

文章编号:1673-1689(2005)04-0057-04

## 生物素和 VB<sub>1</sub> 在谷氨酸棒杆菌过量合成缬氨酸中的作用

杨毅, 章志兰, 姜绪林, 杜大庆, 张星元

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**通过对谷氨酸棒杆菌突变株 AATV341 进行生物素和 VB<sub>1</sub> 添加量的实验,探讨了生物素和 VB<sub>1</sub> 添加量对该菌株菌体质量及缬氨酸产量的影响;同时根据对 AATV341 进行的胞内外某些特定氨基酸和有机酸检测,研究了这两种维生素对碳架代谢流的分布,尤其是对丙酮酸节点处的代谢流量分布的影响。结果表明,生物素添加量在 40  $\mu\text{g/L}$  时,菌体质量和缬氨酸在胞外的累积明显提高,谷氨酸在胞外累积降低;VB<sub>1</sub> 的适量添加,可提高缬氨酸在胞外的累积,降低发酵液中乙酸和草酰乙酸的含量。

**关键词:**缬氨酸;谷氨酸棒杆菌;生物素;维生素 B<sub>1</sub>;碳代谢流;草酰乙酸;乙酸

**中图分类号:**Q 591.3

**文献标识码:**A

## Effects of D-Biotin and VB<sub>1</sub> Factors on the Biosynthesis of Valine in a Valine Producer *Corynebacterium glutamicum* AATV341

YANG Yi, ZHANG Zhi-lan, JIANG Xu-lin, DU Da-qing, ZHANG Xing-yuan

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** In this paper, the effects of D-biotin and VB<sub>1</sub> on overproduction of valine were studied, and the composition of culture medium was also optimized. The concentrations of several metabolites produced in batch culture (extra-cellular and intra-cellular) were determined. The distributions of carbon-flux, especially at the node pyruvate were calculated, compared, and analyzed. The results showed that, in *Corynebacterium glutamicum* AATV341 cultivation, adding 40  $\mu\text{g/L}$  biotin and 400  $\mu\text{g/L}$  VB<sub>1</sub> would increase the productivity of valine, and repress the extra-cellular concentrations of oxaloacetic acid, acetic acid and glutamate. The analysis may play an important role in re-designing metabolism to achieve further fermentative improvement.

**Key words:** valine; *Corynebacterium glutamicum*; biotin; VB<sub>1</sub>; carbon flux; acetic acid; oxaloacetic acid

20 世纪 50 年代以后,缬氨酸的微生物合成途径逐步被阐明,在此基础上代谢控制发酵研究非常活跃<sup>[1]</sup>。Eva Radmacher 等人<sup>[2]</sup>采用分子生物学手

段和代谢工程相结合的手段构建了生产缬氨酸的工程菌。作者采用本实验室保藏的谷氨酸棒杆菌突变株 AATV341(Leu<sup>-</sup>, L-AAH<sup>+</sup>, 2-TA<sup>-</sup>, Vd<sup>-</sup>),在

收稿日期:2004-07-09; 修回日期:2005-01-21.

作者简介:杨毅(1980-),男,河北邯郸人,发酵工程硕士研究生。

摇瓶条件下考察了主要营养因子及发酵条件对微生物代谢的影响.通过对胞内外几种特定的氨基酸和有机酸的分布情况分析,进一步研究了谷氨酸棒杆菌缬氨酸发酵的代谢调节机制,探讨了发酵中大量出现的草酰乙酸和乙酸的原因.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

谷氨酸棒杆菌 AS1.495(Leu<sup>-</sup>):由中国科学院微生物菌种保藏中心提供;突变株 AATV341(Leu<sup>-</sup>, L-AAH<sup>ss</sup>, 2-TA<sup>r</sup>, Vd<sup>-</sup>),是谷氨酸棒杆菌 AS1.495(Leu<sup>-</sup>)依次叠加 L-天冬氨酸氧肟酸盐超敏(L-AAH<sup>ss</sup>),2-噻唑丙氨酸抗性(2-TA<sup>r</sup>)和缬氨酸降解途径缺损(Vd<sup>-</sup>)等遗传标记所得到的突变株,由本实验室提供.

### 1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 组分(g/L):牛肉膏 10,蛋白胨 10,葡萄糖 5,氯化钠 5,琼脂条 20,pH 值 7.0,0.1 MPa下灭菌 20 min.

1.2.2 种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 40,尿素 3,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5,蛋白胨 20,酵母浸出膏 5,pH 值 7.0,0.1 MPa 灭菌 20 min.

1.2.3 摇瓶发酵培养基 组分(g/L):葡萄糖 80,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2×10<sup>-3</sup>,MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 2×10<sup>-3</sup>,生物素 5×10<sup>-5</sup>,VB<sub>1</sub> 5×10<sup>-4</sup>,亮氨酸 0.2,CaCO<sub>3</sub> 40,pH 值 7.0,0.07 MPa 灭菌 7 min.

### 1.3 培养条件

1) 斜面菌种在 30℃下培养 36 h,冰箱冷藏,每 2 个月移接一次.

2) 种子活化 2~3 h,旋转式摇床 200 r/min,30℃培养 8~12 h,装液量 15 mL(在 200 mL 的三角瓶中).

3) 摇瓶发酵旋转式摇床 160 r/min,30℃培养 72 h,接种体积分数 10%,装液量 20 mL(在 500 mL 的三角瓶中).

### 1.4 分析测定方法

1.4.1 pH 值测定 pHs-2C 型精密数显酸度计测定.

1.4.2 还原糖测定 DNS 法<sup>[3]</sup>.

1.4.3 氨基酸测定 采用安捷伦 1100 液相色谱仪.色谱柱:HYPERSIL ODS C<sub>18</sub> 4×125 mm;柱温:40℃;体积流量:1.0 mL/min;检测器:荧光检测器;激发波长:340 nm;发射波长:450 nm;16 min

时激发波长 266 nm,发射波长 305 nm.

1.4.4 有机酸测定 采用安捷伦 1100 液相色谱仪.色谱柱:Nucleosil 100 C<sub>18</sub> 250×4.0 mm;流动相:0.1 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>调 pH 值 3.0);检测器:紫外检测器;检测波长:215 nm<sup>[4]</sup>.

1.4.5 菌悬液 OD 值的测定 移取菌悬液 0.2 mL 置于 4.8 mL、0.25 mol/L 的盐酸溶液中,于 721 型分光光度计上测 620 nm 处吸光度<sup>[5]</sup>.

1.4.6 菌体质量的测定 移取 2 mL 发酵液,用 2 mol/L 的盐酸溶液溶解 CaCO<sub>3</sub>,5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用蒸馏水洗涤 2 次,60℃烘干称重,直至恒重.

1.4.7 菌体细胞破碎 移取 5 mL 的发酵液,5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,收集菌体;用 5 mL 的去离子水悬浮菌体,在 20 kHz 的超声波(200 W,工作电压 200 V)下处理 10~30 min<sup>[6]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 生物素对发酵的影响

生物素又称维生素 H,生物素作为酶的辅助因子以多种方式参与细菌的代谢过程:参与丙酮酸脱羧反应,合成吡啶核苷酸、核酸,形成嘌呤核嘧啶的碱基,合成脂肪酸、蛋白质和聚糖等<sup>[7]</sup>.本实验使用的谷氨酸棒杆菌为生物素需求型,因而生物素既影响细胞的通透性,同时也影响细胞某些代谢途径的流量.通常在氨基酸发酵生产中,生物素用量直接影响生产菌的细胞生长、增殖、代谢和细胞壁、细胞膜的渗透和产酸量的高低<sup>[8]</sup>.为此进行生物素添加量实验(发酵培养基其他成分按 1.2.3 摇瓶发酵培养基配方),以研究生物素对谷氨酸棒杆菌发酵的影响.由表 1 可知,生物素质量浓度在 0~60 μg/L 之间,菌体质量浓度随生物素添加量的增加而增大,当生物素质量浓度超过 60 μg/L 时菌体质量浓度不再上升,恒定在 13.74 g/L.

根据实验结果推测,生物素的过量添加可能导致生物细胞膜中更多的磷脂分子合成,从而限制了胞内谷氨酸和天冬氨酸向胞外扩散;胞内谷氨酸的高质量分数对谷氨酸脱氢酶等产生顺序反馈抑制,限制丙酮酸脱氢进入 TCA 循环.从表 1 也可以看出,当发酵液中生物素质量浓度增大时,细菌分泌谷氨酸的量明显减少,这会迫使丙酮酸向缬氨酸方向流动.另一方面,谷氨酸棒杆菌用来固定二氧化碳的酶是受天冬氨酸调节的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)羧化酶和需要生物素的丙酮酸羧化酶<sup>[9]</sup>.由于 AATV341 是天冬氨酸氧肟酸盐超敏突变株,推

测 PEP 羧化酶活性非常弱,可以认为二氧化碳的固定主要靠丙酮酸羧化酶来催化. 添加生物素可能促进丙酮酸的羧化,从而减少缬氨酸产量.

取生物素添加质量浓度为 0,40,100  $\mu\text{g/L}$  的发酵液 5 mL,离心收集菌体,用去离子水制成同体积的菌悬液,细胞破碎后,分析胞内氨基酸质量分数分布情况(见表 2). 比较表 1,2 数据,发现在不同的生物素水平下,氨基酸胞内质量分数均大大低于

胞外,并且胞内外质量分数随生物素水平变化的规律也不尽相同. 由此推测,该菌株细胞普遍以主动输送方式释放氨基酸<sup>[10]</sup>.

对胞外有机酸分析(见表 3)可以发现,随着生物素添加量的增加,草酰乙酸、丙酮酸质量浓度增加,而  $\alpha$ -酮戊二酸和乙酸含量减少,从而验证了上述谷氨酸顺序反馈抑制的机制和生物素对丙酮酸羧化酶的促进作用.

表 1 生物素添加量对发酵产氨基酸的影响

Tab. 1 Effect of biotin on the biosynthesis of extra-cellular amino acids

| 生物素添加<br>质量浓度/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 菌体<br>质量浓度/<br>( $\text{g/L}$ ) | 缬氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 谷氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 赖氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 异亮氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 组氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 丙氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0                                     | 9.94                            | 0.27                           | 1.960                          | 0.020                          | 0.032                           | 0.056                          | 0.110                          |
| 20                                    | 13.07                           | 0.52                           | 0.100                          | 0.040                          | 0.054                           | 0.081                          | 0.075                          |
| 40                                    | 13.34                           | 0.90                           | 0.110                          | 0.041                          | 0.049                           | 0.079                          | 0.071                          |
| 60                                    | 13.74                           | 0.85                           | 0.150                          | 0.055                          | 0.061                           | 0.120                          | 0.096                          |
| 80                                    | 13.74                           | 0.84                           | 0.080                          | 0.054                          | 0.062                           | 0.100                          | 0.094                          |
| 100                                   | 13.74                           | 0.85                           | 0.032                          | 0.053                          | 0.065                           | 0.098                          | 0.091                          |

表 2 生物素添加量对胞内氨基酸的影响

Tab. 2 Effect of biotin on the biosynthesis of intra-cellular amino acids

| 生物素添加<br>质量浓度/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 谷氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 组氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 丙氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 缬氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 异亮氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) | 赖氨酸<br>产量/<br>( $\text{g/g}$ ) |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 0                                     | 0.031                          | 0.005 4                        | 0.004 2                        | 0.007 1                        | 0.002 1                         | 0.001 5                        |
| 40                                    | 0.020                          | 0.004 4                        | 0.005 3                        | 0.014 0                        | 0.002 0                         | 0.002 0                        |
| 100                                   | 0.011                          | 0.004 7                        | 0.007 8                        | 0.010 0                        | 0.001 6                         | 0.002 6                        |

表 3 生物素添加量对胞外有机酸的影响

Tab. 3 Effect of biotin on the biosynthesis of extra-cellular organic acids

| 生物素添加<br>质量浓度/( $\mu\text{g/L}$ ) | 草酰乙酸质量浓度/<br>( $\text{mg/mL}$ ) | 丙酮酸质量浓度/<br>( $\text{mg/mL}$ ) | $\alpha$ -酮戊二酸<br>质量浓度/( $\text{mg/mL}$ ) | 乙酸质量浓度/<br>( $\text{mg/mL}$ ) |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| 0                                 | 0                               | $0.46 \times 10^{-2}$          | 1.02                                      | 7.94                          |
| 20                                | 0.081                           | 0.14                           | 1.29                                      | 4.09                          |
| 40                                | 0.51                            | 0.12                           | 0.28                                      | 3.62                          |
| 60                                | 1.53                            | 0.16                           | 0.028                                     | 4.15                          |
| 80                                | 1.64                            | 0.14                           | 0                                         | 4.08                          |
| 100                               | 1.89                            | 0.22                           | 0                                         | 4.06                          |

从表 3 看出,AATV341 在发酵过程中有大量的乙酸积累. 已知谷氨酸棒杆菌产生乙酸的途径有两条:一是在丙酮酸氧化酶的作用下直接由丙酮酸产生乙酸,但此酶的活性很低不足以产生大量的乙酸;另一条是在乙酸激酶(ACK)和磷酸转乙酰基酶(PTA)的作用下将乙酰 CoA 转化为乙酸,这是谷氨酸棒杆菌产乙酸的主要途径<sup>[11]</sup>. 随着生物素质量浓度的增加,草酰乙酸增加使其和乙酰 CoA 结合形成柠檬酸,从而导致乙酸质量浓度的下降,显然草  
万方数据

酰乙酸胞外质量浓度的增加量远远超过了胞外乙酸质量浓度的减少量. 这可能是由于棒杆菌 AATV341 中 ACK 和 PTA 的活性较高所致.

2.2 VB<sub>1</sub> 添加量对发酵过程的影响

VB<sub>1</sub> 在菌体内转化成硫胺素焦磷酸(TPP),它是丙酮酸脱氢酶复合体系的辅助因子,利于丙酮酸脱氢生成乙酰 CoA 进入 TCA 循环,使菌体生长迅速<sup>[12]</sup>. 图 1 表明,VB<sub>1</sub> 用量太大对发酵生产缬氨酸不利,当 VB<sub>1</sub> 用量在 400  $\mu\text{g/L}$  时缬氨酸产量最高.

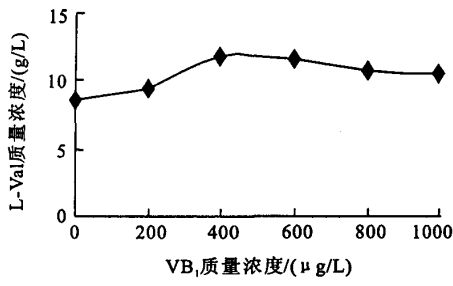


图1 VB<sub>1</sub>的添加量对发酵生产缬氨酸的影响

Fig.1 Effect of VB<sub>1</sub> on the biosynthesis of valine

实验选择添加 VB<sub>1</sub> 质量浓度为 0, 400, 1 000 μg/L 的发酵液(发酵培养基其他成分按 1. 2. 3 摇瓶发酵培养基配方添加)进行全氨基酸分析,发现组氨酸随 VB<sub>1</sub> 质量浓度的升高而下降,丙氨酸、谷氨酸则先下降后回升(见表 4)。组氨酸含量的下降

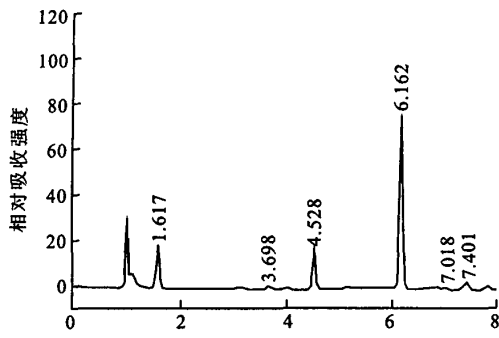
说明 VB<sub>1</sub> 质量浓度增加使葡萄糖经 EMP 途径进入 TCA 循环的流量增大,减小了 HMP 途径的流量。谷氨酸的下降可能由于 VB<sub>1</sub> 的增加使 α-酮戊二酸脱氢酶复合体的活性增加<sup>[12]</sup>,但随着更多的碳流进入 TCA 循环,使谷氨酸的质量分数有所回升。丙氨酸质量分数的变化也可能说明碳流进入 EMP 途径的流量增大。丙酮酸过多地进入 TCA 循环使流向缬氨酸方向的流量减弱,导致缬氨酸产量下降,这从它们的高压液相色谱(见图 2)中也能明显看出这一趋势。

此外,对发酵液进行有机酸分析表明,加入 VB<sub>1</sub> 可使发酵液中乙酸及草酰乙酸的质量浓度降低,当发酵液中 VB<sub>1</sub> 质量浓度达到 1 000 μg/L 时仍有 1.09 g/L 的草酰乙酸和 4.15 g/L 的乙酸存在,但胞内未检测到草酰乙酸,却有乙酸存在。

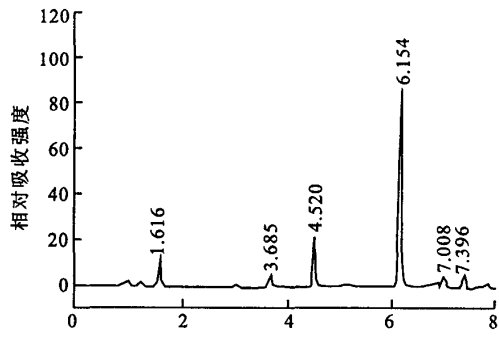
表 4 VB<sub>1</sub>添加量对发酵产氨基酸的影响

Tab. 4 Effect of VB<sub>1</sub> on the biosynthesis of extra-cellular amino acids

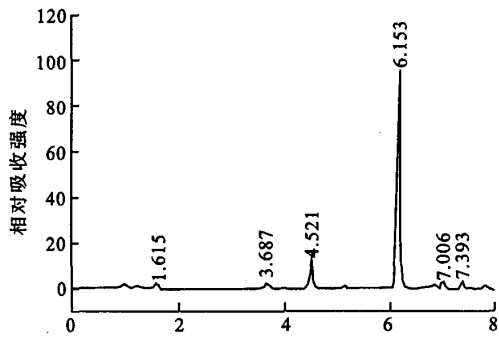
| VB <sub>1</sub> 添加<br>质量浓度/<br>(μg/L) | 谷氨酸<br>质量浓度/<br>(g/L) | 组氨酸<br>质量浓度/<br>(g/L) | 丙氨酸<br>质量浓度/<br>(g/L) | 缬氨酸<br>质量浓度/<br>(g/L) | 异亮氨酸<br>质量浓度/<br>(g/L) | 赖氨酸<br>质量浓度/<br>(g/L) |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| 0                                     | 1.92                  | 1.28                  | 1.36                  | 9.36                  | 0.80                   | 0.58                  |
| 400                                   | 0.58                  | 0.97                  | 1.08                  | 11.85                 | 0.62                   | 0.41                  |
| 1000                                  | 1.66                  | 1.52                  | 1.71                  | 10.42                 | 0.83                   | 0.62                  |



洗脱时间/min  
a. 0 μg/L



洗脱时间/min  
c. 1 000 μg/L



洗脱时间/min  
b. 400 μg/L

图 2 VB<sub>1</sub>的添加量对胞外氨基酸产量的影响

Fig. 2 Effect of VB<sub>1</sub> on the biosynthesis of extra-cellular amino acids

### 3 结 语

生物素的添加虽然能提高谷氨酸棒杆菌 AATV341 菌体质量浓度、降低谷氨酸棒杆菌谷氨酸的合成量,使流向缬氨酸合成方向的代谢流量增大,但与此同时,草酰乙酸在胞外累积消耗大量的丙酮酸,

(下转第 65 页)

## 参考文献:

- [1] 胡学智. 国内外酶制剂工业及其应用[J]. 工业微生物, 2001, 31(3): 41-46.
- [2] Somogyi, Michael. Notes on sugar determination[J]. *J Biol Chem*, 1952, 195(1): 19-23.
- [3] Mary Mandels, Raymond Andreotti, Charles Roche. Measurement of saccharifying cellulase[J]. *Biotech and Bioeng Symp*, 1976, 20(6): 21-23.
- [4] Bailey Michael J, Biely Peter. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. *J Biotechnol*, 1999, 23(3): 257-270.
- [5] 郭显章. 酶的工业生产技术[M]. 吉林: 吉林科学出版社, 1998.
- [6] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [7] 陈哲超, 谢必峰, 林宇野. 黑曲霉产果胶酶特性的研究[J]. 食品科学, 1995, 16(2): 36-39.
- [8] 陈陶声. 酶制剂生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1987.
- [9] 赵允麟. 缬氨酶及在苹果汁中应用简介[J]. 食品工业, 2003, (2): 36-37.
- [10] 张倩. 缬氨酶及其在果蔬加工中的应用[J]. 食品工业科技, 2003, (10): 155-157. (责任编辑: 李春丽)

(上接第60页)

相当一部分丙酮酸流向乙酰 CoA, 使得从丙酮酸到缬氨酸的流量减少. 然而, 对发酵液进行有机酸的分析表明, 加入 VB<sub>1</sub> 可使发酵液中乙酸及草酰乙酸的质量浓度降低. 因此, 下一步选育缬氨酸的高产菌株, 除了进一步加强丙酮酸向缬氨酸方向流动

外, 还要设法减弱丙酮酸形成草酰乙酸和乙酰 CoA 方向的消耗. 减弱丙酮酸羧化酶活性和减少丙酮酸流向 TCA 循环的流量, 可望有效地提高缬氨酸产量和缬氨酸对葡萄糖的转化率.

## 参考文献:

- [1] 张伟国, 钱和. L-缬氨酸发酵条件的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 28-31.
- [2] Radmacher E, Vaitsikova A, Burger U, et al. Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 5: 2246-2250.
- [3] 蔡武城, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [4] 杨毅, 李崎, 陈蕴, 等. 反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定啤酒中的有机酸[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(8): 6-13.
- [5] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 等. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [6] 袁易全, 陈思忠. 近代超声原理与应用[M]. 南京: 南京大学出版社, 1996. 134.
- [7] Hermann Sahm, Lothar Eggeling, Bernd Eikmans, et al. Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16: 243-252.
- [8] 李琼. 以纯生物素代玉米浆、糖蜜的研究[J]. 广西轻工业, 2000, (4): 22-27.
- [9] Tosakao, Yoshiharay, Ikenas, et al. Production of L-lysine by fluoropyruvate sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*[J]. *Agric BioChem*, 1985, 50(5): 1305.
- [10] 张星元, 李秀敏, 杨毅, 等. 谷氨酸棒杆菌的氨基酸输送系统的存在、功能及其在氨基酸生产上的重要性[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 105-110.
- [11] Bauer K A, Ben-Ben-Bassat A, Dawson M, et al. Improved wxpression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutan[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(5): 1296.
- [12] 沈同, 王镜岩. 生物化学(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

(责任编辑: 杨勇)