

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (12) :1568 – 1575; 4 December 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150108

## 谷氨酸棒杆菌 S9114 中 *amn* 基因缺失对生理代谢的影响

梅婕<sup>1,2,3</sup>, 刘立明<sup>1,2,3\*</sup>, 吴剑荣<sup>2\*</sup>

江南大学,<sup>1</sup> 食品科学与技术国家重点实验室,<sup>2</sup> 工业生物技术教育部重点实验室,<sup>3</sup> 食品微生物制造工程实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:** 【目的】为了研究腺苷单磷酸核苷酶基因 (*amn*) 缺失对谷氨酸棒杆菌 S9114 生理代谢的影响。【方法】本文构建了 *amn* 基因缺失菌株  $\Delta amn$ , 并对谷氨酸发酵性能以及酸耐受性进行了比对分析。【结果】与野生菌株 WT 相比, *amn* 基因缺失菌株: (1) 细胞干重提高了 16.2%, 谷氨酸产量降低了 58.8%; (2) 发酵 10 h、25 h 和 40 h, 胞内 ATP 分别提高了 3.0、3.7 和 2.2 倍, 异柠檬酸裂合酶活性提高 17.1%、4.9% 和 44.5%, 异柠檬酸脱氢酶活性降低 76.9%、74.6% 和 5.0%, 谷氨酸脱氢酶活性降低 42.4%、50.8% 和 42.4%; (3) pH4.0 条件下存活率降低了 64.9%, 而胞内 ROS 和蛋白质羰基化水平提高了 31.5% 和 22.5%。【讨论】*amn* 基因的缺失提高了菌株的胞内 ATP 水平和生物量, 但是对谷氨酸发酵和酸性条件的耐受性却产生不利影响。

**关键词:** 谷氨酸棒杆菌, 腺苷单磷酸核苷酶基因, 基因敲除, L-谷氨酸, 酸耐受性

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1568-08

腺苷单磷酸核苷酶 (adenosine monophosphate nucleosidase) 在调节腺苷酸库中发挥着非常重要作用。当胞内 ATP 过量时, 它催化 AMP 分解生成腺嘌呤和 5-磷酸核糖, 导致 AMP 向 ADP 的合成量减少, 进而降低了腺苷酸库中 ATP 的含量; 当胞内 ATP 不足时, 腺苷单磷酸核苷酶的活性受到抑制, 减少了 AMP 的降解, 从而促进了 ATP 的合成<sup>[1]</sup>。早期, 关于 *amn* 基因的研究主要集中在该基因所编码酶的结构上。Giranda 等<sup>[2]</sup> 发现腺苷单磷酸核苷酶的四角形双椎体型晶体结构能够抵御辐射损伤; Zhang 等<sup>[3]</sup> 的研究表明腺苷单磷酸核苷酶的每个单体均由起催化作用和调节作用的两个部分组成。近年来, 对于 *amn* 基因的研究开始转向生理功能方

面。如 Morrison 等<sup>[4]</sup> 研究了 *amn* 基因对 *E. coli* 生理代谢的影响。研究结果表明, *amn* 基因的缺失提高了 *E. coli* 菌株的生长速率和对低温环境的耐受性。

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一种兼性好氧的革兰氏阳性菌<sup>[5]</sup>。自 1957 年被分离出来以后, 它便逐渐成为全世界范围内氨基酸生产的主要菌株, 如谷氨酸、赖氨酸和异亮氨酸等。其中, L-谷氨酸是全球市场需求量较大的氨基酸之一, 年产量超过 216 万吨<sup>[6]</sup>。在谷氨酸发酵中, 当菌体停止生长后才开始大量积累谷氨酸, 生物量过高或过低均不利于产物合成<sup>[7]</sup>。同时, 随着发酵过程中产物的积累, 发酵液的 pH 逐渐降低, 因此菌体的耐

**基金项目:** 国家自然科学基金 (21422602); 江南大学自主科研计划重点项目 (JUSRP51303A); 国家“863 计划” (2014AA021501)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: 刘立明, mingll@jiangnan.edu.cn; 吴剑荣, kinowu@jiangnan.edu.cn

**作者简介:** 梅婕 (1989-), 女, 安徽广德人, 硕士研究生, 主要从事微生物生理机制研究。E-mail: meijie1108@126.com

**收稿日期:** 2015-03-12; **修回日期:** 2015-06-21

酸性能对于谷氨酸的生产也起着至关重要的作用。由于 *amn* 基因的缺失能够影响细胞生长和对胁迫环境的耐受性<sup>[4]</sup>, 且该基因在谷氨酸棒杆菌中至今还未有过研究, 因此, 希望通过研究谷氨酸发酵和低 pH 耐受性来解析 *amn* 基因在谷氨酸棒杆菌中的生理功能。

为此, 作者以一株谷氨酸工业生产菌株 *Corynebacterium glutamicum* S9114 为出发菌株, 利用基因工程的手段构建了 *amn* 基因缺失菌株  $\Delta amn$ 。通过比较 2 株菌的谷氨酸发酵性能、胞内 ATP 和关

键酶活水平以及对低 pH 条件的耐受性, 详细解析了 *amn* 基因缺失对谷氨酸棒杆菌 S9114 生理代谢的影响, 为发展代谢工程改造策略提供一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒:** 本研究中所使用的菌株和质粒见表 1。

表 1. 本研究中所用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant genotype and property	Source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> JM109	recA1, supE44, endA1, hsdR1, gyrA96	Stored in this lab
<i>C. glutamicum</i> S9114	Wild type strain	Given by Prof. Zhonggui Mao
<i>C. glutamicum</i> S9114/ $\Delta amn$	Wild type strain with <i>amn</i> knock-out	This study
<b>Plasmids</b>		
pMD19-T Vector	T-vector, 2.7 kb, Amp <sup>R</sup> , lacZ	TaKaRa
pK18mobSacB	Mobilizable <i>E. coli</i> vector, Km <sup>R</sup> , Suc <sup>S</sup>	Stored in this lab
pK18mobSacB/ <i>amn-LR</i>	pK18mobSacB with <i>amn</i> in-frame deletion fragment <i>amn-LR</i>	This study

**1.1.2 培养基及培养条件:** (1) LB (g/L) 培养基: 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 氯化钠 10; (2) LBG (g/L) 培养基: 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 5; (3) LBHIS (g/L) 培养基: 酵母膏 2.5, 蛋白胨 5, 氯化钠 5, 脑心浸液 18.5, 山梨醇 91; (4) 感受态制备 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 氯化钠 10, 甘氨酸 30, 吐温 80; (5) 种子培养基 (g/L): 玉米浆 25, 葡萄糖 25, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub> 0.6, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.005, 尿素 2.5 (分消灭菌), pH7.2-7.3; (6) 发酵培养基 (g/L): 玉米浆 15,

葡萄糖 140, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 0.6, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.002, 硫胺素 5 × 10<sup>-5</sup>, 尿素 5 (分消灭菌), pH7.2-7.3。 *E. coli* 于 37 °C 培养, 必要时添加 50 mmol/L 的氨苄青霉素; *C. glutamicum* 于 32 °C 培养, 必要时添加 35 mmol/L 卡那霉素。

**1.1.3 引物:** 本研究所用的引物如表 2 所示。其中, *amn-L-A* 和 *amn-R-S* 有 20 bp 的互补碱基序列; *amn-L-pK18-S* 和 *amn-R-pK18-A* 为在 *amn* 基因的上下游设计的引物, 用来鉴定基因是否被敲除。

表 2. 本研究中所使用的引物

Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction sites
<i>amn-L-S</i>	CCCAAGCTTGGG CTCCAGGTTAAACGTGCCATC	Hind III
<i>amn-L-A</i>	AGCCAGTTCAGAGGCTCTCCAGATACGTAATCTTGCAGGGAT	—
<i>amn-R-S</i>	CTGCAAGATTACGTATCTGGAAGACCTCTGGAACCTGGCTC	—
<i>amn-R-A</i>	TCCCCCGGGGA GCTTAGGGTCTACGTGTTCAAAT	Sma I
<i>amn-L-pK18-S</i>	CACAATAGGAATCGGCAGGTAG	—
<i>amn-R-pK18-A</i>	GTGTCGTCGGACCTTAGCCT	—

### 1.2 敲除载体 pK18mobSacB/*amn-LR* 的构建

敲除质粒 pK18mobSacB/*amn-LR* 的构建流程如图 1 所示。首先, 以提取的 *C. glutamicum* S9114 的基因组为模板, 分别扩增 *amn* 基因上游和下游长度约为 800 bp 的基因片段, 利用重叠延伸 PCR, 获得 *amn* 基因内

部缺失 809 bp 的敲除框片段 *amn-LR*; 然后利用限制性内切酶 Hind III 和 Sma I 对质粒 pK18mobSacB 进行双酶切, 形成具有粘性末端的线性片段; 最后, 利用 T4 DNA ligase 连接敲除框 *amn-LR* 和酶切后的 pK18mobSacB 载体, 形成敲除质粒 pK18mobSacB/*amn-LR*。

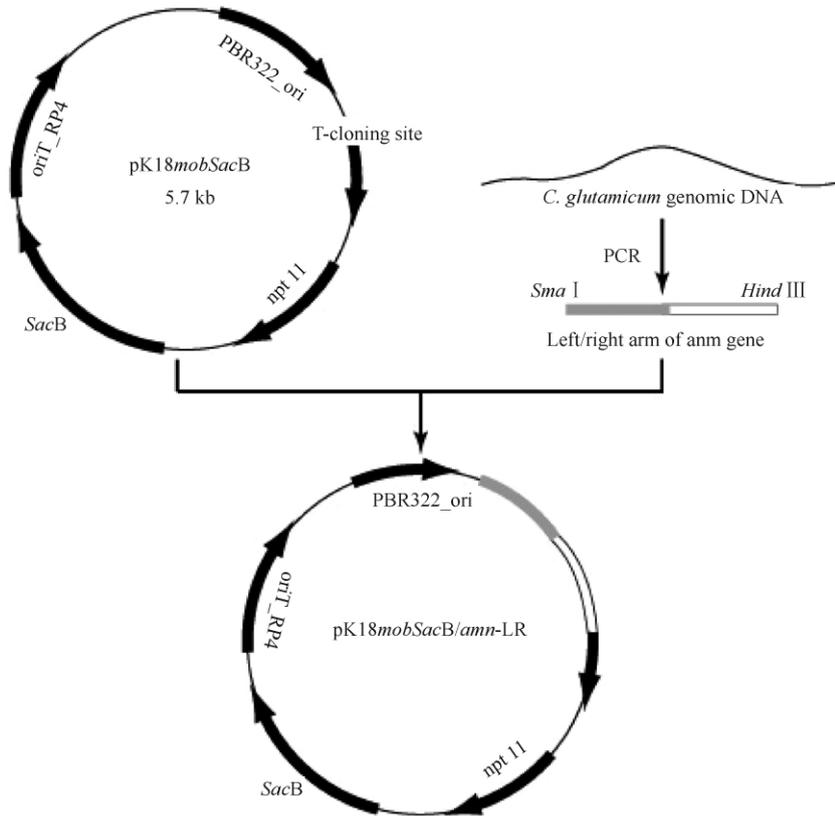


图 1. 敲除质粒 pK18mobSacB/amn-LR 的构建流程

Figure 1. Construction procedure of gene knock-out plasmid pK18mobSacB/amn-LR.

### 1.3 重组载体的电转化

*C. glutamicum* 感受态细胞的制备及电转化方法参考 Jang<sup>[8]</sup> 和 Van der Rest<sup>[9]</sup>, 最终确定的电转化条件为: 1.8 kV, 2 ms, 1 mm 电转杯。将敲除载体 pK18mobSacB/amn-LR 电转化 *C. glutamicum* 感受态细胞, 然后在含卡那霉素抗性的 LBHIS 平板和含 10% 蔗糖的 LBHIS 平板上进行两次筛选, 通过 PCR 验证获得 *amn* 基因部分缺失的  $\Delta amn$  菌株。

### 1.4 谷氨酸发酵条件及参数测定

**1.4.1 种子培养条件:** 从新鲜斜面上接一环菌接种到种子培养基 (50 mL/500 mL 锥形瓶), 32 °C、200 r/min 培养 8–9 h。

**1.4.2 发酵培养条件:** 7.5 L 发酵罐的装液量为 3 L, 接种量为 8%, 温度 32 °C, 通过自动流加 25%–28% 的氨水和稀硫酸将 pH 控制在 7.2–7.3, 通气量 1 vvm, 通过与转速相连将溶氧控制在 20% 左右, 测定培养基中葡萄糖浓度, 待浓度低于 5 g/L 时, 流加 500 g/L 的葡萄糖, 将糖浓度控制在 10%–15%, 根据泡沫情况添加消泡剂。

**1.4.3 菌体浓度的测定:** 将发酵液稀释一定的倍数, 在波长 620 nm 处测定吸光值。

**1.4.4 谷氨酸和葡萄糖浓度的测定:** 将样品稀释特定的倍数, 利用 SBA-40 型生物传感器测定。

### 1.5 胞内 ATP 水平测定

取 20 mL 不同时间点的发酵液, 离心去上清, 迅速置于液氮中保持 3 min, 并研磨破碎细胞, 加入预冷的 PBS 溶液, 用 HPLC 法测定 ATP 含量。色谱条件为: Agilent ZORBAX SB-Aq 反相柱, 检测波长 UV 254 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10  $\mu$ L, 流速 1 mL/min, 流动相为磷酸盐缓冲液 (10.93 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3.04 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3.22 g 四正丁基溴化铵, 超纯水定容至 1 L): 乙腈 = 86:14。

### 1.6 胞内关键酶活水平的测定

将发酵液样品离心取上清, 用 Tris-HCl 溶液 (50 mmol/L; pH7.5) 洗涤菌体 3 次, 加入 1 mL 的 Tris-HCl 溶液重悬细胞, 超声破碎。破碎条件为: 工作时间 2 s, 暂停时间 3 s, 累计破碎时间 10 min。然后 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 所得的上清液为粗酶

液,可用于后续的酶活测定。谷氨酸脱氢酶(GDH)的测定参考曹艳等<sup>[10]</sup>;异柠檬酸脱氢酶(ICDH)的测定参考 Popova 等<sup>[11]</sup>;异柠檬酸裂解酶(ICL)的测定参考余秉奇<sup>[12]</sup>。

### 1.7 不同 pH 条件下细胞存活率测定

将培养至对数期的菌株转接到不同 pH 的 LBG 液体培养基,使得其初始  $OD_{620}$  为 1,处理 2 h,离心收获细胞,梯度稀释  $10^{-5}$  倍,涂布 LBG 固体平板,对菌落进行计数,每个条件做 3 个平行;存活率 = 不同 pH 处理后的菌落数 / 不处理的对照组菌落数。

### 1.8 胞内 ROS 水平测定

采用 DCFH-DA 荧光标记法测定活性氧(Reactive oxygen species, ROS),具体方法参考 Si 等<sup>[13]</sup>。

### 1.9 胞内蛋白质羧基化水平测定

采用 DNPH 比色法测定,具体方法参考 Wehr 等<sup>[14]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 *amn* 基因缺失菌株 $\Delta amn$ 的构建

敲除质粒 pK18mobSacB/*amn*-LR 电转到 *C. glutamicum* 感受态细胞中后,会发生 2 次同源重组,将重组菌株涂布在含有卡那霉素的 LBHIS 平板和含 10% 蔗糖的 LBHIS 平板进行两轮筛选。能在卡那霉素平板上生长而不能在含 10% 蔗糖的平板上生长的单菌落认定为阳性转化子。进一步以转化子的基因组为模板,用验证引物 *amn*-L-pK18-S/*amn*-R-pK18-A 进行 PCR 验证,结果如图 2 所示。1 号通道表示对照,即以野生型菌株的基因组为模板 PCR 验证结果,条带大小为 2742 bp; 2 号通道为以突变菌株  $\Delta amn$  的基因组为模板 PCR 验证结果,条带大小为 1933

bp。表明,*amn* 基因敲除成功,*C. glutamicum* S9114/ $\Delta amn$  (简称  $\Delta amn$ ) 菌株构建完成。

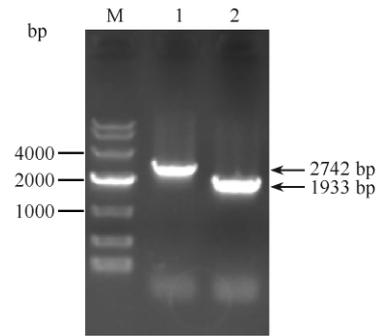


图 2. 突变菌株  $\Delta amn$  的 PCR 验证

Figure 2. Confirmation of  $\Delta amn$  strain by PCR. M: DL10000 DNA marker; lane 1: PCR result of WT strain genome; lane 2: PCR result of  $\Delta amn$  strain genome.

### 2.2 *amn* 基因缺失对谷氨酸发酵的影响

在 7.5 L 发酵罐上对比研究了工程菌株  $\Delta amn$  和野生菌株 WT 发酵生产谷氨酸的能力,结果如图 3 和表 3 所示。发现:(1) 42 h 发酵结束时,突变菌株  $\Delta amn$  的最终细胞干重比野生菌株 WT 高出 16.2%;(2) 突变菌株  $\Delta amn$  的谷氨酸浓度、谷氨酸生产强度、单位细胞生成谷氨酸能力、谷氨酸对葡萄糖得率分别比野生菌株 WT 下降了 58.8%、58.6%、64.5% 和 58.3%;(3) 结合图 3-D,发酵前 4 h,野生菌株 WT 的比生长速率大于突变菌株  $\Delta amn$ ,且在 1.3 h 获得最大比生长速率,为  $1.09 \text{ h}^{-1}$ ,而突变菌株  $\Delta amn$  则在 4.2 h 达到最大比生长速率 ( $0.45 \text{ h}^{-1}$ )。相比于野生菌株 WT,发酵前期突变菌株  $\Delta amn$  的比生长速率较小,生长较慢,延迟了菌体向产酸期转型,更多碳源用于细胞生长,导致最终生物量积累过高而不利于谷氨酸的生产<sup>[15]</sup>。

表 3. 谷氨酸发酵过程参数比较

Table 3. Comparison of parameters during glutamate fermentation process

Parameters	Strains		Change/ (B/A-1) × 100%
	WT (A)	$\Delta amn$ (B)	
Culture time/h	42	42	0
Glucose consumption/(g/L)	191.40 ± 2.57	199.50 ± 1.35	4.2
Maximum dry cell weight/(g/L)	29.10 ± 0.20	33.80 ± 0.24	16.2
The titer of glutamate/(g/L)	68.00 ± 1.53	28.0 ± 1.0	-58.8
Glutamate production/[g/(L·h)]	1.62 ± 0.03	0.67 ± 0.03	-58.6
Yield of glutamate on DCW/(g/g)	2.34 ± 0.04	0.83 ± 0.02	-64.5
Yield of glutamate on glucose/(g/g)	0.360 ± 0.008	0.150 ± 0.005	-58.3
Range of DO value/%	100 - 20	100 - 20	—

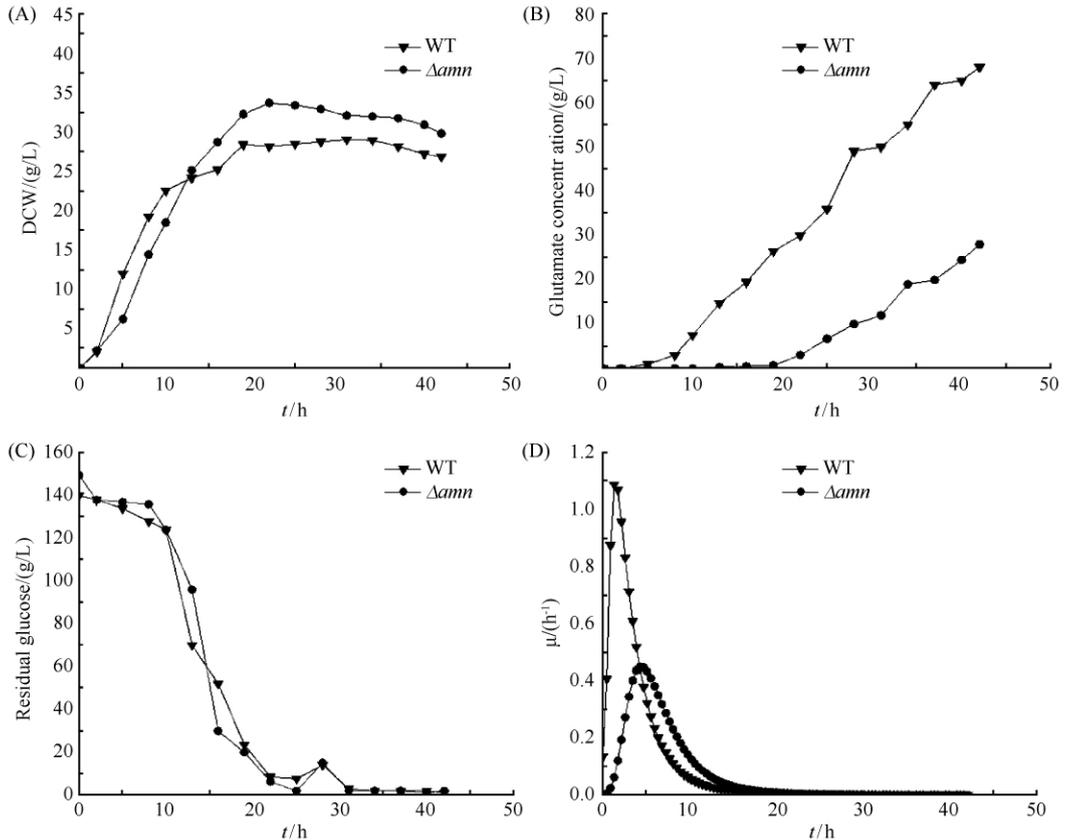


图 3. *C. glutamicum* S9114 谷氨酸发酵过程曲线

Figure 3. The glutamate fermentation process curve of *C. glutamicum* S9114.

### 2.3 *amn* 基因缺失对 *C. glutamicum* 胞内 ATP 水平和关键酶活性的影响

图 4-A 给出了突变菌株  $\Delta amn$  和野生菌株 WT 在发酵产酸前 (10 h)、中 (25 h)、后期 (40 h) 胞内 ATP 水平的结果, 由此可知: (1) 在整个发酵过程中, 2 个菌株的胞内 ATP 水平均呈现出先增加后减少的趋势; (2) 突变菌株  $\Delta amn$  的胞内 ATP 水平分别比野生菌株 WT 高出 3.0 倍 (0.031 mg/mg protein) (10 h)、2.7 倍 (0.068 mg/mg protein) (25 h) 和 2.2 倍 ( $0.36 \times 10^{-3}$  mg/mg protein) (40 h); (3) 从 10 h 到 25 h, 突变菌株  $\Delta amn$  和野生菌株 WT 胞内的 ATP 水平分别提高了 1.20 倍和 1.39 倍; 而从 25 h 到 40 h, 突变菌株  $\Delta amn$  和野生菌株 WT 胞内 ATP 水平分别降低了 94.7% 和 93.8%。*amn* 基因的缺失抑制了菌株胞内 AMP 的降解, 提高了胞内 ATP 水平<sup>[4]</sup>。

异柠檬酸裂合酶 (ICL)、异柠檬酸脱氢酶 (ICDH)、谷氨酸脱氢酶 (GDH) 是谷氨酸合成途径中重要的代谢节点。其在发酵过程中的酶活水平如

图 4 所示。在发酵产酸的前期 (10 h)、中期 (25 h)、后期 (40 h), 突变菌株  $\Delta amn$  的 ICL 活性逐渐降低, 且分别比野生菌株 WT 高出 17.1%、4.9% 和 44.5%; 在 10、25 和 40 h 时, 突变菌株  $\Delta amn$  中 ICDH 活性 (图 4-C) 基本维持稳定, 比野生菌株 WT 降低了 76.9%、74.6%、5.0%; 类似的, 突变菌株  $\Delta amn$  的 GDH 活性 (图 4-D) 呈现先增加后减小的趋势, 比野生菌株 WT 降低了 42.4%、50.8% 和 42.4%。上述结果表明, 突变菌株  $\Delta amn$  比野生菌株 WT 具有更高的 ICL 酶活, 而 ICDH 和 GDH 活性则被弱化, 谷氨酸合成的前体物质  $\alpha$ -酮戊二酸的生成量减少, 谷氨酸产量降低<sup>[16]</sup>。

### 2.4 *amn* 基因缺失对谷氨酸棒杆菌耐酸性的影响

不同 pH 条件下突变菌株  $\Delta amn$  和野生型菌株 WT 的存活率检测结果 (表 4) 显示: (1) 随着 pH 值的下降, 2 株菌的存活率均不断降低; (2) 突变菌株  $\Delta amn$  的存活率低于野生菌株 WT。在 pH6.0 时, 突变菌株  $\Delta amn$  的存活率与野生菌株 WT 相差不

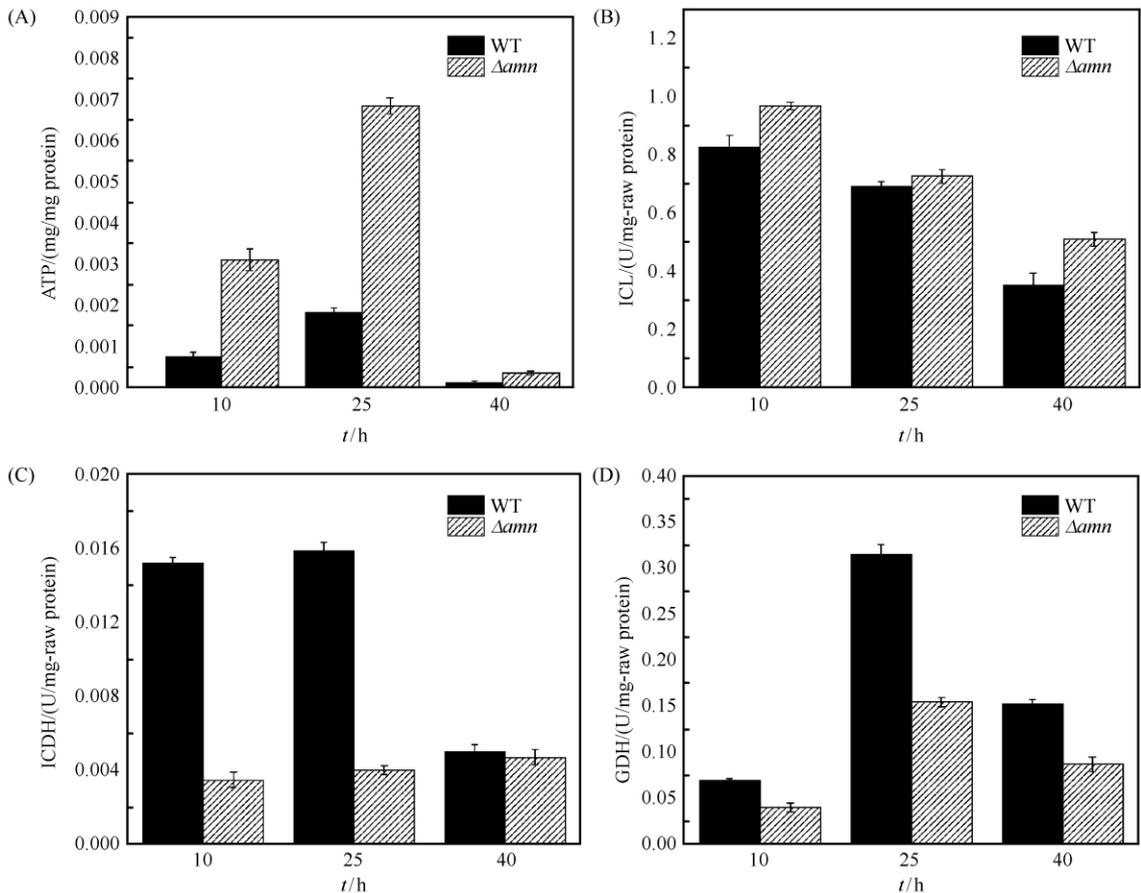


图 4. 发酵过程中胞内 ATP 水平和关键酶活性的变化

Figure 4. Changes of intracellular ATP level and enzyme activities in glutamate fermentation process.

大; pH5.0 时, 突变菌株  $\Delta amn$  的存活率比野生菌株 WT 下降了 16.8%; pH4.0 时下降了 64.9%; (3) 当 pH6.0 下降到 pH5.0 时, 突变菌株  $\Delta amn$  和野生菌株 WT 株的存活率分别下降了 53.5% 和 46.4%; 当 pH5.0 下降到 pH4.0 时, 突变菌株  $\Delta amn$  和野生菌株 WT 的存活率则分别降低了 96.4% 和 91.4%。原因在于低 pH 条件下不同菌株胞内的 ROS 和羰基化水平发生了变化, 如图 5 所示。在 pH7.0 条件下 (即正常生长条件下), 2 株菌具有相同的胞内 ROS 水平, 说明基因 *amn* 的缺失不改变胞内 ROS 水平; 但在 pH4.0 条件下, 突变菌株  $\Delta amn$  的 ROS 水平比野生菌株 WT 提高了 31.5%。类似的, 突变菌株  $\Delta amn$  在 pH4.0 时蛋白质羰基化水平比野生菌株 WT 提高了 22.5%。表明基因 *amn* 的缺失导致菌株对酸性条件的耐受性降低。其原因在于 *amn* 基因的缺失提高了胞内 ROS 和蛋白质羰基化水平, 影响了菌株在酸性条件下的胞内氧化还原状态, 引起了细胞的 DNA 损伤、蛋白质和脂质的氧化等, 进而降

低了菌株的存活率<sup>[13]</sup>。

表 4. pH 对不同菌株存活率的影响 (%)

Table 4. Effect of pH on the survivability of different strains (%)

Parameter	Strains		Change/ (B/A-1) × 100%
	WT (A)	$\Delta amn$ (B)	
No stress	100	100	0
pH6.0	80.10 ± 1.06	76.80 ± 5.95	-4.1
pH5.0	42.90 ± 5.70	35.70 ± 4.93	-16.8
pH4.0	3.70 ± 0.41	1.30 ± 0.28	-64.9

### 3 结论

本研究在 *C. glutamicum* S9114 的基础上, 运用分子生物学手段构建了 *amn* 基因缺失菌株 *C. glutamicum* S9114/ $\Delta amn$ , 研究了 *amn* 基因缺失对菌株的谷氨酸发酵性能、胞内 ATP 水平及关键酶活

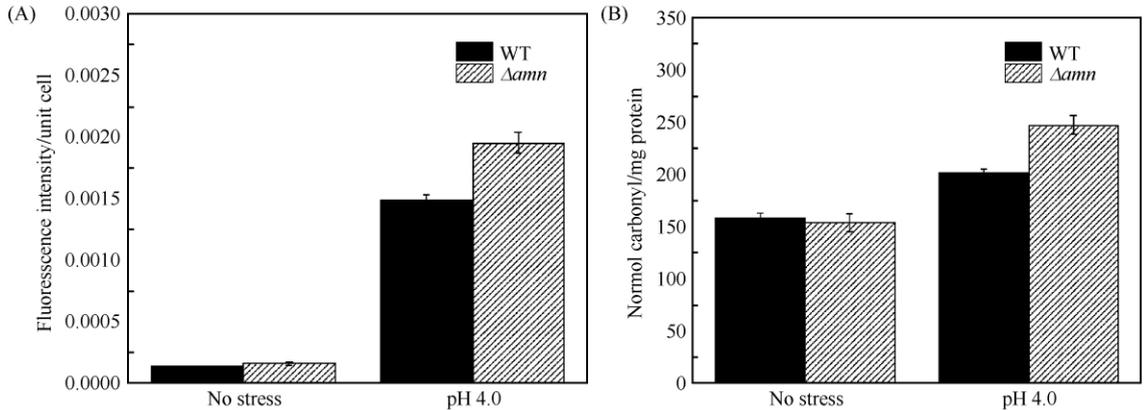


图 5. 胞内 ROS 和蛋白质羧基化水平分析

Figure 5. Intracellular ROS (A) and protein carbonylation (B) level analysis.

性变化和对酸性条件耐受性的影响。研究结果表明,谷氨酸棒杆菌 S9114 中 *amn* 基因的缺失提高了菌株胞内 ATP 水平,影响了关键酶活性,降低了谷氨酸产量和对低 pH 条件的耐受性。然而,本研究尚未发现 *amn* 基因分子水平的调控方式和在代谢途径中的作用靶点,*amn* 基因缺失对细胞生长、胞内 ATP 水平、乙醛酸循环酶系、谷氨酸生物合成和酸耐受性等表型影响之间的关系尚不明确,有待于进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Ataulkhanov FI, Vitvitsky VM. What determines the intracellular ATP concentration. *Bioscience Reports*, 2002, 22(5/6): 501-511.
- [2] Giranda VL, Berman HM, Schramm VL. Crystallization and preliminary X-ray study of AMP nucleosidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(32): 15307-15309.
- [3] Zhang Y, Cottet SE, Ealick SE. Structure of *Escherichia coli* AMP nucleosidase reveals similarity to nucleoside phosphorylases. *Structure*, 2004, 12(8): 1383-1394.
- [4] Morrison BA, Shain DH. An AMP nucleosidase gene knockout in *Escherichia coli* elevates intracellular ATP levels and increases cold tolerance. *Biology Letters*, 2008, 4(1): 53-56.
- [5] Udaka S. Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *Journal of Bacteriology*, 1960, 79: 754-755.
- [6] Lindner SN, Seibold GM, Henrich A, Kramer R, Wendisch VF. Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3571-3581.
- [7] Zhang CY, Shi ZP, Gao P, Duan ZY, Mao ZG. On-line prediction of products concentrations in glutamate fermentation using metabolic network model and linear programming. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 25(2): 99-108.
- [8] Jang KH, Britz ML. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(7): 539-545.
- [9] van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(4): 541-545.
- [10] Cao Y, Ding J, Duan Z, Liu L, Shi Z. On-line glucose concentration prediction and control for improving glutamate fermentation performance. *Microbiology*, 2009, 36(10): 1619-1624. (in Chinese)  
曹艳, 丁健, 段作营, 刘立明, 史仲平. 在线推定和控制葡萄糖浓度改善谷氨酸发酵性能. *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1619-1624.
- [11] Popova OV, Ismailov SF, Popova TN, Dietz KJ, Golldack D. Salt-induced expression of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta*, 2002, 215(6): 906-913.
- [12] Yu B, Shen W, Wang Z, Zhu G. Glyoxylate cycle is required for the over production of glutamate but is not essential for *Corynebacterium glutamicum* growth on

*glucose*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21 (2) : 270-274. (in Chinese)

余秉琦, 沈微, 王正祥, 诸葛健. 谷氨酸棒杆菌的乙醛酸循环与谷氨酸合成. *生物工程学报*, 2005, 21 (2) : 270-274.

- [13] Si MR, Zhang L, Yang ZF, Xu YX, Liu YB, Jiang CY, Wang Y, Shen XH, Liu SJ. NrdH redoxin enhances resistance to multiple oxidative stresses by acting as a peroxidase cofactor in *Corynebacterium glutamicum*.

*Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (5) : 1750-1762.

- [14] Wehr NB, Levine RL. Quantification of protein carbonylation. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 965 : 265-281.
- [15] 姚辉. 谷氨酸棒杆菌 S9114 的发酵优化及生物素对谷氨酸发酵的调控. 江南大学硕士学位论文, 2013.
- [16] 曹艳. 利用代谢酶学和模型技术改善谷氨酸发酵的稳定性和糖酸转化率. 江南大学博士学位论文, 2013.

## Effect of *amn* gene deletion on *Corynebacterium glutamicum* S9114 metabolism

Jie Mei<sup>1,2,3</sup>, Liming Liu<sup>1,2,3\*</sup>, Jianrong Wu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>State key laboratory of Food Science and Technology, <sup>2</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education,

<sup>3</sup>Laboratory of Food, Microbial-Manufacturing Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] To study the effect of adenosine monophosphate nucleosidase gene deletion on *Corynebacterium glutamicum* S9114 metabolism. [Methods] We constructed the *amn* deficient strain  $\Delta amn$  and studied its glutamate fermentation and acid tolerance. [Results] Compared with the wild type strain, biomass of  $\Delta amn$  strain increased by 16.2% whereas glutamate production reduced by 58.8%. After 10, 25 and 40 h, intracellular ATP level of  $\Delta amn$  strain increased 3.0, 3.7 and 2.2 times. The isocitrate lyase activity increased by 17.1%, 4.9% and 44.5%, the isocitrate dehydrogenase activity decreased by 76.9%, 74.6% and 5.0%, and the glutamate dehydrogenase activity decreased by 42.4%, 50.8% and 42.4%. At pH4.0, the survival of  $\Delta amn$  strain dropped 64.9%. However, the intracellular ROS and protein carbonylation level showed an increase of 31.5% and 22.5% respectively. [Conclusion] Knocking out of *amn* gene enhanced intracellular ATP level and biomass formation, whereas had negative effect on glutamate fermentation and acid tolerance.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum* S9114, adenosine monophosphate nucleosidase gene, gene knockout, L-glutamate, acid tolerance

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21422602), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51303A) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2014AA021501)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: Liming Liu, mingll@jiangnan.edu.cn; Jianrong Wu, kinowu@jiangnan.edu.cn

Received: 12 March 2015/Revised: 21 June 2015