

研究报告

外源精氨酸对谷氨酸棒杆菌在高葡萄糖胁迫下生长和发酵特性的影响

吕红芳^{1,2} 王浩^{1,2} 徐宁² 鞠建松¹ 刘君^{2*}

(1. 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050024)

(2. 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308)

摘要:【目的】探究外源添加不同氨基酸和相容性溶质对谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)在高糖胁迫环境下生长的影响及可能的作用机理。【方法】通过在培养基中外源添加各种氨基酸和相容性溶质,研究其对谷氨酸棒杆菌在高葡萄糖和高蔗糖胁迫下生长的影响,并分析添加精氨酸对高葡萄糖胁迫下菌株糖转运和代谢途径中关键酶转录水平的影响,以及对菌株发酵产氨基酸的影响。进一步探究了碱性氨基酸在其它棒状杆菌属中抵御高葡萄糖胁迫的潜在作用。【结果】在高葡萄糖胁迫条件下,外源添加赖氨酸、精氨酸和组氨酸后谷氨酸棒杆菌的生物量分别提高 54.7%、50.0%和 37.6%;而在高蔗糖胁迫条件下,添加脯氨酸和四氢嘧啶后菌株生物量增加 20%以上。进一步研究表明,在高葡萄糖胁迫下,外源添加精氨酸后谷氨酸棒杆菌的葡萄糖利用速率提高约 2.5 倍,谷氨酸的发酵产量也增加了 127.5%。此外,碱性氨基酸对其它 4 种棒状杆菌也具有一定的渗透保护效应。【结论】精氨酸对谷氨酸棒杆菌在高葡萄糖胁迫下具有良好的渗透保护作用,可能归因于其能促进葡萄糖的转运和代谢能力,同时发现碱性氨基酸的渗透保护效应对棒状杆菌属具有一定的普遍性。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 高糖胁迫, 精氨酸, 发酵

Effects of exogenous arginine on the growth and fermentation performance of *Corynebacterium glutamicum* under high glucose stress

LÜ Hong-Fang^{1,2} WANG Hao^{1,2} XU Ning² JU Jian-Song¹ LIU Jun^{2*}

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China)

(2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: [Objective] To study the effects and possible mechanism of exogenous addition of different amino acids and compatible solutes on the growth of *Corynebacterium glutamicum* under

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31500044); Natural Science Foundation of Tianjin City (No. 17JCQNJC09600, 17JCYBJC24000); Hundred Talents Program of the Chinese Academy of Sciences

*Corresponding authors: Tel: 86-22-24828781; E-mail: liu_jun@tib.cas.cn

Received: January 21 2017; Accepted: May 02, 2017; Published online (www.cnki.net): May 09, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31500044); 天津市自然科学基金项目(No. 17JCQNJC09600, 17JCYBJC24000); 中科院百人计划项目

*通讯作者: Tel: 86-22-24828781; E-mail: liu_jun@tib.cas.cn

收稿日期: 2017-01-21; 接受日期: 2017-05-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-09

high sugar stress. **[Methods]** Various amino acids and compatible solutes were individually added into the indicated medium supplemented with high glucose or sucrose, and their potential effects on the growth of *C. glutamicum* were examined. The influences of exogenous arginine on the transcription levels of some key enzymes involved in sugar transport and metabolic pathways, as well as the fermentative production of amino acids under high glucose stress, were also explored. Moreover, the potential roles of basic amino acids in protecting against high glucose challenge were also analyzed in other *Corynebacterium* species. **[Results]** Under high glucose stress, the biomass of *C. glutamicum* increased by 54.7%, 50.0% and 37.6% by addition of exogenous lysine, arginine and histidine, respectively, while the addition of exogenous proline or ectoine increased the biomass of *C. glutamicum* more than 20% under high sucrose stress. Further studies revealed that exogenous arginine resulted in a nearly 2.5-fold higher glucose utilization rate, and the amount of L-glutamic acid by fermentation increased by 127.5% in the presence of arginine under high glucose stress. Additionally, the osmoprotective effects of basic amino acids in response to high glucose stress were also observed in other four *Corynebacterium* species. **[Conclusion]** Arginine plays an osmoprotective role for *C. glutamicum* under high glucose stress, which may be attributed to its ability to promote glucose transport and metabolism. Meanwhile, the osmoprotective effects of basic amino acids in response to high glucose were shown to be applicable to other *Corynebacterium* species.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, High sugar stress, Arginine, Fermentation

无论是在自然环境还是工业发酵中,微生物经常会遭遇一系列的逆境胁迫,其中高渗胁迫就是比较常见的一种。在利用微生物发酵生产目标代谢产物时,发酵体系中高浓度的底物/目标产物,以及中间代谢产物/副产物的积累都会形成高渗胁迫环境,高渗胁迫会影响细胞膜结构和胞质酶活性,严重阻碍菌株正常的生理功能和目标代谢产物的最大化积累^[1]。在长期的进化过程中,微生物发展出多样化的适应策略以减小由于渗透压的升高给菌株带来的损伤,其中主要包括离子迁移过程及相容性溶质的积累机制^[2]。相容性溶质是一些具有不带电荷、高度水溶性特点的糖类、醇类、氨基酸及其衍生物等小分子物质,该类物质在细胞内高浓度积累不会对生物大分子如蛋白质、核酸等的生理功能产生不利影响,因此常被用作细胞的渗透保护剂^[1,3-4]。通常情况下,菌株可以通过自身生物合成或从外界环境中摄取相容性溶质如海藻糖、甜菜碱等来抵御高渗胁迫压力。Morbach 等的研究指出,在发酵体系中添加甜菜碱能够促进谷氨酸棒杆菌的生长及底物糖的消耗^[5],说明甜菜碱可以有效缓解高渗胁迫带给菌株的生存压力。此外,外源添加氨基酸有时

也可以提高微生物抵御逆境胁迫的能力,文献报道在培养基中添加精氨酸和赖氨酸可以提高大肠杆菌和乳酸菌的耐酸能力,推测外源氨基酸进入胞内后可以消耗多余质子,还可以释放 ATP 以促进菌株逆境胁迫下的生长^[6]。需要指出的是,由于菌株所遭受的渗透胁迫程度、持续时间及环境中可利用物质的不同,会造成菌株积累不同的渗透保护剂以应对特定的胁迫压力。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种兼性厌氧的革兰氏阳性菌,被广泛应用于氨基酸和维生素的生产^[7]。在发酵生产中,随着反应的进行,菌株会受到来自产物等的高渗胁迫而导致发酵过程效能低下。Gourdon 等研究证实,在利用谷氨酸棒杆菌发酵生产谷氨酸的过程中,随着产物积累,底物糖的消耗速率和代谢能力均会出现下降,最终导致菌株生长缓慢及目标代谢物谷氨酸产率的显著下降^[8]。目前已有文献报道,谷氨酸棒杆菌在高渗胁迫短期刺激下会在胞内积累海藻糖、甜菜碱、脯氨酸等相容性溶质来抵御高渗胁迫^[9-11]。Fränzel 等^[7]发现对谷氨酸棒杆菌高渗胁迫处理 180 min 之后,转录组和蛋白质组结果分析表明,

相容性溶质相关的载体 ProP 和转运蛋白 BetP 均会出现显著上调。但是, 谷氨酸棒杆菌在长期高渗胁迫下, 主要利用何种相容性溶质及是否有其它氨基酸参与高渗胁迫应答过程仍不清楚。本文通过外源添加不同氨基酸和相容性溶质, 对谷氨酸棒杆菌在长期高糖渗透胁迫下的生长进行了初步的探究, 有利于进一步了解微生物耐受高糖渗透胁迫的生理机制, 从而为微生物进行理性改造提升其胁迫耐受性提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和引物: *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 由本实验室保存, *Corynebacterium glutamicum* CICC10234、*Corynebacterium glutamicum* CICC20903、*Corynebacterium pekinense* CICC20971 和 *Corynebacterium crenatum* CICC20662 均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。实验所用引物详见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 各种相容性溶质和氨基酸, 北京 Solarbio 公司; RNA 提取试剂盒(RNAPrep pure Cell/Bacteria Kit), 天根生物工程公司; 反转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit), Thermo 公司; 各种常用生化试剂均为国产分析纯。振荡培养箱, 美国精骐有限公司; 分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

1.1.3 培养基: (1) LB 培养基(g/L): Tryptone 10.0, Yeast extract 5.0, NaCl 10.0。(2) LBHIS 培养基(g/L): Tryptone 5.0, Yeast extract 2.5, NaCl 5.0, D-sorbitol 91.0, Brain Heart Infusion 18.5。(3) LBG 培养基(g/L): Tryptone 10.0, Yeast extract 5.0, NaCl 10.0, 葡萄糖 5.0。(4) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 25.0, 尿素 8.0, 玉米浆 30.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4$ 0.2, 调节 pH 至 7.0。(5) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 250.0, 尿素 4.0, 玉米浆 1.0, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.3×10^{-3} ,

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

Primers	Oligonucleotide sequence (5'→3')
ptsG-F	CGGTATGCAGGTGGTGATG
ptsG-R	ACTCCGCCGATTCTCTTCT
ptsI-F	CGTGAAGCAGAGCAGGAGC
ptsI-R	CATTGACCATGCCAGCAGT
pfkA-F	GGGAAGGACTGTTAGGCG
pfkA-R	CCACCGATTGGGATAAGG
pyk-F	TACCCGCTTGACTACCACC
pyk-R	GACATCTGAGGGTGGATAAAG
acn-F	TCCAAGCATCGAAATCCAG
acn-R	TCTCGGCTGGGTTTCAGTG
sdhCD-F	GACCGTGAGGCAATCCGTC
sdhCD-R	GTGAACAAGAACGAAGCCACC
mdh-L	TCCTGCGAAACATCACCA
mdh-R	AATCTTGCCGTTGTTAGCC
gap-F	AAAGAACCTGGACTGGGCTG
gap-R	GTCTTCGTTGCTTGCTGGTG
16S rRNA-F	ACCTGGAGAAGAAGCACCG
16S rRNA-R	TCAAGTTATGCCCGTATCG

$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.3×10^{-3} , $MgSO_4$ 1.0, $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, VB₁ 0.2×10^{-3} , 豆饼水解液 5.0, $CaCO_3$ 2%, 苯酚红指试剂 0.4%, 调节 pH 至 7.0。(6) 50%的葡萄糖储液, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。(7) 各种相容性溶质和氨基酸储液均过滤除菌备用。

1.2 不同高糖渗透胁迫对 *C. glutamicum* 生长的影响

将 *C. glutamicum* 接种于 LBHIS 培养基, 32 °C、200 r/min 培养过夜进行活化; 然后将菌种转接至含有不同浓度葡萄糖(10%–30%)及蔗糖(10%–35%)的 LB 试管培养基中, 调整起始 OD_{600} 为 0.1; 32 °C、200 r/min 培养 16 h 后, 利用分光光度计在 600 nm 波长条件下测量菌体吸光度值, 作为衡量菌株生长能力的指标。实验重复 3 次, 取平均值。

1.3 不同氨基酸和相容性溶质对高糖渗透胁迫下 *C. glutamicum* 生长的影响

在 LB 培养基中添加 25%的葡萄糖及 30%的蔗糖作为后续谷氨酸棒杆菌生长的高糖渗透条

件,并根据实验需求在培养基中添加终浓度为 10 mmol/L 的各种氨基酸和相容性溶质。将过夜活化的菌种接种于 4 mL 试管培养基中,后续培养条件同 1.2。

1.4 中心代谢途径相关酶基因的转录分析及葡萄糖利用率的测定

将 *C. glutamicum* 接种于 LBHIS 培养基中过夜活化,然后将菌种转接至含有 100 mL 高糖培养基(25%葡萄糖+LB)的 250 mL 三角瓶中,调整起始 OD_{600} 为 0.1。实验组中添加终浓度为 10 mmol/L 的精氨酸,对照组不添加任何物质,32 °C、200 r/min 摇瓶培养。待菌体培养 8 h 和 16 h 后,4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,然后将菌体置于液氮速冻,-80 °C 保存备用。参照 RNA 提取试剂盒说明方法提取对照组与实验组菌体 RNA,并测定 A_{260}/A_{280} 值以评估 RNA 提取质量。参照反转录试剂盒说明方法进行反转录,获得 cDNA 后置于-20 °C 保存备用。选取磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS)中在葡萄糖跨膜转运中发挥重要作用的基因酶 IICB^{Glc} (*ptsG*) 和酶 I (*ptsI*)^[12],糖酵解途径(EMP)中关键酶基因 6-磷酸果糖激酶 1 (*pfkA*)、丙酮酸激酶(*pyk*)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*gap*),三羧酸循环(TCA)中的乌头酸水合酶(*acn*)、琥珀酸脱氢酶(*sdhCD*)和苹果酸脱氢酶(*mdh*)的基因,进行荧光定量 PCR 验证。PCR 反应体系:2×SYBR Mix 10.0 μL, Primer F (10 μmol/L) 0.8 μL, Primer R (10 μmol/L) 0.8 μL, cDNA template 2.0 μL, ddH₂O 6.4 μL。PCR 反应条件:95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 45 s, 40 个循环。采用 16S rRNA 基因作为内参基因,根据相对定量公式($2^{-\Delta\Delta C_T}$)计算目的基因在实验组和对照组中的相对 mRNA 表达差异,其中未处理对照样本的表达定义为 1。

葡萄糖利用率的测定方法参照北京普利莱基因技术有限公司的葡萄糖氧化酶测定试剂盒(E1010);对照组与实验组菌株培养 8 h 后 8 000 r/min

离心 5 min,弃菌体保留上清培养基。培养基中残留的葡萄糖在葡萄糖氧化酶(GOD)的作用下生成葡萄糖酸和 H₂O₂,然后用过氧化氢酶(POD)催化过氧化氢,使色原物质 4-氨基安替比林生成醌亚胺,颜色的深浅与葡萄糖浓度成正比。

1.5 精氨酸对高葡萄糖胁迫下 *C. glutamicum* 发酵产氨基酸的影响

将保存的 *C. glutamicum* 菌种在 LBHIS 平板上划线,挑取菌落接种于种子培养基过夜活化。然后将菌种转接于 50 mL 含 25%葡萄糖发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,实验组添加终浓度为 10 mmol/L 的精氨酸,对照组不添加任何物质。调整起始 OD_{600} 为 1.0,32 °C、200 r/min 摇瓶发酵培养。实时观察,当苯酚指示剂变为黄色时,添加无菌氨水调节 pH 为 7.0。独立重复试验 3 次,利用 HPLC 测定发酵 48 h 后的发酵产物。

1.6 碱性氨基酸对高葡萄糖压力下棒状杆菌属生长的影响

将在 LBHIS 培养基中过夜活化的 *C. glutamicum* 和其它 4 种棒状杆菌接分别接种于 4 mL 的 LBG 以及含有 25%葡萄糖的 LB 培养基中,外源添加终浓度为 10 mmol/L 的 3 种碱性氨基酸。调整起始 OD_{600} 为 0.1,培养条件同 1.2。

2 结果与分析

2.1 不同高糖渗透胁迫对 *C. glutamicum* 生长的影响

为更好地了解 *C. glutamicum* 在不同高糖渗透胁迫下的生长,首先检测了不同浓度的葡萄糖和蔗糖对菌株生长的影响。结果如图 1 所示,随着葡萄糖及蔗糖浓度的不断升高,对菌株生长造成的渗透胁迫也在不断增强。当葡萄糖和蔗糖浓度分别达到 30%和 35%时,菌株的生长已经受到严重抑制;培养 16 h 后,菌株未见明显的生长,说明高渗胁迫会阻碍细胞正常的生理代谢,严重影响细胞的生长。后期实验中选择终浓度为 25%葡萄糖及 30%蔗糖作为对 *C. glutamicum* 高渗胁迫的培养条件。

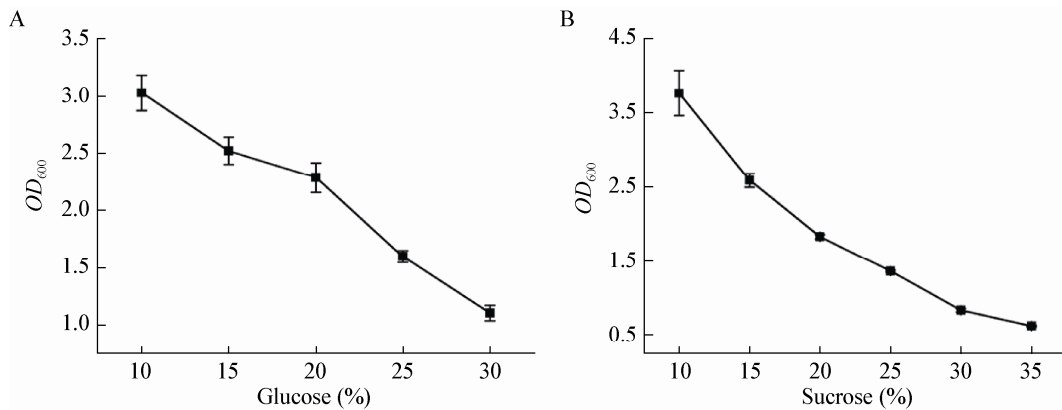


图 1 不同浓度葡萄糖(A)和蔗糖(B)胁迫对菌株生长的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of glucose (A) and sucrose (B) on cell growth of *C. glutamicum* ATCC13032

2.2 不同氨基酸和相容性溶质对高糖渗透胁迫下 *C. glutamicum* 生长的保护作用

积累相容性溶质是多数微生物在应对渗透胁迫时采用的主要应激策略之一^[13-15]。为探究在 *C. glutamicum* 长期高渗胁迫中何种物质具有生长补救效应,通过外源添加不同氨基酸和相容性溶质观察其对菌株生长的影响。如图 2 所示,各种物质在不同糖类渗透胁迫中的保护作用存在一定差异。在由高浓度葡萄糖引起的渗透胁迫条件下(图 2A),添加 3 种碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)对菌株生长具有明显改善效应,其生物量分别增加 54.7%、50.0% 和 37.6%。另外,谷氨酰胺也对菌株具有一定渗透保护作用,菌株生物量约提高 15.0%,而相容性溶质如四氢嘧啶、海藻糖、甜菜碱及其它氨基酸并未表现出明显的渗透保护作用。在高蔗糖胁迫条件下(图 2B),外源添加脯氨酸和四氢嘧啶使菌株生物量增加 20% 以上,而在 3 种碱性氨基酸及酪氨酸作用下菌株生物量也提高约 15%,说明这 6 种物质在高蔗糖胁迫下对菌株具有一定的渗透保护作用。上述结果表明,在由不同糖类引起的渗透胁迫条件下, *C. glutamicum* 能够选择性摄入或积累特定物质作为渗透保护剂。

2.3 精氨酸对高葡萄糖胁迫下 *C. glutamicum* 代谢的影响

在发酵工业中,葡萄糖是菌体生长和产物合成的主要碳源,由其引起的渗透胁迫也最为常见。在由高浓度葡萄糖引起的渗透胁迫条件下,外源添加碱性氨

氨酸可以有效地促进谷氨酸棒杆菌的生长。由图 3A 可知,培养 8 h 后外源添加精氨酸的实验组较未添加任何物质的对照组具有明显的生长优势。为了进一步探究碱性氨基酸的可能作用机制,后续研究分析外源添加精氨酸对 *C. glutamicum* 的磷酸烯醇丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS)、糖酵解途径(EMP)和三羧酸循环(TCA)中关键酶转录水平的影响。如图 3B 所示,添加精氨酸培养 8 h 后, *C. glutamicum* 的 PTS 系统、EMP 途径和 TCA 循环中相关基因的表达量均出现了不同程度的上调,表明外源添加精氨酸可以使菌株中心代谢更加旺盛。当培养 16 h 后对照组与实验组菌株均处于生长稳定期,此时相较于对照组,实验组菌株 PTS 系统中 *ptsG* 和 *ptsI* 基因的表达水平未见明显上调,但是 EMP 途径和 TCA 循环中相关基因的表达量仍具有不同程度的增强。上述结果显示,进入稳定期后,虽然实验组菌株的葡萄糖摄入速率出现一定程度的降低,但是仍具有较强的中心碳代谢能力。另外,每 OD_{600} 菌体的葡萄糖平均利用率测定结果显示,在对数生长期实验组的葡萄糖平均利用率比对照组提高约 2.5 倍,两者的葡萄糖平均利用率分别为 1.128 ± 0.100 g/h 和 0.444 ± 0.300 g/h,说明实验组菌株具有增强的胞内物质消耗和能量代谢水平。上述结果提示,外源添加碱性氨基酸后可能对菌株中心碳代谢流的分配产生了影响,使能量更多地流入 EMP 途径和 TCA 循环中,从而为菌株的生长提供了充足的能量和相关的前体物质。

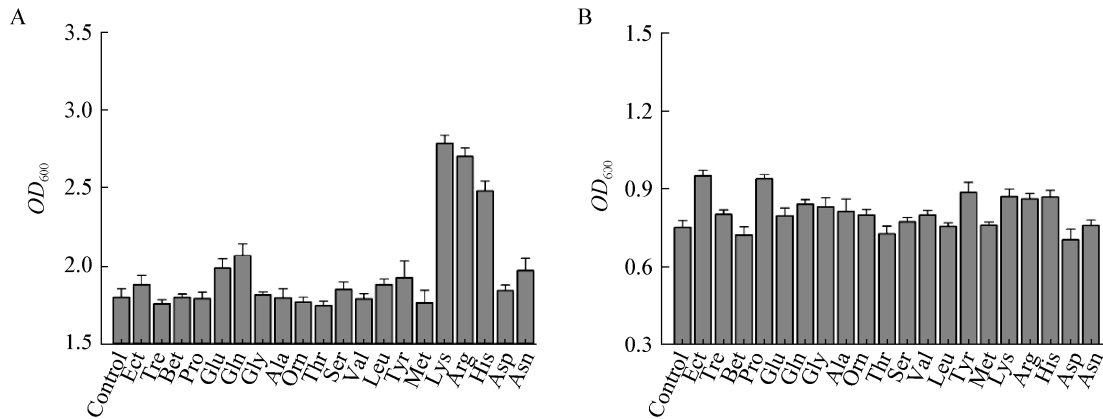


图2 外源添加氨基酸和相容性溶质对高糖渗透胁迫下菌株生长的影响

Figure 2 Effects of different amino acids and compatible solutes on cell growth of *C. glutamicum* ATCC13032 under high sugar conditions

注: A: 25%葡萄糖; B: 30%蔗糖。

Note: A: 25% Glucose; B: 30% Sucrose.

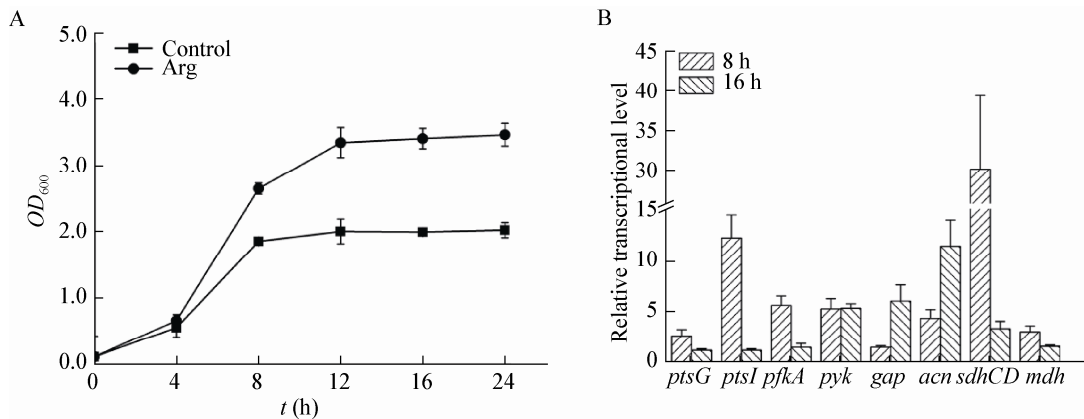


图3 外源添加精氨酸对高葡萄糖胁迫下菌株生长代谢过程的影响

Figure 3 Effects of exogenous arginine on cell growth and metabolism of *C. glutamicum* ATCC13032

注: A: 谷氨酸棒杆菌在葡萄糖胁迫下的生长曲线; B: 精氨酸添加对谷氨酸棒杆菌中心碳代谢途径关键基因表达的影响。

Note: A: Growth curves of *C. glutamicum* under 25% glucose condition; B: Effects of exogenous arginine on transcript levels of key genes involved in central glucose metabolic pathways.

2.4 精氨酸对高葡萄糖胁迫下 *C. glutamicum* 发酵产氨基酸的影响

上述实验中发现外源添加精氨酸可以有效缓解高浓度葡萄糖对 *C. glutamicum* 的渗透胁迫,并且菌株的葡萄糖转运及代谢途径中多个关键基因均出现表达上调。为进一步探究精氨酸在菌株发酵应用中的作用,研究了在高葡萄糖胁迫条件下外源添加精氨酸对菌株发酵生产氨基酸的影响。结果发现在高浓度底物的发酵培养基中,外源添加精氨酸对

菌株的多种氨基酸发酵具有一定的促进作用(图4)。相较于对照菌株,精氨酸添加菌株的单位菌体生物量(1 OD₆₀₀)所获得的谷氨酸产量由 4.32 mg/L 提高至 9.83 mg/L,比最初产量增加了 127.5%,同时甘氨酸、丙氨酸和缬氨酸的产量也分别增加了 107.7%、89.3%和 27.8%。推测由于精氨酸的添加能够促进菌株糖酵解过程,而且上调三羧酸循环中多个重要基因的表达,有助于增加糖酵解和三羧酸循环通量,最终实现谷氨酸产量的提高。

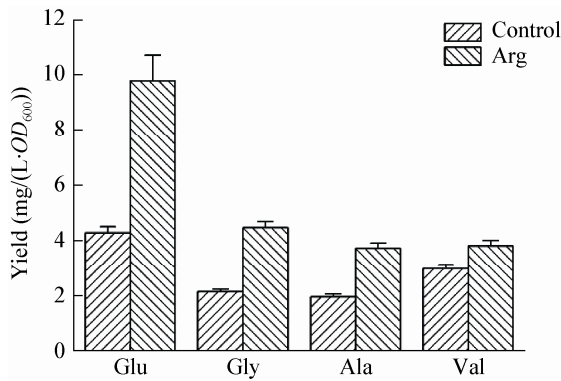


图 4 外源添加精氨酸对高葡萄糖胁迫下菌株发酵产氨基酸的影响

Figure 4 Effects of exogenous arginine on the fermentative production of various amino acids by *C. glutamicum* ATCC13032 under high glucose stress

2.5 碱性氨基酸对棒状杆菌属高葡萄糖胁迫下生长的影响

为探究碱性氨基酸对其它棒状杆菌抵御高葡萄糖胁迫的影响, 选择 4 种常见棒状杆菌, 分别为 *C. glutamicum* CICC10234、*C. glutamicum* CICC20903、*C. pekinense* CICC20971 和 *C. crenatum* CICC20662。测定了在正常与高葡萄糖胁迫条件下, 外源添加 3 种碱性氨基酸对 *C. glutamicum* ATCC13032 及上述 4 种菌株生长的影响。从表 2 可以看出, 碱性氨基酸作为初级代谢产物, 外源添加对于菌体的生长均有一定程度的促进作用; 而在高葡萄糖胁迫下,

3 种碱性氨基酸的添加对几种棒状杆菌的生长具有更为显著的促进作用, 精氨酸和赖氨酸均使 5 种菌株的生物量增加 30%左右, 尽管组氨酸的作用稍弱, 菌株的生物量也增加约 20%。表明碱性氨基酸一方面可以直接促进菌株的生长, 另一方面对高葡萄糖胁迫条件下的菌株也具有一定的渗透保护效应。3 种碱性氨基酸对高葡萄糖胁迫下棒状杆菌的渗透保护作用具有一定的普遍性。

3 结论与讨论

谷氨酸棒杆菌是发酵工业中重要的生产菌种, 已经被用于多种氨基酸、核苷酸等高附加值化学品的生产。鉴于谷氨酸棒杆菌在发酵生产过程中经常遭遇各种渗透胁迫, 本文探究了在高糖渗透胁迫环境下, 外源添加不同氨基酸和相容性溶质对谷氨酸棒杆菌生长和发酵特性的影响, 其中碱性氨基酸对于高葡萄糖胁迫下菌株的生长具有明显的促进作用。菌株葡萄糖利用率结果表明, 外源添加精氨酸使谷氨酸棒杆菌葡萄糖利用率提高约 2.5 倍, 提示菌株具有增强的底物消耗和代谢能力, 也有利于一定程度上降低胞外葡萄糖胁迫程度。此外, 外源添加精氨酸在一定程度上能够促进谷氨酸棒杆菌发酵生产氨基酸的能力, 如谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸及缬氨酸等。进一步研究发现, 外源精氨酸的添加能够增强谷氨酸棒杆菌 PTS 系统、EMP 途径及 TCA 循环中关键基因的表达水平, 提示菌株的 EMP

表 2 不同培养条件下 3 种碱性氨基酸对棒状杆菌生长的影响
Table 2 Effects of the basic amino acids on cell growth of *Corynebacterium* species under three different culture conditions (%)

Strains	Arg		Lys		His	
	-	+	-	+	-	+
13032	8.9±4.2	50.0±3.0	7.9±2.0	54.7±5.7	6.7±5.3	37.6±1.4
10234	13.8±3.2	39.4±2.4	13.2±3.2	31.7±4.3	6.1±4.3	24.9±0.7
20903	17.5±3.0	31.1±2.6	16.0±1.7	35.9±4.9	13.2±1.6	17.1±3.1
20971	11.4±0.3	25.0±2.4	4.5±5.6	23.0±2.6	13.1±3.1	22.2±2.8
20662	14.4±1.5	29.3±3.4	4.4±5.5	34.2±2.2	0.0±6.1	23.9±3.6

注: -: 正常培养条件; +: 25%高葡萄糖培养条件.

Note: -: Normal growth conditions; +: The presence of 25% high glucose stress.

途径和 TCA 循环中的重要节点具有一定柔性,能够更好地调节中心碳代谢流分布,使物质和能量更多地流入 EMP 途径和 TCA 循环中,从而为菌株提供更多的 ATP 能量和相关前体物质,以满足胁迫环境下的生长代谢需求^[16]。需要指出的是,精氨酸的补救效应未在所有的高渗透胁迫条件下得到证实,如高盐胁迫(数据未显示)。鉴于微生物响应环境胁迫的应答过程是全细胞参与的复杂过程,单一因素的作用机制也需要进一步的分析。先前的研究报道表明,精氨酸也具有缓解酵母细胞冷冻胁迫损伤的作用^[17]。胞外模拟实验也揭示,精氨酸盐能够促进蛋白的组装过程并提高蛋白的结构稳定性^[18]。上述发现均提示,精氨酸可能通过多种途径共同参与胁迫环境下的补救效应。因此,对精氨酸等碱性氨基酸在高葡萄糖胁迫下改善棒状杆菌生长和发酵性能的潜在机理进一步探究,将有利于更好地揭示谷氨酸棒状杆菌在环境渗透胁迫下的生理适应特性。

参 考 文 献

- [1] Wood JM. Bacterial responses to osmotic challenges[J]. The Journal of General Physiology, 2015, 145(5): 381-388
- [2] Ochrombel I, Becker M, Krämer R, et al. Osmotic stress response in *C. glutamicum*: impact of channel- and transporter-mediated potassium accumulation[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(11): 787-796
- [3] Xu N, Cheng HJ, Liu QD, et al. Research progress of the Na⁺/H⁺ antiporters in bacteria[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 2002-2011 (in Chinese)
徐宁, 程海娇, 刘清岱, 等. 细菌 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2002-2011
- [4] Wang YQ, Tao T. Compatibility of solutes in microbial osmolality regulation[J]. Microbiology China, 1994, 21(5): 293-296 (in Chinese)
王颖群, 陶涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质[J]. 微生物学通报, 1994, 21(5): 293-296
- [5] Morbach S, Krämer R. Impact of transport processes in the osmotic response of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1/3): 69-75
- [6] Huang GD. Acid tolerance of *Lactobacillus brevis* NCL912 and its differentially expressed protein under acid stress[D]. Nanchang: Doctoral Dissertation of Nanchang University, 2011 (in Chinese)
黄桂东. *Lactobacillus brevis* NCL912 的耐酸特性及其酸胁迫下差异表达蛋白的研究[D]. 南昌: 南昌大学博士学位论文, 2011
- [7] Fränzel B, Trötschel C, Rückert C, et al. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions[J]. Proteomics, 2010, 10(3): 445-457
- [8] Gourdon P, Raheemimandimby M, Dominguez H, et al. Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1/3): 77-85
- [9] Weinand M, Krämer R, Morbach S. Characterization of compatible solute transporter multiplicity in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 701-708
- [10] Wolf A, Krämer R, Morbach S. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(4): 1119-1134
- [11] Farwick M, Siewe RM, Krämer R. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(16): 4690-4695
- [12] Moon MW, Kim HJ, Oh TK, et al. Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 244(2): 259-266
- [13] Zapras A, Bleisteiner M, Kerres A, et al. Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 250-259
- [14] Tao P, Li H, Yu YJ, et al. Ectoine and 5-hydroxyectoine accumulation in the halophile *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 in response to salt stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(15): 6779-6789
- [15] Zahid N, Schweiger P, Galinski E, et al. Identification of mannitol as compatible solute in *Gluconobacter oxydans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(13): 5511-5521
- [16] Rajvanshi M, Venkatesh KV. Phenotypic characterization of *Corynebacterium glutamicum* under osmotic stress conditions using elementary mode analysis[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1345-1357
- [17] Morita Y, Nakamori S, Takagi H. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94(5): 390-394
- [18] Srinivas V, Raman B, Rao KS, et al. Arginine hydrochloride enhances the dynamics of subunit assembly and the chaperone-like activity of alpha-crystallin[J]. Molecular Vision, 2005, 11: 249-255