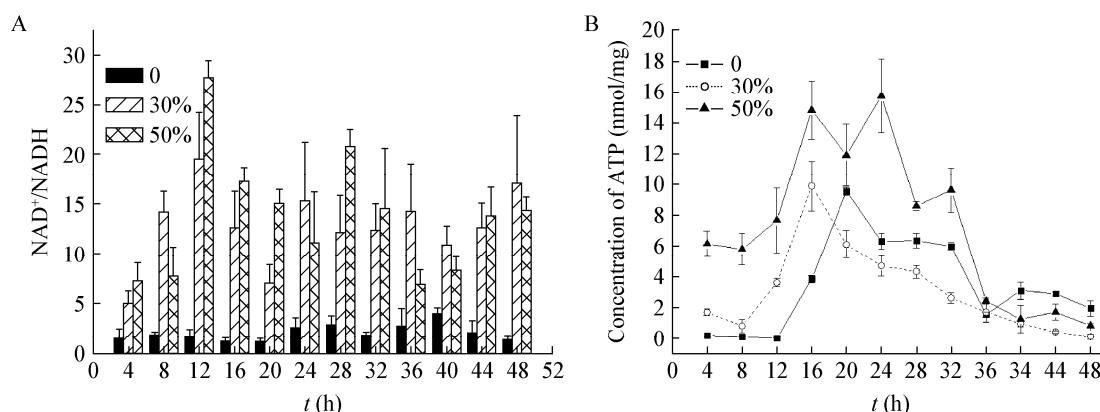


图 4 不同溶氧下谷氨酸棒杆菌胞内氧化还原力和 ATP 的情况

Figure 4 Profiles of intracellular redox potential and ATP under different dissolved oxygen concentrations

注: A: 不同溶氧条件下胞内 NAD^+/NADH 变化; B: 不同溶氧条件下胞内每 mg 蛋白 ATP 含量的变化。

Note: A: Changes of intracellular NAD^+/NADH under different dissolved oxygen concentrations; B: Changes of ATP content per mg protein under different dissolved oxygen concentrations.

充足的 ATP,但在丙酮酸的溢流压力下细胞会通过生成副产物来加以释放^[19]。对于细胞合成而言,需要大量 ATP 和 NADH,高 DO 下,细胞生长速度加快,产生更多的 ATP,导致 NADH 的大量合成,因此,在较高的 ATP 和 NADH 通量下细胞生长得到促进。

2.5 关键基因的表达分析

在谷氨酸棒杆菌的发酵过程中,酶活影响代谢途径的流向及速度,而基因指导蛋白即酶的合成。如图 5 所示,通过荧光定量 PCR 检测了关键途径重要基因的表达情况,模板 cDNA 是由 20 h 菌体提取总 RNA 反转录获得。

NCgl2008 和 NCgl2810^[20]在溶氧 0 的条件下表达较高,NCgl2008 基因编码丙酮酸激酶,是糖酵解过程中的主要限速酶之一,催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸,该基因表达上调进一步证明了低溶氧下糖酵解途径增强。NCgl2810 基因编码乳酸脱氢酶,催化丙酮酸生成乳酸,低溶氧下该基因表达量提高促使乳酸合成增强。而 NCgl2167 是编码丙酮酸脱氢酶的基因,其在溶氧 30%时表达最高,由此说明 C 源主要进入 TCA 循环,而特别在溶氧 0 时酶活最低,进一步证明 C 源的外溢。

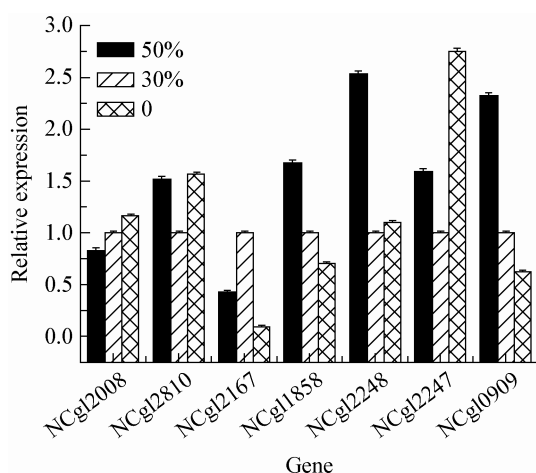


图 5 关键差异基因的荧光定量 PCR 验证

Figure 5 The expression of differential expression genes verified by real-time PCR

NCgl1858^[21]是编码磷酸烯醇丙酮酸激酶的关键基因,草酰乙酸在此酶的催化下转变为磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳。在糖异生作用中,与丙酮酸羧化酶一起构成了从丙酮酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸的迂回步骤,用以补充高溶氧情况下 TCA 循环的消耗。NCgl2248^[22]及 NCgl2247^[23]分别编码异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶,是参与乙醛酸循环必不可少的酶,而乙醛酸循环途径是 TCA 循环补充四碳二羧酸的途径之一。它的表达量在高溶解氧和低溶解氧条件下都高于 30%溶氧条件下,可能因为高溶氧下菌体代谢旺盛,需要乙醛酸循环补充必要的中间产物,而在 0 溶氧条件下,乙醛酸循环生成的苹果酸则进入到 TCA 循环还原臂途径。

NCgl0909 在 50%和 30%的情况下都比 0 时表达高,NCgl0909 是编码 abc 转运蛋白腺苷三磷酸酶的基因,它利用 ATP 的能量对溶质中各种生物分子包括糖、氨基酸、金属离子、多肽、蛋白质、细胞代谢产物等进行跨膜运输,所以高溶氧情况下酶活较高,跨膜运输相对阻碍更小,胞内产生的一些代谢物质更容易被分泌到胞外^[20]。

3 讨论与结论

本文以谷氨酸棒杆菌为研究对象,分析了在 0、30%、50% 3 种不同溶氧条件下发酵过程胞内外中间代谢物和关键酶活性的变化情况。结果表明,在溶氧相对较高的条件下,菌体生长较快,但后期衰亡也很迅速。在低溶氧条件下(0),菌体生长受到抑制,最高菌浓仅为高溶氧条件下的 44.7%。因此在优化策略上可以在菌体的快速生长期提高溶氧水平加快细胞合成速率,使菌体充分生长;当进入产物的合成期后,降低溶氧水平控制细胞生长速率,使 C 源更多流向产物的合成。

溶氧对谷氨酸棒杆菌的代谢有较大影响,特别是在低溶氧(0)情况下,代谢途径发生显著的改变。如图 6 所示,丙酮酸进入 TCA 循环之后的中间产物含量及相关酶活都变低了,如丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、胞内柠檬酸、 α -酮戊二酸和

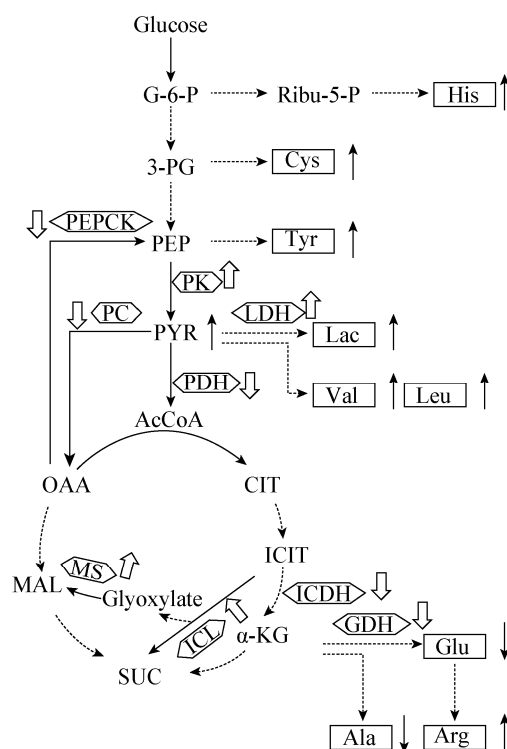


图6 谷氨酸棒杆菌在低溶氧0条件下的代谢迁移

Figure 6 Metabolic shift of *Corynebacterium glutamicum* under 0 dissolved oxygen concentration

注：多边形内代表途径中关键的酶，空心箭头分别表示酶活的提高及下降；长方形内代表途径中代谢产物，实心箭头分别表示产量的提高和下降。

Note: The polygonal boxed enzyme, and the hollow arrows indicate significantly up- and down-regulated enzyme activities, respectively; The square boxed is on behalf of metabolites, and the solid arrows indicate the production of significantly up- and down-regulated metabolites, respectively. G-6-P: Glucose-6-phosphate; Ribu-5-P: Ribulose-5-Phosphate; 3-PG: 3-Phosphoglycerate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PK: Pyruvate kinase; PYR: Pyruvate; LDH: Lactate dehydrogenase; Lac: Lactate; PDH: Pyruvate dehydrogenase; AcCoA: Acetyl-CoA; PC: Pyruvic carboxylase; PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; OAA: Oxalacetic acid; CIT: Citrate; ICIT: Isocitrate; ICDH: Isocitrate dehydrogenase; α -KG: α -Ketoglutarate; GDH: Glutamate dehydrogenase; GLT: Glutamate; Suc: Succinate; Fum: Fumarate; MAL: Malate; ICL: Isocitrate lyase; MS: Malate synthase.

琥珀酸少有积累，而由 α -酮戊二酸生成的谷氨酸、丙氨酸含量也相应减少。但由谷氨酸生成的精氨酸含量较高，可能因为细胞膜上的转移酶含量低，谷氨酸无法分泌到胞外而转向精氨酸的合成。另外丙酮酸羧化酶酶活降低，丙酮酸的含量因此累积，不足以平衡葡萄糖酵解速率，所以TCA的碳源外溢到糖酵解、乙醛酸循环、TCA循

环还原臂等不需氧气的途径。因此，由丙酮酸生成的乳酸、缬氨酸、亮氨酸，由磷酸烯醇式丙酮酸生成的酪氨酸，由甘油酸-3-磷酸生成的半胱氨酸，由核酮糖-5-磷酸生成的组氨酸等，在0溶氧情况下的含量高很多。此外，乙醛酸循环途径生成的苹果酸进入到TCA循环还原臂途径，此路径上的有机酸、氨基酸含量也相应升高，这些都会成为发酵的主要副产物，由此可以看出在DO为0的情况下易生成杂酸，不利于目的产物产量的提高。

综上，溶氧的高低对于谷氨酸棒杆菌的代谢有很大的影响^[14]，较低溶氧(0)下，TCA循环代谢流量减小，而转向糖酵解、乙醛酸循环等，生成多种杂酸而影响目的产物的产量。研究结果对于进一步采取措施优化溶氧的控制策略、提高目的产物的产量具有指导意义。此外通过基因组测序分析挖掘关键代谢基因，对谷氨酸棒杆菌基因组进行改造验证，优化代谢途径，使代谢流分布向有利于目的产物生成的方向移动提供了参考，以较低的成本实现发酵水平的提高^[4,24]。

参考文献

- [1] Hasegawa S, Suda M, Uematsu K, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(4): 1250-1257
- [2] Liu J, Zhao C, Chu J, et al. Influence of dissolved oxygen on metabolism of glutamic acid biosynthesis by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2012, 38(4): 459-464 (in Chinese)
- 刘剑, 赵策, 储炬, 等. 溶氧对谷氨酸棒杆菌发酵产谷氨酸代谢的影响[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2012, 38(4): 459-464
- [3] Lee JY, Seo J, Kim ES, et al. Adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* resistant to oxidative stress and its global gene expression profiling[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(5): 709-717
- [4] Dominguez H, Nezondet C, Lindley ND, et al. Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium-glutamicum* and the consequences for amino-acid overproduction[J]. Biotechnology Letters, 1993, 15(5): 449-454
- [5] Mentz A, Neshat A, Pfeifer-Sancar K, et al. Comprehensive discovery and characterization of small RNAs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 714
- [6] Li ZT, Lu ZH, Lü YY, et al. The influence of different oxygen supply conditions to the metabolic flux of L-glutamic acid biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* S9114[J]. China Brewing, 2010(10): 72-76 (in Chinese)
- 李智涛, 卢志洪, 吕扬勇, 等. 谷氨酸棒杆菌 S9114 在不同溶

- 氧条件下发酵生产谷氨酸的代谢流分析[J]. 中国酿造, 2010(10): 72-76
- [7] Lu ZH, Liu ZC, Zheng SP. Analysis of metabolites and changes in enzyme activities in the glutamate fermentation under different dissolved oxygen concentration[J]. China Brewing, 2010(6): 28-31 (in Chinese)
卢志洪, 刘志成, 郑穗平. 不同溶氧条件下谷氨酸棒杆菌发酵过程代谢物及关键酶活分析[J]. 中国酿造, 2010(6): 28-31
- [8] Liu ZC, Zheng SP. Determination of organic acid in glutamic acid fermentation by HPLC[J]. China Brewing, 2009(3): 154-157 (in Chinese)
刘志成, 郑穗平. HPLC 法测定谷氨酸发酵中有机酸含量的方法研究[J]. 中国酿造, 2009(3): 154-157
- [9] Yu BQ, Zhu J, He YC, et al. Effect of ICL, ICDH, ODH and GDH on L-glutamate production[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(30): 16725-16727, 16730 (in Chinese)
余秉琦, 朱劼, 何玉财, 等. ICL、ICDH、ODH 和 GDH 酶与 L-谷氨酸的合成[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16725-16727, 16730
- [10] Ruan H. Studies on the regulation of acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2001 (in Chinese)
阮红. 谷氨酸棒状杆菌乙酸代谢调控的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2001
- [11] Gao P, Lu JB, Duan ZY, et al. Effects of dissolved oxygen on the key enzymes in glutamate fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(10): 72-75 (in Chinese)
郜培, 陆静波, 段作营, 等. 溶氧浓度对谷氨酸发酵关键酶的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 72-75
- [12] Li LB, Wang YH, Zhuang YP, et al. Determination of coenzyme NAD^+ and NADH of *Saccharomyces cerevisiae* cells in ethanol production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(2): 287-294 (in Chinese)
李骆冰, 王永红, 庄英萍, 等. 乙醇发酵中酿酒酵母辅酶 NAD^+ 及 NADH 测定方法[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(2): 287-294
- [13] Wang AP, Zhao YY, Liu X, et al. Verification of differential expression genes after CacyBP/SIP nuclear translocation in colon carcinoma cell line[J]. Tianjin Medical Journal, 2014, 42(5): 410-413 (in Chinese)
王安萍, 赵盈盈, 刘欣, 等. 人结肠癌细胞中 CacyBP/SIP 核转位差异表达基因的验证[J]. 天津医药, 2014, 42(5): 410-413
- [14] Yamamoto S, Sakai M, Inui M, et al. Diversity of metabolic shift in response to oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum* and its close relatives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 1051-1061
- [15] Wang WW. Microbial Physiology[M]. Beijing: Science Press, 2008: 45-49 (in Chinese)
王卫卫. 微生物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 45-49
- [16] Zhang YX, Wang J, Wang D, et al. Advancement in genetic engineering for production of succinic acid by *Escherichia coli*[J]. China Biotechnology, 2009, 29(7): 108-117 (in Chinese)
张玉秀, 王姣, 王丹, 等. 大肠杆菌产琥珀酸基因工程研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(7): 108-117
- [17] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Essential Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2008: 344-346 (in Chinese)
王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学教程[M]. 北京: 高等教育出版, 2008: 344-346
- [18] Yu BQ, Shen W, Wang ZX, et al. Glyoxylate cycle is required for the overproduction of glutamate but is not essential for *Corynebacterium glutamicum* growth on glucose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(2): 270-274 (in Chinese)
余秉琦, 沈微, 王正祥, 等. 谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环与谷氨酸合成[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 270-274
- [19] Jiao C. Regulate mechanism of dissolved oxygen (DO) on the glycerol fermentation by *Candida glycerinogenes*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
焦策. 溶氧对 *Candida glycerinogenes* 产甘油发酵的调控机理研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012
- [20] Silberbach M, Schäfer M, Hüser AT, et al. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2391-2402
- [21] Kotrba P, Inui M, Yukawa H. The *ptsI* gene encoding enzyme I of the phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 289(5): 1307-1313
- [22] Inui M, Murakami S, Okino S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2004, 7(4): 182-196
- [23] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(2/3): 99-109
- [24] Kaß F, Hariskos I, Michel A, et al. Assessment of robustness against dissolved oxygen/substrate oscillations for *C. glutamicum* DM1933 in two-compartment bioreactor[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(6): 1151-1162