

# 嗜乙酰乙酸棒杆菌 *Corynebacterium acetoacidophilum*- $\Delta$ ldh 缺氧条件下代谢葡萄糖途径的变化

杨倩, 郑璞, 于芳, 刘伟, 孙志浩

江南大学生物工程学院 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

杨倩, 郑璞, 于芳, 等. 嗜乙酰乙酸棒杆菌 *Corynebacterium acetoacidophilum*- $\Delta$ ldh 缺氧条件下代谢葡萄糖途径的变化. 生物工程学报, 2014, 30(3): 435-444.

Yang Q, Zheng P, Yu F, et al. Metabolic shift of *Corynebacterium acetoacidophilum*- $\Delta$ ldh under oxygen deprivation conditions. Chin J Biotech, 2014, 30(3): 435-444.

**摘要:** 缺氧条件下嗜乙酰乙酸棒杆菌 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870 生长停滞, 却能够代谢葡萄糖产生以乳酸和琥珀酸为主的有机酸。采用以 *sacB* 基因为反向筛选标记的同源重组染色体基因敲除系统, 敲除嗜乙酰乙酸棒杆菌的乳酸脱氢酶基因, 得到的  $\Delta$ ldh 菌株 CCTCC NO. M20122041 在缺氧条件下不产乳酸, 葡萄糖消耗速率降低了 29.3%, 产琥珀酸和乙酸浓度分别提高 45.6% 和 182%; NADH/NAD<sup>+</sup> 值小于 1 (约 0.7); 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和乙酸激酶的比酶活分别提高 84% 和 12 倍。说明嗜乙酰乙酸棒杆菌中乳酸合成途径的阻断驱使了琥珀酸和乙酸代谢途径加强, 推测加强 NADH 供给和阻断乙酸产生支路可能是提高 *C. acetoacidophilum* 菌株产琥珀酸产量的有效途径。

**关键词:** 嗜乙酰乙酸棒杆菌, *ldhA*-敲除菌, 缺氧, 琥珀酸, 代谢途径

## Metabolic shift of *Corynebacterium acetoacidophilum*- $\Delta$ ldh under oxygen deprivation conditions

Qian Yang, Pu Zheng, Fang Yu, Wei Liu, and Zhihao Sun

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Lactate and succinate were produced by *Corynebacterium acetoacidophilum* from glucose under oxygen

**Received:** July 30, 2013; **Accepted:** September 16, 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020301-012).

**Corresponding author:** Pu Zheng. Tel: +86-510-85918252; E-mail: zhengpu@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA020301-012) 资助。

deprivation conditions. To construct knockout mutant, lactate dehydrogenase gene (*ldh*) of *C. acetoacidophilum* was deleted by double-crossover chromosome replacement with *sacB* gene. Comparing with the wild strain ATCC13870, *ldhA*-deficient mutant produced no lactate with glucose consumption rate decreased by 29.3%, while succinate and acetate concentrations were increased by 45.6% and 182%, respectively. Moreover, the NADH/NAD<sup>+</sup> rate was less than 1 (about 0.7), and the activities of phosphoenolpyruvate carboxylase and acetate kinase of the *ldhA*-deficient mutant were enhanced by 84% and 12 times, respectively. Our studies show that succinate and acetate production pathways are strengthened by blocking lactate synthesis. It also suggests that improving NADH supply and eliminating acetate generation are alternative strategies to get high succinate-producer.

**Keywords:** *Corynebacterium acetoacidophilum*, *ldhA*-deficient mutant, oxygen deprivation, succinic acid, metabolic

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是微生物发酵生产氨基酸工业的经典菌种, 近年来通过代谢工程改造谷氨酸棒杆菌生产生物基化学品, 成为研究热点<sup>[1]</sup>。如以 *C. glutamicum* R 为出发菌株, 通过同时过表达甲基乙二醛合酶基因 (*mgs*) 和醛酮还原酶基因 (*CgR-2242*), 构建了生产丙二醇菌 *C. glutamicum* RP3<sup>[2]</sup>; 通过敲除乳酸脱氢酶基因 (*ldh*)、木酮糖激酶基因 (*xy1B*) 和果糖磷酸转移酶基因 (*ptsF*), 并同时过表达木糖还原酶基因 (*CtXR*), 构建了生产木糖醇菌 *C. glutamicum* CtXR7<sup>[3]</sup>; 从模式菌 *C. glutamicum* ATCC13032 出发, 用 L-赖氨酸脱羧酶基因 (*cadA*) 取代 L-高丝氨酸脱氢酶基因 (*hom*), 构建生产二元胺尸胺菌 *C. glutamicum* TM45<sup>[4]</sup>; 敲除精氨酸阻遏蛋白 (*ArgR*) 基因和鸟氨酸阻遏蛋白 (*ArgF*) 基因, 并同时过表达鸟氨酸脱羧酶基因 (*sprC*), 构建 *C. glutamicum* ORN1(pVWEx1-*speC*) 生产腐胺<sup>[5]</sup>; 过表达谷氨酸脱羧酶基因 (*gadB*), 构建 *C. glutamicum* GAD 生产丁氨酸<sup>[6]</sup>。在利用谷氨酸棒杆菌生产有机酸方面, Dominguez 等报道了在氧气供应不足条件下, 谷氨酸棒杆菌能产生少量有机酸<sup>[7]</sup>。Inui 等发现缺氧条件下谷氨酸棒杆菌不生长, 但是可以代谢葡萄糖产生以乳酸和琥珀酸为主的有机

酸, 并分析了缺氧条件下谷氨酸棒杆菌的全局代谢情况<sup>[8-9]</sup>。随后 Wendisch 等则分析大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌产有机酸和氨基酸的代谢工程策略, 认为通过基因改造的谷氨酸棒杆菌将会成为一个有前景的产有机酸的生物催化剂<sup>[10]</sup>。2008 年 Okino 等以 *C. glutamicum* R 为出发菌构建了 *C. glutamicum*Δ*ldhA*-pCRA717, 在高菌体浓度 (50 g DCW/L) 的条件下, 分批补加葡萄糖和碳酸氢钠, 琥珀酸产量达到目前报道的最高产量, 46 h 产 146 g/L<sup>[11]</sup>。2012 年 Litsanov 等研究以 *C. glutamicum* ATCC 13032 为出发菌, 构建 *C. glutamicum* BOL-3, 该菌敲除了合成乙酸的多种酶的基因, 并过表达 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*gapA*), 可产琥珀酸 134 g/L, 摩尔转化率为 1.67<sup>[12]</sup>。说明了谷氨酸棒杆菌在生产生物基琥珀酸上具有很大的应用潜力。

嗜乙酰乙酸棒杆菌 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870 也属于产谷氨酸棒杆菌<sup>[13]</sup>, 本实验室前期研究发现: 其在缺氧条件下具有一定的积累琥珀酸优势, 其中琥珀酸和乳酸积累的最高浓度分别为 22.5 g/L 与 60 g/L<sup>[14]</sup>。为消除主要的副产物——乳酸, 提高琥珀酸的产率, 本文报道了以 *C. acetoacidophilum* ATCC13870 为出发菌株, 构建敲除了乳酸脱氢酶基因的菌

株 *C. acetoacidophilum-Δldh* CCTCC NO. M20122041<sup>[15]</sup>, 并考察敲除乳酸脱氢酶基因对菌体生长、生理特性以及代谢途径的影响, 以期为实现高效生产琥珀酸提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

菌株嗜乙酰乙酸棒杆菌 *C. acetoacidophilum* ATCC13870, 由江南大学生物催化研究室保藏。菌株 *E. coli* JM109 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。菌株 *C. acetoacidophilum-Δldh* 由本研究构建。质粒 pMD19-T、pMD18-T 购于 TaKaRa 公司。用于谷氨酸棒杆菌基因组的克隆载体 pK19mobsacB 由中国人民解放军南京军区军事医学研究所邓小昭教授惠赠。*ldh* 基因敲除质粒 pK19mobsacB-*Δldh* 由本研究构建。

#### 1.1.2 试剂和溶液

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III、碱性磷酸酶购自 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶、2×PCR Mix 反应液购自广州东盛生物科技有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒购自捷瑞生物工程(上海)有限公司; 质粒 DNA 少量抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒和琼脂糖购自生工生物工程(上海)有限

公司。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L。

感受态培养基: LB 液体培养基, 甘氨酸 30 g/L, Tween80 1 g/L。

活化培养基 (LBHIS): 酵母粉 2.5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, NaCl 5 g/L, 脑心浸液 18.5 g/L, 山梨醇 91 g/L。

种子培养基: 在 LB 培养基中添加 5 g/L 葡萄糖。

菌体培养基: 葡萄糖 25 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, FeSO<sub>4</sub> 5 mg/L, 硫胺素 0.2 mg/L, 尿素 2.5 g/L, 玉米浆 10 g/L, 生物素 0.2 mg/L。

转化培养基: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, FeSO<sub>4</sub> 6 mg/L, MnSO<sub>4</sub> 4.2 mg/L, 生物素 0.2 mg/L, 硫胺素 0.2 mg/L。

## 1.2 方法

### 1.2.1 *C. acetoacidophilum-Δldh* 的构建

引物设计: 根据乳酸脱氢酶基因 *ldh* 在谷氨酸棒杆菌基因组 (GenBank Accession No. Nc\_006958.1) 中上下游的 DNA 序列, 设计上游引物 1、2, 下游引物 3、4。引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Target gene	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme
Primer 1	<i>ldh</i>	<u>AAGCTT</u> AAC AGCTCTGCAATGACCTG	<i>Hind</i> III
Primer 2		GTCGATAATGTGATTCCATGACGTTGC	
Primer 3		GCAACGTCATGGAATCACATTATCGAC	
Primer 4		<u>AAGCTT</u> TGTGAGTTTGT TCACCTCATC	<i>Hind</i> III

The underlined sequences for enzyme loci, italics for complementary sequences for overlap PCR.

基因 *ldh* 上下游 DNA 序列的扩增: 以 *C. acetoacidophilum* ATCC13870 基因组为模板, 引物 1、2 用于扩增基因 *ldh* 的上游序列, 引物 3、4 用于扩增基因 *ldh* 的下游序列。上下游序列 PCR 反应条件相同: 95 °C 变性 50 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。反应结束后, 1% 琼脂糖电泳检测, 胶回收纯化试剂盒回收 PCR 产物。

基因 *ldh* 上下游 DNA 序列的拼接与测序: 以基因的上游和下游序列为模板, 引物 1、4 为正向和反向引物, overlap PCR 拼接反应条件: 95 °C 变性 50 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环。胶回收纯化试剂盒回收拼接产物, 拼接产物连接到 pMD18-T 载体中, 在 16 °C 下连接过夜, 转化 *E. coli* JM109。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 阳性克隆提取质粒酶切验证, 测序验证。

基因敲除载体 pK19mobsacB- $\Delta$ *ldh* 的构建: 将上述 PCR 产物和质粒 pK19mobsacB 分别进行 *Hind* III 单酶切, 1% 的琼脂糖电泳, 分别回收酶切的 PCR 产物和硅胶柱纯化质粒片段, 酶切的 PCR 产物和去磷酸化的质粒片段进行连接, 16 °C 条件下连接过夜, 转化到 *E. coli* JM109。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 阳性克隆进一步酶切验证。构建好的基因敲除载体命名为 pK19mobsacB- $\Delta$ *ldh*。

基因敲除载体转化 *C. acetoacidophilum* ATCC13870: 将 pK19mobsacB- $\Delta$ *ldh* 于 1.8 kV、5 ms 电击条件下, 电转化到 *C. acetoacidophilum* ATCC13870 感受态细胞, 通过卡那抗性及蔗糖选择压力筛选, 得到敲除了乳酸脱氢酶基因的 *C. acetoacidophilum*- $\Delta$ *ldh*。

## 1.2.2 *C. acetoacidophilum*- $\Delta$ *ldh* 产琥珀酸的方法

*C. acetoacidophilum* 种子于 30 °C、200 r/min 下耗氧培养 24 h, 然后以 5% (V/V) 的接种量接种于菌体培养基中, 30 °C、200 r/min 下耗氧培养 16 h, 培养好的菌体离心富集, 以 20 g/L (干重) 的菌体浓度悬浮于转化培养基中 30 °C、200 r/min 下恒温振荡。

## 1.2.3 有机酸及葡萄糖的测定方法

葡萄糖及有机酸的测定参照文献[16]。

## 1.2.4 相关酶活测定方法

菌体粗酶液的制备: 将转化过程中的菌体离心去上清液, 用缓冲液洗涤 2 次, 缓冲液包括 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L DTT)。加 50  $\mu$ L 100 g/L 的溶菌酶, 冰浴下超声破碎 25 min, 4 °C、8 000 r/min 下离心 25 min。取上清液即为粗酶液。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、富马酸酶 (FUM) 酶活测定方法参考文献[17], 乳酸脱氢酶 (LDH) 酶活测定方法参考文献[18], 乙酸激酶 (AK) 酶活测定方法参考文献[19]。

酶活测定的反应试剂混合后, 加入粗酶液启动反应, 反应体系为 1 mL, 在酶标仪 (BioTek-Power Wave XS2, Gene 公司) 上测定相应的吸光值, PEPC、MDH、LDH、AK 测定 OD<sub>340</sub>, FUM 测定 OD<sub>250</sub>。

酶活单位定义为在 30 °C 下, 每分钟使 1 nmol 底物转化为产物的酶量为 1 U。粗酶液中蛋白量的测定通过 Bradford 法测定, 标准物为牛血清白蛋白。比酶活为每毫克蛋白的酶活单位, 单位为 U/mg。

## 1.2.5 NADH/NAD<sup>+</sup>的测定方法

NADH/NAD<sup>+</sup>的测定方法参照文献[20]。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因敲除菌 *C. acetoacidophilum-Δldh* 的鉴定

按照方法 1.2.1 获得了乳酸脱氢酶基因敲除菌, 以出发菌株 ATCC13870 为对照, 用 PCR 鉴定法以引物 1、4 进行验证, 鉴定电泳图谱见图 1。用同样两条引物扩增, 出发菌株 ATCC13870 的 PCR 扩增产物为 1 500 bp, 而敲除菌 *C. acetoacidophilum-Δldh* 的 PCR 产物仅为 1 000 bp, 两个片段大小区别明显, *C. acetoacidophilum-Δldh* 染色体上被删除的基因序列长度大致为 500 bp, 表明 *ldh* 基因已经被成功敲除。

### 2.2 *ldh* 基因的敲除对 *C. acetoacidophilum* 生长的影响

出发菌 ATCC13870 和 *C. acetoacidophilum-Δldh* 在摇瓶上的生长曲线如图 2 所示, 两者生

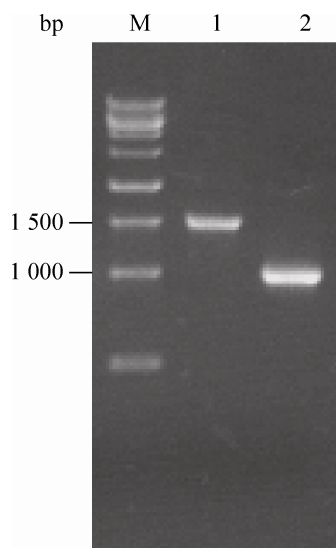


图 1 *C. acetoacidophilum-Δldh* 的 PCR 鉴定电泳图谱  
Fig. 1 PCR identification of *C. acetoacidophilum-Δldh*. M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; 1: *C. acetoacidophilum* ATCC13870 PCR product; 2: *C. acetoacidophilum-Δldh* PCR product.

长良好, 生长趋势基本相同, 10 h 进入稳定期, 之后菌体缓慢增长。但是 *C. acetoacidophilum-Δldh* 与 ATCC13870 相比在生物量上稍有降低, 10 h 后 *C. acetoacidophilum-Δldh*  $OD_{660}$  达到 34, 出发菌株此时  $OD_{660}$  达到 36。说明 *ldh* 基因的敲除对 *C. acetoacidophilum* 生长的影响不显著。

### 2.3 *C. acetoacidophilum-Δldh* 与 ATCC13870 对葡萄糖的代谢产物

将培养相同时间的 *C. acetoacidophilum-Δldh* 与 ATCC13870 分别离心, 进行有机酸转化, 其中用于转化的菌体浓度为 26.5 g CDW/L, 初始葡萄糖浓度为 90 g/L, 碳酸氢钠浓度为 33.6 g/L, 转化过程曲线见图 3。转化 30 h, *C. acetoacidophilum-Δldh* 残留葡萄糖浓度为 20.5 g/L, 琥珀酸浓度为 60.5 g/L, 而 ATCC13870 的残糖 5.03 g/L, 琥珀酸 38.4 g/L, *C. acetoacidophilum* 敲除乳酸脱氢酶基因后, 产琥珀酸能力明显增强。

比较两株菌转化 12 h 的代谢产物及过程参数见表 2, 与 ATCC13870 相比, *C. acetoacidophilum-Δldh* 不产乳酸, 而琥珀酸、乙酸质量浓度分别

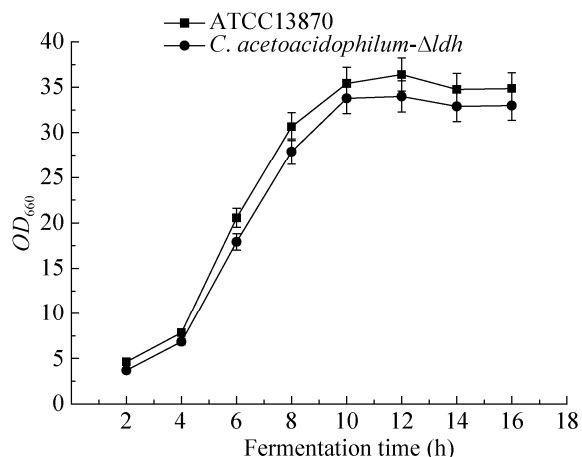


图 2 ATCC13870 与 *C. acetoacidophilum-Δldh* 的生长曲线

Fig. 2 Cell growth profiles of ATCC13870 and *C. acetoacidophilum-Δldh*.

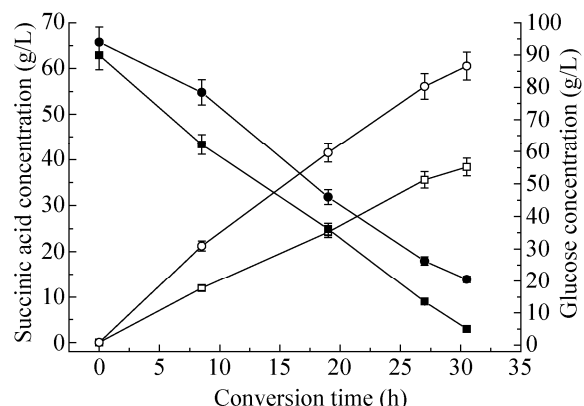


图3 ATCC13870与*C. acetoacidophilum-Δldh*耗糖和产酸曲线

Fig. 3 Glucose consumption and the succinic acid production of ATCC13870 and *C. acetoacidophilum-Δldh*. □: ATCC13870 succinic acid concentration; ○: *C. acetoacidophilum-Δldh* succinic acid concentration; ■: ATCC13870 glucose concentration; ●: *C. acetoacidophilum-Δldh* glucose concentration.

增加了45.6%和182%，并且有部分的富马酸产生。理论上1 mol葡萄糖在碳酸氢盐充足的情况下可生成2 mol的琥珀酸<sup>[21]</sup>，这个过程中需要4 mol的NADH的参与，而1 mol葡萄糖完全酵解可产生2 mol的NADH，因此糖酵解代谢过程中产生的NADH不能满足琥珀酸生成所需要NADH的量，而从丙酮酸生成乙酸的过程中也有NADH的产生，因此这可能是代谢产物中乙

酸产量增加的原因。*C. acetoacidophilum-Δldh*另一特点是葡萄糖消耗速率有所下降，比原始菌株降低了29.3%，但糖酸转化率提高了109%，产琥珀酸平均速率增加了65%，说明乳酸脱氢酶基因的敲除使*C. acetoacidophilum*的代谢途径发生了变化，乳酸途径的消除使得琥珀酸和乙酸途径加强。

#### 2.4 *C. acetoacidophilum-Δldh*与ATCC13870在缺氧条件下NADH/NAD<sup>+</sup>比值的变化

在缺氧条件下NADH的氧化完全依赖于有机酸的生成<sup>[22]</sup>，因此缺氧条件下菌体转化葡萄糖产琥珀酸的过程中NADH起着不可或缺的作用。表3表明ATCC13870和 $\Delta ldh$ 菌株在缺氧条件下代谢葡萄糖过程中NADH/NAD<sup>+</sup>的情况。 $\Delta ldh$ 菌株的NADH/NAD<sup>+</sup>水平明显低于原始菌株，这可能是由于琥珀酸的生成需要的还原当量NADH多于乳酸生成途径中的消耗量，因此生成琥珀酸较多的体系中，NADH/NAD<sup>+</sup>水平较低。 $\Delta ldh$ 菌不产乳酸，琥珀酸的产量是出发菌株的2倍左右，而原始菌株产乳酸及琥珀酸的比率接近1:1，故*C. acetoacidophilum-Δldh*在缺氧产酸的过程中NADH/NAD<sup>+</sup>水平较低。同时，NADH与NAD<sup>+</sup>的不平衡也会影响到糖酵解代谢，可能造成了 $\Delta ldh$ 菌的葡萄糖消耗速率下降。

表2 缺氧转化12 h代谢产物及转化过程参数的比较

Table 2 Comparison of metabolic products and conversion parameters at 12 h oxygen deprivation culture

	Strains	
	ATCC13870	<i>C. acetoacidophilum-Δldh</i>
Succinic acid (g/L)	13.10±0.33	19.10±0.48
Lactic acid (g/L)	14.81±0.37	0
Fumaric acid (g/L)	0	0.44±0.01
Acetic acid (g/L)	0.99±0.02	2.79±0.07
Q <sub>s</sub> [g/(L·h)]	3.07±0.08	2.17±0.05
Y <sub>s/g</sub> (g/g)	0.35±0.01	0.73±0.02
R [mg/L/g(cdw)/h] <sup>a</sup>	46.00±1.15	76.00±1.90

Q<sub>s</sub>: Glucose consumption rate; Y<sub>s/g</sub>: succinic acid yield on glucose; R: average succinate production rate; <sup>a</sup>: cells dry weight.

表 3 两种菌株缺氧转化 10 h NADH/NAD<sup>+</sup> 比值Table 3 Rate of NADH/NAD<sup>+</sup> of the two different strains at 10 h oxygen deprivation culture

Strains	NAD <sup>+</sup> (mmol/L)	NADH (mmol/L)	NADH/NAD <sup>+</sup>
ATCC13870	0.071±0.003	0.073±0.002	1.020±0.003
<i>C. acetoacidophilum</i> - <i>Δldh</i>	0.098±0.003	0.069±0.002	0.710±0.002

## 2.5 *C. acetoacidophilum*-*Δldh* 与 ATCC13870

### 在缺氧条件下葡萄糖代谢关键酶活性的比较

缺氧条件下嗜乙酰乙酸棒杆菌代谢以产有机酸为主,葡萄糖经糖酵解生成磷酸烯醇式丙酮酸及丙酮酸,从丙酮酸出发分为 3 条途径,一条经乳酸脱氢酶催化在 NADH 的参与下生成乳酸,一条经羧化酶催化在碳酸氢盐的参与下生成四碳化合物草酰乙酸,从而进入 TCA 循环的还原臂一侧生成琥珀酸,一条经丙酮酸脱氢酶复合体催化在 NAD<sup>+</sup> 的参与下生成乙酰辅酶 A,进而再经过磷酸转乙酰激酶,乙酸激酶的催化生成乙酸(图 4)。缺氧条件下转化产酸过程中测定乙醛酸途径的关键酶异柠檬酸裂合酶(ICL)酶活,结果出发菌株与敲除菌株均未检测出该酶活。并且在转化过程中分别加入氟乙酸及丙二酸,加入氟乙酸的转化体系产琥珀酸正常,加入丙二酸的转化体系几乎不产琥珀酸。由于丙二酸是 TCA 还原臂中琥珀酸脱氢酶的强抑制剂,而氟乙酸是柠檬酸合酶的抑制剂,可以说明缺氧条件下嗜乙酰乙酸棒杆菌不能通过柠檬酸循环或乙醛酸循环途径生成琥珀酸。从对代谢途径中关键酶活性的分析,反映阻断了乳酸产生支路后,代谢流转向了琥珀酸和乙酸的产生途径。如图 5 所示, *C. acetoacidophilum*-*Δldh* 没有表现出 LDH 活性, PEPC 活性提高了 84%, AK 活性提高了 12 倍, FUM 活性提高了 17.3%, MDH 酶活提高了 17.4%。PEPC、FUM

和 MDH 活性的增加表明四碳途径的加强。在 *C. acetoacidophilum* 中,丙酮酸羧化酶(PC)的酶活测定数据不稳定(数据未列出),这与文献<sup>[9,23-25]</sup>报道的一致, Inui 等<sup>[9]</sup>也曾证实 PEPC 是谷氨酸棒杆菌中合成草酰乙酸的关键酶。而 AK 活性的显著增加,加强了乙酰辅酶 A 的代谢,从而强化了乙酸途径。Joeri 等<sup>[26]</sup>指出:副产物乙酸的产生可以补给用于琥珀酸生成的还原当量,因此可推测,AK 活性以及乙酸产量的增加可能与 *Δldh* 菌株在缺氧产酸过程中 NADH 与 NAD<sup>+</sup> 不平衡(表 3)有关。

## 3 结论

本文采用以 *sacB* 基因为反向筛选标记的同源重组染色体基因敲除系统,敲除嗜乙酰乙酸棒杆菌的乳酸脱氢酶基因,构建 *C. acetoacidophilum*-*Δldh* 菌株。生长培养表明乳酸脱氢酶基因的敲除不会对 *C. acetoacidophilum* 菌体的生长造成很大的影响。*Δldh* 菌株不产乳酸,说明 *C. acetoacidophilum* 中乳酸脱氢酶并没有其他的同工酶存在。在缺氧条件下,葡萄糖对琥珀酸的转化率提高了 109%,产琥珀酸平均速率增加了 65%,产琥珀酸和乙酸浓度分别提高了 45.6%和 182%,PEPC 活性提高了 84%,AK 酶活提高了 12 倍,说明 *Δldh* 菌株葡萄糖代谢流分布发生了变化,乳酸产生支路被阻断后,代谢流更多的偏向于琥珀酸和乙酸产生途径。

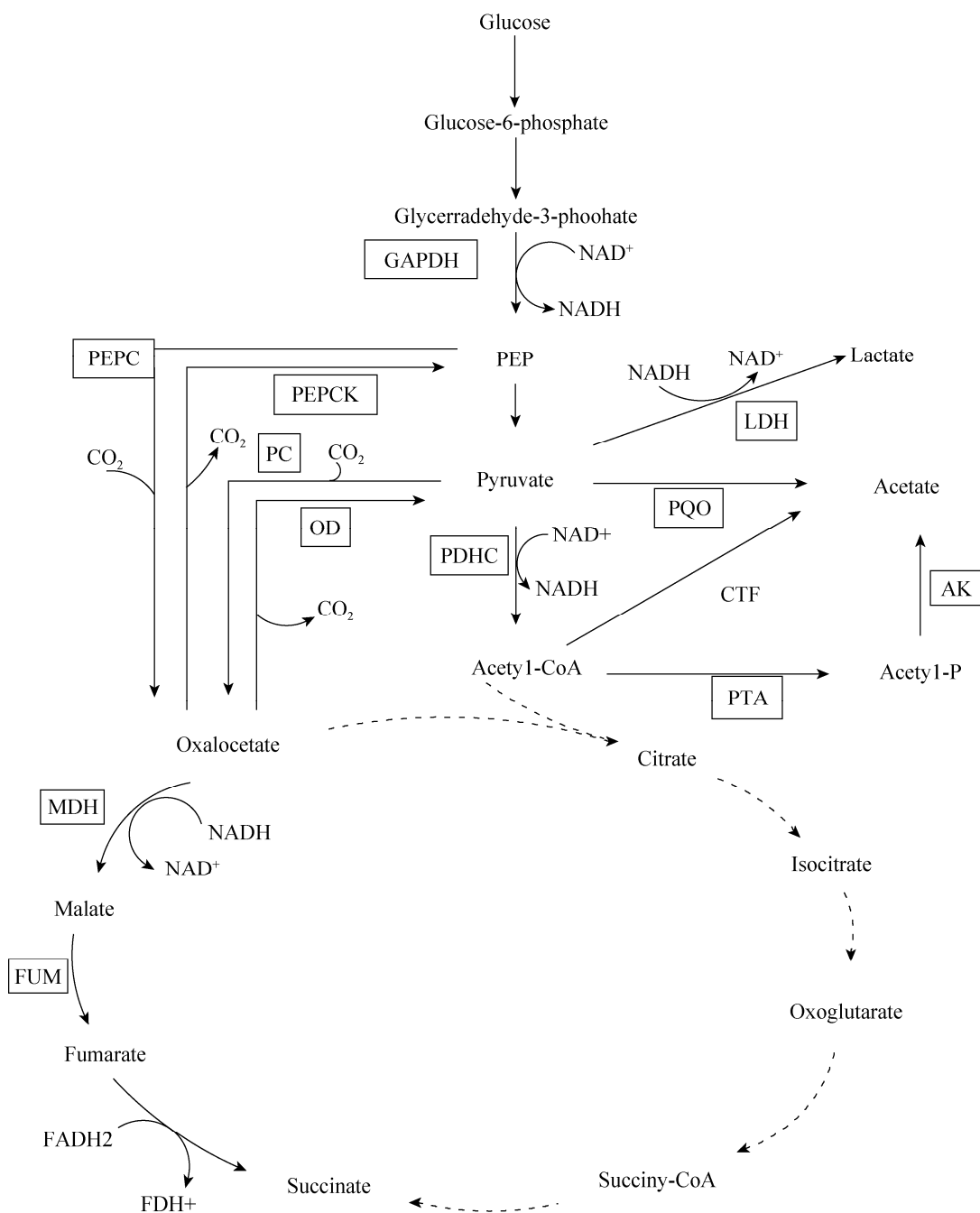


图 4 缺氧条件下嗜乙酰乙酸棒杆菌代谢图

Fig. 4 Metabolic pathways of *C. acetoacidophilum* under oxygen deprivation conditions. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate; PEPC: phosphoenolpyruvatecarboxylase; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; PC: pyruvate carboxylase; MDH: malate dehydrogenase; FUM: fumarate dehydratase; LDH: lactate dehydrogenase; AK: acetate kinase; PDHC: pyruvate dehydrogenase complex; PTA: phosphotransacetylase.



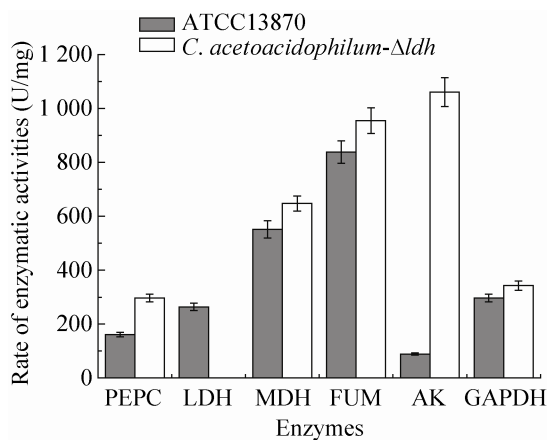


图5 ATCC13870 与 *C. acetoacidophilum-Δldh* 缺氧条件下比酶活

Fig. 5 Enzymatic activities of ATCC13870 and *C. acetoacidophilum-Δldh* under oxygen-deprived condition.

从代谢途径分析, 1 mol 葡萄糖完全酵解可产生 2 mol 的 NADH, 在碳酸氢盐供应充足的情况下理论上可产生 2 mol 的琥珀酸, 而生成 2 mol 的琥珀酸需要 4 mol 的 NADH, 因此以葡萄糖为底物代谢产琥珀酸的过程中存在氧化还原辅酶的不平衡。本研究也发现 *C. acetoacidophilum-Δldh* 产琥珀酸过程中, NADH/NAD<sup>+</sup> 比值小于 1, 说明  $\Delta ldh$  菌产琥珀酸过程中可能存在 NADH 不足。因此加强 NADH 的供给和阻断乙酸产生支路, 将是构建高效生产琥珀酸菌 *C. acetoacidophilum* 的方向。

## REFERENCES

- [1] Becker J, Wittmann C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels-*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr Opin Biotech*, 2011, 23(4): 1–10.
- [2] Niimi S, Suzuki N, Inui M, et al. Metabolic engineering of 1,2-propanediol pathways in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(5): 1721–1729.
- [3] Sasaki M, Jojima T, Inui M. Xylitol production by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(4): 1057–1066.
- [4] Mimitsuka T, Sawai H, Hatsu M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cadaverine fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(9): 2130–2135.
- [5] Schneider J, Wendisch VF. Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(4): 859–868.
- [6] Takahashi C, Shirakawa J, Tsuchidate T, et al. Robust production of gamma-amino butyric acid using recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 51(3): 171–176.
- [7] 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. *Biotechnol Lett*, 1993, 15(5): 449–454.
- [8] Okino S, Inui M, Yukawa H. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(4): 475–480.
- [9] Inui M, Murakami S, Okino S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, 7(4): 182–196.
- [10] Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(3): 268–274.
- [11] Okino S, Noburyu R, Suda M, et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 81(3): 459–464.
- [12] Litsanov B, Brocker M, Bott M. Toward

- homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(9): 3325.
- [13] Eggeling L, Bott M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*: *Corynebacterium* Taxonomy. 2nd ed. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005: 10–20.
- [14] Yu F, Zheng P, Ni Y. Influence of bicarbonate on organic acid of glutamic acid-producing bacteria under oxygen deprivation. *Chin J Bioproc*, 2011, 9(5): 22–26 (in Chinese).  
于芳, 郑璞, 倪晔. 碳酸盐对谷氨酸产生菌在缺氧条件下产有机酸的影响. *生物加工过程*, 2011, 9(5): 22–26.
- [15] Zheng P, Yu F, Yang Q. A *Corynebacterium acetoacidophilum* and the method of producing succinic acid: CN 201210094742.6. 2013-04-10 (in Chinese).  
郑璞, 于芳, 杨倩. 一株嗜乙酰乙酸棒杆菌及其产丁二酸的方法: CN 201210094742.6. 2013-04-10.
- [16] Liu YP, Zheng P, Sun ZH. Determination of succinic acid and other metabolites from fermentation broth by Ion-exclusion liquid chromatography. *Food Ferment Ind*, 2006, 32(12): 119–123 (in Chinese).  
刘宇鹏, 郑璞, 孙志浩. 采用离子排斥色谱法分析发酵液中的琥珀酸等代谢产物. *食品与发酵工业*, 2006, 32(12): 119–123.
- [17] Shogo Y, Masayuki S. Diversity of metabolic shift in response to oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum* and its close relatives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(3): 1051–1061.
- [18] Bunch PK, Fairoz MJ, Lee N, et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1997, 143(1): 187–195.
- [19] Ruan H, Xuan RR. Studies on activities of PTA, AK, ICL and MS enzymes involved in the acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J Zhejiang Univ*, 2003, 29(5): 529–533 (in Chinese).  
阮红, 宣日荣. 谷氨酸棒状杆菌乙酸盐代谢 PTA, AK, ICL 和 MS 酶活性研究. *浙江大学学报*, 2003, 29(5): 529–533.
- [20] Li J, Chen KQ, Huang XM. Establishment of the determination of NAD<sup>+</sup> and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids. *Food Sci Technol*, 2008, 33(12): 255–257 (in Chinese).  
李建, 陈可泉, 黄秀梅. 厌氧发酵有机酸体系中 NAD<sup>+</sup> 和 NADH 测定方法的建立. *食品科技*, 2008, 33(12): 255–257.
- [21] Arndt A, Eikmanns BJ. Regulation of carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Corynebacteria: genomics and molecular biology*. Norwich: Caister Academic Press, 2008: 155–182.
- [22] Jojima T, Inui M, Yukawa H. Biorefinery applications of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiol Monogr*, 2013, 23: 149–192.
- [23] Feir HA, Suzuki I. Pyruvate carboxylase of *Aspergillus niger*: kinetic study of a biotin-containing carboxylase. *Can J Biochem*, 1969, 47(7): 697–710.
- [24] James AG, Jones KM. Purification and characterization of pyruvate carboxylase from *Arthrobacter globiformis*. *Arch Biochem Biophys*, 1977, 179(2): 444–455.
- [25] Peters PG, Wendisch VF, Paul S. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 1997, 143(4): 1095–1103.
- [26] Joeri JB, Marjan DM, Wim KS. Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochem*, 2010, 45: 1103–1114.

(本文责编 郝丽芳)