



## 离子转运蛋白调控钝齿棒杆菌离子和 pH 稳态促进 L-精氨酸合成

刘晶<sup>1</sup>, 徐美娟<sup>1\*</sup>, 满在伟<sup>2</sup>, 高惠芳<sup>1</sup>, 张显<sup>1</sup>, 杨套伟<sup>1</sup>, 许正宏<sup>1</sup>, 饶志明<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学生物工程学院, 工业微生物教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

<sup>2</sup>常州大学石油化工学院, 食品学院, 江苏 常州 213164

**摘要:** L-精氨酸是一种半必需氨基酸, 广泛应用于食品、制药、饲料等行业。【目的】当前对 L-精氨酸生产菌株的研究, 极少涉及离子转运领域。在本研究中, 发现在发酵时适量添加外源  $K^+$  有利于促进钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) SYPA5-5 合成 L-精氨酸。【方法】在 *C. crenatum* SYPA5-5 发酵培养基外源添加 0.5 g/L 和 2.5 g/L 的  $K_3PO_4$ , 取对数期发酵样品进行转录组数据分析, 挖掘出  $K^+$  转运相关的阳离子转运 ATP 酶 CTAP1 以及单价阳离子/ $H^+$  逆转运蛋白 Mrp1A, 研究其在 *C. crenatum* SYPA5-5 快速合成 L-精氨酸阶段, 对菌株生长及 L-精氨酸合成的影响。【结果】对基因 *ctap1* 和 *mrp1* 分别进行敲除和过表达, 深入研究突变株对 L-精氨酸合成的影响。研究发现同时过表达离子转运蛋白 CTAP1 和 Mrp1A 更有利于胞内离子、pH 稳态和渗透压调节, 最终提高 L-精氨酸的产量。在补料分批发酵中分别过表达 Mrp1A、CTAP1 以及同时过表达 Mrp1A 和 CTAP1 的菌株 L-精氨酸产量分别达到 61.4 g/L、63.9 g/L 和 65.3 g/L, 产率分别为 0.383 g/g、0.392 g/g 和 0.395 g/g, 比 *C. crenatum* SYPA5-5 分别提高了 34.9%、38.0% 和 39.1%。【结论】CTAP1 是特异性的  $K^+$  转运 ATP 酶, 可以将培养基中的  $K^+$  运输到胞内。同时 Mrp1A 可将胞内  $K^+$  和  $Na^+$  等单价阳离子运输到胞外, 将胞外  $H^+$  运输至胞内, 中和胞内 L-精氨酸所导致的碱性环境, 从而维持胞内 pH 稳定。CTAP1 和 Mrp1A 的研究为解析离子转运机制和 L-精氨酸合成之间的联系奠定了基础。

**关键词:** 钝齿棒杆菌 SYPA5-5, 阳离子转运 ATP 酶 CTAP1, 单价阳离子/ $H^+$  逆转运蛋白 Mrp1A, 钾离子

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0900300); 国家自然科学基金(31770058); 江苏省自然科学基金(BK20181205); 宁夏回族自治区重点研发计划(2019BCH01002); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助(LITE2018-06)

\*通信作者: 徐美娟, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; 饶志明, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-12-07; 修回日期: 2020-02-09; 网络出版日期: 2020-05-08

L-精氨酸是一种天然碱性氨基酸，水溶液呈强碱性，pH 10.5–12.0。其在食品添加剂、调味品和制药行业有着广泛的应用<sup>[1–2]</sup>且有益于人类的生长发育<sup>[3]</sup>。L-精氨酸生产方法之一为水解法，但由于大量使用腐蚀性化学物质，该方法对环境有害。而利用微生物发酵生产 L-精氨酸相对简单且对环境的影响较小<sup>[4–5]</sup>。在本研究中，*C. crenatum* SYPA5-5 又称 SDNN403，为课题组通过诱变选育得到的一株 L-精氨酸高产菌株<sup>[6]</sup>。课题组前期研究发现 *C. crenatum* SYPA5-5 的 *argR* 基因发生终止突变，导致阻遏蛋白 ArgR 失去活性，这是 *C. crenatum* SYPA5-5 高产 L-精氨酸的前提<sup>[7–8]</sup>。在 *C. crenatum* SYPA5-5 中过表达基因簇 *argCJBDFRGH*，可提高 L-精氨酸产量<sup>[7,9]</sup>。定点突变 *C. crenatum* SYPA5-5 中的 N-乙酰谷氨酸激酶(NAGK)，NAGK 对 L-精氨酸具有抗反馈抑制作用，因此过表达 NAGK 可提高 L-精氨酸产量<sup>[7, 10]</sup>。通过调控 *C. crenatum* SYPA5-5 中的 6-磷酸葡萄糖异构酶、天冬氨酸激酶和谷氨酸激酶的酶活水平，可以促进胞内 NADPH 再生同时弱化副产物合成，从而进一步提高 L-精氨酸产量<sup>[2]</sup>。

前期研究发现 *C. crenatum* SYPA5-5 在无  $K^+$  存在的情况下添加磷酸根，L-精氨酸合成明显下降，且添加浓度越高产量下降越显著，摇瓶发酵 L-精氨酸产量由不加  $K^+$  的 20 g/L 降至 5 g/L。且据文献报道  $K^+$  是胞内含量最丰富的离子，参与多种细胞生理活动<sup>[11]</sup>。 $K^+$  可以控制质膜电位，调节胞内 pH，激活胞内酶<sup>[11–13]</sup>。在酸性条件下，棒杆菌的生长完全取决于  $K^+$  的有效性和内部积累<sup>[13]</sup>。此外， $K^+$  还可以作为一种渗透溶质，在高渗透压胁迫下，许多细菌迅速积累  $K^+$  以恢复其膨胀压<sup>[12, 14]</sup>。Wilson 等报道，棒杆菌在胞内外形成离子梯度，

在细菌的离子转运过程中发挥着至关重要的作用，尤其是  $H^+$ 、 $K^+$  和  $Na^+$  是细菌中最关键、最重要的一价阳离子<sup>[15]</sup>。细菌的转运系统也在不同的胞外环境下发挥作用，如碱性 pH 和高渗透压条件<sup>[16]</sup>。 $H^+$  用于调节胞内 pH，从而保证适宜的胞内环境。 $Na^+$  对细菌细胞的重要性通常归因于其在溶质吸收中的作用<sup>[16]</sup>。因此离子在胞内外的分布影响着菌体的存活。

呼吸链对细菌很重要，质子跨膜转移产生的初级电化学电位，是许多重要转运的驱动力。沈锡辉等报道质子通过电化学电位进入细胞，随着运输，离子被暂时困在胞内和胞外<sup>[17]</sup>。一旦外部通道打开，如图 1 所示，3 个  $Na^+$  输出到胞外，随之 2 个  $K^+$  运输到胞内。如前所述，电化学质子电位是一些重要的细胞过程如 ATP 合成或代谢物运输的驱动力。这种由电化学质子电位驱动的交流受  $H^+$ -ATP 酶的调节，且有助于维持离子梯度<sup>[18–19]</sup>，证实了  $Na^+/H^+$  或  $K^+/H^+$  的转运在调节离子浓度、pH 和渗透压稳态等重要生理功能中的作用<sup>[20]</sup>。

前期研究发现，*C. crenatum* SYPA5-5 外源添加 2.5 g/L  $K_3PO_4$  时 L-精氨酸产量较外源添加 0.5 g/L  $K_3PO_4$  高。通过转录组数据分析，发现 *C. crenatum* SYPA5-5 的大部分单价阳离子/ $H^+$  逆转运蛋白和阳离子转运 ATP 酶在 L-精氨酸合成阶段转录水平明显提高，因此我们挖掘了表达水平显著提高的离子转运蛋白 Mrp1A 和 CTAP1，并以 *C. crenatum* SYPA5-5 为模板，扩增出目的基因片段 *mrp1* 和 *ctap1*，测序后，与野生型菌株进行序列比对，发现转运蛋白 Mrp1A 和 CTAP1 并未发生突变，进而探讨其对维持 *C. crenatum* SYPA5-5 胞内离子浓度和 pH 稳定、促进 L-精氨酸合成的作用。

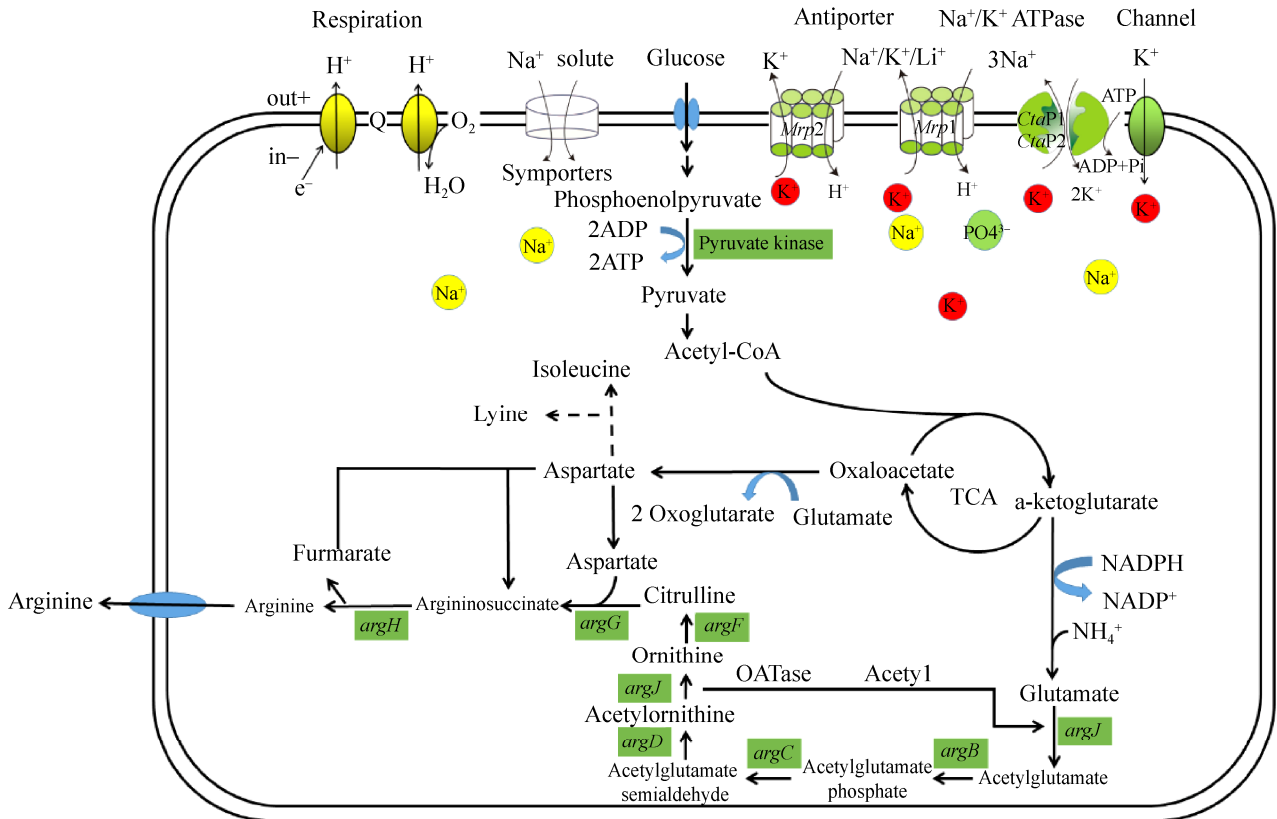


图 1. 钝齿棒杆菌 SYP5-5 离子转运蛋白的转运机理

Figure 1. The mechanism of ion transporter in *C. crenatum* SYP5-5.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本研究所用的菌株、质粒和引物见表 1 和表 2。

**1.1.2 主要试剂:** 酵母提取物、蛋白胨、酵母浸粉等, 各种分子操作工具酶, 总 RNA 提取、反转录和荧光定量 PCR 试剂盒, 细菌基因组和质粒提取试剂盒。

**1.1.3 主要实验仪器:** 本研究所用实验仪器主要包括美国瓦里安有限公司的 ICP-MS, 美国安捷伦公司液相色谱, 南京江南光电电子显微镜, 德国 Eppendorf 公司 5 L 发酵罐, 日本东芝公司超声波破碎仪, 山东省科学院生物研究所 SBA 生物

传感器, 上海尤尼柯仪器有限公司紫外可见分光光度计和德国徕卡显微系统公司激光共聚焦显微镜等。

**1.1.4 培养基:** LB 培养基: 酵母提取物 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 1%; LB0 培养基: 酵母提取物 0.5%, 蛋白胨 1%; LBG 培养基: LB+葡萄糖 0.5%; LBGS 培养基: LBG+蔗糖 20%。

摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 11% (与其他组分分开灭菌), 酵母浸粉 1%, KCl 0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002%,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.002%,  $\text{CaCO}_3$  2%。

发酵罐发酵种子培养基: 葡萄糖 5%, 酵母浸粉 2%, KCl 0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%,  $\text{CaCO}_3$  0.1%。

表 1. 本研究所用菌株和质粒  
Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Description	Source
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
<i>E. coli</i> JM109	General cloning host	TaKaRa
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for recombinant protein production	Novagen
<b><i>Corynebacterium crenatum</i></b>		
SYPA5-5	L-arginine-producing strain	Our lab
5-5 $\Delta$ <i>ctap1</i>	SYPA5-5 with deletion of <i>ctap1</i>	This study
5-5 $\Delta$ <i>mrp1</i>	SYPA5-5 with deletion of <i>mrp1</i>	This study
5-5(p10)	SYPA5-5 derivative harboring pDXW-10	This study
5-5( <i>ctap1</i> )	SYPA5-5 derivative harboring pDXW-10- <i>ctap1</i>	This study
5-5( <i>mrp1</i> )	SYPA5-5 derivative harboring pDXW-10- <i>mrp1</i>	This study
5-5( <i>mrp1ctap1</i> )	SYPA5-5 derivative harboring pDXW-10- <i>ctap1</i> and pDXW-10- <i>mrp1</i>	This study
<b>Plasmids</b>		
pK18 <i>mobsacB</i>	Kan <sup>r</sup> ; vector for in-frame deletions	[21]
pK18 $\Delta$ <i>ctap1</i>	For in-frame deletion of <i>ctap1</i>	This study
pK18 $\Delta$ <i>mrp1</i>	For in-frame deletion of <i>mrp1</i>	This study
pDXW-10	Kan <sup>r</sup> ; shuttle vector between <i>E. coli</i> and <i>C. crenatum</i>	[22]
pDXW-10- <i>ctap1</i>	Derived from pDXW-10, for constitutive expression of <i>ctap1</i>	This study
pDXW-10- <i>mrp1</i>	Derived from pDXW-10, for constitutive expression of <i>mrp1</i>	This study
pDXW-10- <i>mrp1ctap1</i>	Derived from pDXW-10, for constitutive expression of <i>mrp1</i> and <i>ctap1</i>	This study

表 2. 本研究所涉及的引物  
Table 2. Primers used in this study

Primers	DNA Sequence (5'-3') <sup>a</sup>
$\Delta$ <i>ctap1</i> -1	CGCGGATCCCAAATCCCTGGATGTTATTC( <i>Bam</i> H I)
$\Delta$ <i>ctap1</i> -2	<b><i>CTTTGCGCCCTCACGAATCGCGTCACCCGTGAGATAAGACTCATC</i></b>
$\Delta$ <i>ctap1</i> -3	<b><i>GACGCGATTTCGTGAGGGCGCAAAG</i></b>
$\Delta$ <i>ctap1</i> -4	CCCAAGCTTTGCTTCGGACGTGACATCGGAG( <i>Hind</i> III)
$\Delta$ <i>mrp1</i> -1	ATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTGCACCGTCAGCCGC
$\Delta$ <i>mrp1</i> -2	<b><i>CCCATCCACTAAACTTAAACAGCATTATCCCTAATCGCCAT</i></b>
$\Delta$ <i>mrp1</i> -3	<b><i>TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGTTCTCGCACTGACAGTCGC</i></b>
$\Delta$ <i>mrp1</i> -4	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTCGCGAAAGGCACGATGATGT
10- <i>ctap1</i> -F	GCAGCTTAAGCCGCGGAATGCTGGTCAGGGACATTTTAT
10- <i>ctap1</i> -R	CGCTAGCGAGCTCCCACTAAGAACTTTTCTTGCATATC
10- <i>mrp1</i> -F	CGCCAAAACAGAAGCTTATGAGTTTGCTATTTGTTGTGGC
10- <i>mrp1</i> -R	CAGATCTCCGCGGCTTAAGTCATCGGTTTGCCTCCTCTTT
10- <i>mrp1ctap1</i> -1	GCCAAAACAGAAGCTTATGAGTTTGCTATTTGTTGTGGC
10- <i>mrp1ctap1</i> -2	<b><i>AATGTCCCTGACCAGCATTATCGGTTTGCCTCCTCTTTG</i></b>
10- <i>mrp1ctap1</i> -3	<b><i>CAAAGAGGAGGCAAACCGATGAATGCTGGTCAGGGACATT</i></b>
10- <i>mrp1ctap1</i> -4	GGGTACCAGATCTCCGCGGCTAAGAACTTTTCTTGCATATCAAAT

<sup>a</sup>The underlined part is the restriction site. The italicized part is the reverse complementary sequence.

发酵罐发酵初始培养基: 葡萄糖 7%, 酵母浸粉 0.8%, KCl 0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.002%,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.002%。

发酵罐发酵补料培养基: 葡萄糖 50%, 酵母浸粉 0.8%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2%。

钝齿棒杆菌电转感受态培养基: 蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1%, 葡萄糖 1%, 甘氨酸 0.4%, 异烟肼 0.4%, 吐温 80 0.1%。

## 1.2 菌株的生长

挑一环平板活化的钝齿棒杆菌菌落接入液体 LBG 培养基中, 30 °C、180 r/min 回旋式摇床培养至  $OD_{600} \approx 10.0$ 。

## 1.3 转录组数据分析

*C. crenatum* SYPA5-5 发酵至对数中后期, 收集发酵样品, 立即 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 弃上清后, 液氮速冻, -80 °C 保存, 转录组样本送南京诺唯赞有限公司进行 RNA 提取, RNA 质检合格后用于转录组测序。获得原始测序数据后, 进行基因表达分析、基因差异表达分析、KEGG Pathway 功能富集分析等。

## 1.4 重组菌的构建

**1.4.1 敲除质粒的构建:** 以 *C. crenatum* SYPA5-5 基因组为模板, 利用引物对  $\Delta mrp1-1/\Delta mrp1-2$  和  $\Delta mrp1-3/\Delta mrp1-4$  扩增出 *mrp1* 基因上下游片段各 500 bp。回收后, 以上下游片段为模板, 利用 *mrp1-1* 和 *mrp1-4* 引物融合 PCR 扩增出 *mrp1* 基因缺失片段。纯化回收 PCR 产物获得 *mrp1* 基因缺失片段, pK18 质粒酶切产物纯化回收, 利用同源重组酶进行连接。连接产物经热激转化 *E. coli* JM109 感受态, 卡那霉素抗性平板培养筛选转化子, 并进行

质粒提取、酶切、PCR 和测序验证。验证正确, 表明质粒 pK18 $\Delta mrp1$  构建成功。

以 *C. crenatum* SYPA5-5 基因组为模板, 利用引物对  $\Delta ctap1-1/\Delta ctap1-2$  和  $\Delta ctap1-3/\Delta ctap1-4$  同样方法扩增出 *ctap1* 基因缺失片段。PCR 产物和 pK18 质粒纯化后利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 纯化回收 *ctap1* 基因缺失片段和 pK18 质粒酶切产物并进行过夜连接。用相同的方法进行转化、筛选、验证, 成功获得质粒 pK18 $\Delta ctap1$ 。

**1.4.2 过表达质粒的构建:** 以 *C. crenatum* SYPA5-5 基因组为模板, 利用表 2 所列引物进行 PCR 扩增即可获得 *mrp1* 基因片段, pDXW-10 质粒利用限制性内切酶在 MCS (多克隆位点处) 进行酶切。酶切结束后, 纯化回收 *mrp1* 基因和 pDXW-10 线性化载体, 同源重组酶进行连接。连接产物热激转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 卡那霉素抗性平板培养筛选转化子, 并进行质粒提取、酶切、PCR 和测序验证。验证正确, 表明质粒 pDXW-10-*mrp1* 构建成功。同样方法构建质粒 pDXW-10-*ctap1*。

以 *C. crenatum* SYPA5-5 基因组为模板, 利用引物对 10-*mrp1ctap1-1/2* 和 10-*mrp1ctap1-3/4* 分别扩增出上游 *mrp1* 和下游 *ctap1* 基因片段。回收后, 以上下游片段为模板, 利用引物对 10-*mrp1ctap1-1/4* 融合 PCR 扩增出串联基因 *mrp1ctap1*。纯化回收 PCR 产物获得 *mrp1ctap1* 基因片段, pDXW-10 质粒酶切产物纯化回收, 利用同源重组酶进行连接。连接产物经热激转化 *E. coli* BL21 感受态, 卡那霉素抗性平板培养筛选转化子, 并进行质粒提取、酶切、PCR 和测序验证。验证正确, 表明质粒 pDXW-10-*mrp1ctap1* 构建成功。

**1.4.3 重组菌株的构建:** 敲除质粒 pK18 $\Delta$ mrp1 电击转化至 *C. crenatum* SYPA5-5 菌株感受态细胞, 培养 2 h 后离心收集细胞涂布于卡那霉素(15  $\mu$ g/L)抗性平板。30 °C 培养 36–48 h 进行第一轮筛选, 所长转化子即为发生第一次同源重组的菌株。挑取相应转化子菌落于无抗生素的 LBG 培养基中摇瓶培养 12 h, 培养过程中极少数细胞发生第二次同源重组。吸取 20–50  $\mu$ L 培养液涂布于含有 20% 蔗糖无抗生素的 LBG 固体培养基, 36–48 h 后进行第二轮筛选, 随机对蔗糖平板上发生第二次同源重组的转化子进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定正确的菌株即为 5-5 $\Delta$ mrp1 菌株。同样的方法构建突变株 5-5 $\Delta$ ctap1。

过表达质粒 pDXW-10-mrp1 电击转化至 *C. crenatum* SYPA5-5 菌株感受态细胞, 培养 2 h 后离心收集细胞涂布于卡那霉素(15  $\mu$ g/L)抗性平板。30 °C 培养 36–48 h, 随机挑取 LBG 平板上的转化子进行 PCR 鉴定, 鉴定正确的菌株即为 5-5 (mrp1) 菌株。同样的方法构建突变株 5-5 (ctap1) 和 5-5 (mrp1ctap1)。

### 1.5 胞内[Na<sup>+</sup>]/[K<sup>+</sup>]测定

取 1 mL 菌液 8000 r/min 离心 2 min。弃上清, 蒸馏水洗涤菌体 3 次, 60 °C 烘干, 称细胞干重, 1  $OD_{562}$ =0.375 g/L 细胞干重。取烘干菌体, 用 1 mL 浓硝酸完全消化至澄清, 再稀释 100 倍。将稀释后的液体经膜过滤, 用 ICP-MS 法检测胞内 [Na<sup>+</sup>]/[K<sup>+</sup>]的含量。用超纯水进行校准。

### 1.6 BCECF-AM 荧光探针检测胞内 pH

按照东仁化学科技 BCECF-AM 试剂盒说明书, 取 1 mL 发酵液 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 用 HEPES 制备细胞悬液, 细胞浓度为

4 $\times$ 10<sup>7</sup> 个/mL。将 1 mmol/L 的 BCECF-AM/DMSO 溶液加入细胞悬液中, 37 °C 培养 30 min。用 HEPES 缓冲液清洗细胞 3 次, 制成 3 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL 的细胞悬液。使用激光共聚焦显微镜在激发波 500 nm、发射波 530 nm 处检测细胞的荧光强度。制作不同 pH 值对应的 FIR (荧光强度比值)标准曲线, 通过荧光强度判断胞内酸碱性<sup>[23]</sup>。

### 1.7 胞内丙酮酸激酶活性测定

取摇瓶发酵 24 h 的样品, 离心后弃上清, 按照索莱宝-丙酮酸激酶活性检测试剂盒说明书加入试剂, 在 340 nm 处, 记录各管吸光值变化。根据说明书公式计算丙酮酸激酶的活力。

### 1.8 重组菌株发酵

取方法 1.2 中培养的种子液 1.5 mL 接入含 30 mL 摇瓶发酵培养基 CgXII<sup>[24]</sup>的 250 mL 摇瓶中或取 2.5 mL 接入含 50 mL 摇瓶发酵培养基的 500 mL 摇瓶中, 30 °C、180 r/min 往复式摇床发酵培养。

取方法 1.2 中培养的种子液 15 mL 全部转接入 1000 mL 带挡板含 150 mL 发酵罐发酵种子培养基的摇瓶中, 30 °C、180 r/min 回旋式摇床培养至  $OD_{600}$ ≈25.0 作为二级种子液。二级种子液全部接入装有 1.5 L 发酵罐发酵初始培养基的 5 L 发酵罐中。当葡萄糖残留浓度小于 10 g/L 时, 补料。通过监测发酵液的残余葡萄糖浓度, 控制进料速度。补料分批发酵 30 °C, 通过自动添加 50% 氨水, pH 值维持在 7.0。搅拌速度 600 r/min, 空气流量 1 m<sup>3</sup>/(m<sup>3</sup>·min)。

### 1.9 产物分析

根据菌体  $OD_{562}$  与 DCW 的线性关系 1  $OD_{562}$ =0.375 g/L DCW, 由  $OD_{562}$  计算细胞干重(DCW)。

发酵液 8000 r/min 离心 10 min 后, 上清用于测定葡萄糖和氨基酸。生物传感分析仪 SBA-40C 测定残糖量。高效液相色谱测定<sup>[25]</sup>氨基酸浓度。

## 2 结果和分析

### 2.1 K<sup>+</sup>和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>对 L-精氨酸合成的影响

前期研究对 *C. crenatum* SYPA5-5 发酵培养基优化实验, 发现在菌株合成 L-精氨酸阶段, 无 K<sup>+</sup>存在的情况下添加磷酸根(Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)L-精氨酸合成有明显的下降, 且添加浓度越高产量下降越明显, 摇瓶发酵 L-精氨酸产量由不加 K<sup>+</sup>的 20 g/L 降至 5 g/L。而含有 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>摇瓶发酵 L-精氨酸产量保持在 20 g/L 以上。因此发酵培养基中缺乏 K<sup>+</sup>导致 L-精氨酸产量明显降低(图 2)。

### 2.2 转录组数据分析

*C. crenatum* SYPA5-5 的 L-精氨酸发酵培养基优化实验发现存在钾盐对发酵非常重要。转录组研究发现, *C. crenatum* SYPA5-5 的大部分 Na<sup>+</sup>、

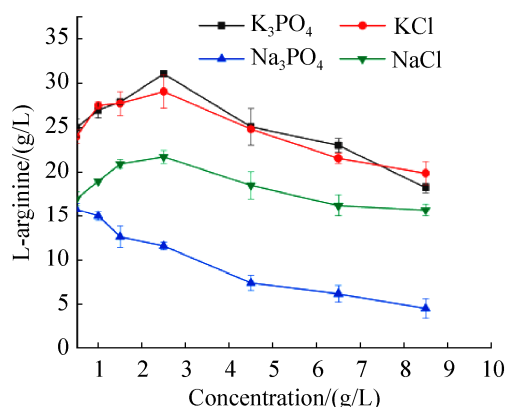


图 2. K<sup>+</sup>和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>对 L-精氨酸合成的影响

Figure 2. The effects of K<sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> on L-arginine synthesis. The data of L-arginine represents the mean values and standard deviations obtained from at least three independent experiments under different concentrations.

K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆转运蛋白和 K<sup>+</sup>转运 ATP 酶表达水平在外源添加 2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 时达到最高。用‘0.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>’表示 *C. crenatum* SYPA5-5 外源添加 0.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的摇瓶发酵, ‘2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>’表示 *C. crenatum* SYPA5-5 外源添加 2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的摇瓶发酵, 每个样品具有 2 个独立的生物学重复。

如图 3 所示, 在 0.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> vs. 2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 中, 逆转运蛋白 Mrp1 相关基因 *Cgl0264*–*Cgl0269* 均有所上调, 且 *Cgl0269* 相对显著。阳离子转运 ATP 酶相关基因 *Cgl0482*、*Cgl1176*、*Cgl0386* 和 *Cgl2962* 基因分别上调 28.8、8.4、4.7 和 6.0 倍。挑选相对显著上调基因 *Cgl0269* (*mrp1*)和 *Cgl0482* (*ctap1*)进行离子转运机制探究。

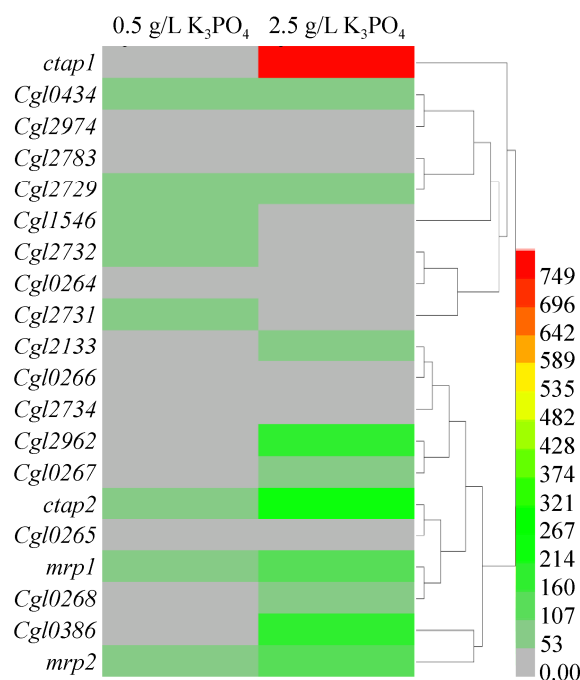


图 3. *C. crenatum* SYPA5-5 外源添加不同浓度 K<sup>+</sup>转录组数据分析

Figure 3. Transcriptome data analysis of *C. crenatum* SYPA5-5 on different concentrations of K<sup>+</sup> medium. Transcriptome of *C. crenatum* SYPA5-5 was analyzed under the concentrations of 0.5 g/L and 2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Each sample has two independent biological replicates.

### 2.3 重组菌株的构建

按照 1.4.1 和 1.4.3 所述方法构建敲除菌株 5-5 $\Delta$ *mrp1*, 基因大小为 2895 bp, 左右同源臂各 500 bp, 对所获得的转化子进行 PCR 验证, 结果如图 4-A 所示。泳道 1 阳性对照大小为 3895 bp, 泳道 2 为敲除整个基因后的大小为 1000 bp。敲除菌株 5-5 $\Delta$ *ctap1*, 基因大小为 1953 bp, 敲除中间 493 bp 后, 对所获得的转化子进行 PCR 验证, 结果如图 4-B 所示。按照 1.4.2 和 1.4.3 所述方法构建过表达菌株 5-5 (*mrp1*)、5-5 (*ctap1*)和 5-5 (*mrp1ctap1*), 对所获得的转化子进行 PCR 验证, 结果如图 4-C、D 和 E 所示。验证正确的提取质粒送天霖公司进行测序, 测序结果显示重组菌株构建成功。

### 2.4 Mrp1A 和 CTAP1 对胞内[Na<sup>+</sup>]和[K<sup>+</sup>]的影响

离子转运蛋白参与调节细胞的重要生理功能

如通过 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>转运维持胞内外的 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>梯度, 从而维持离子稳态。在碱性 pH 环境下, 离子转运还有助于防止细胞质碱化。为了研究钝齿棒杆菌离子转运蛋白的调节功能, 对 *C. crenatum* SYPA5-5 和突变株的 6 个不同时间点进行胞内阳离子浓度测定。如图 5 所示, 在 pH 7.0 时, 与 *C. crenatum* SYPA5-5 相比, 5-5 $\Delta$ *mrp1* 和 5-5 $\Delta$ *ctap1* 突变株的胞内 Na<sup>+</sup>浓度显著升高, 而 K<sup>+</sup>浓度降低。这是由于离子转运蛋白缺失使细胞内 Na<sup>+</sup>无法运出细胞, 胞内 Na<sup>+</sup>积累导致浓度显著增加, 细胞需要调节胞内离子强度, 导致胞内 K<sup>+</sup>浓度降低<sup>[12, 18-19]</sup>。如图 5-A 所示, 5-5 $\Delta$ *mrp1* 胞内[Na<sup>+</sup>]较 *C. crenatum* SYPA5-5、5-5 (*mrp1*)和 5-5 (*mrp1ctap1*)急速增加, 且随着发酵, 敲除菌株与过表达菌株胞内[Na<sup>+</sup>]差异性越显著。在发酵 96 h 时, 5-5 $\Delta$ *mrp1* 胞内[Na<sup>+</sup>]分别是 *C. crenatum* SYPA5-5、5-5 (*mrp1*)和 5-5

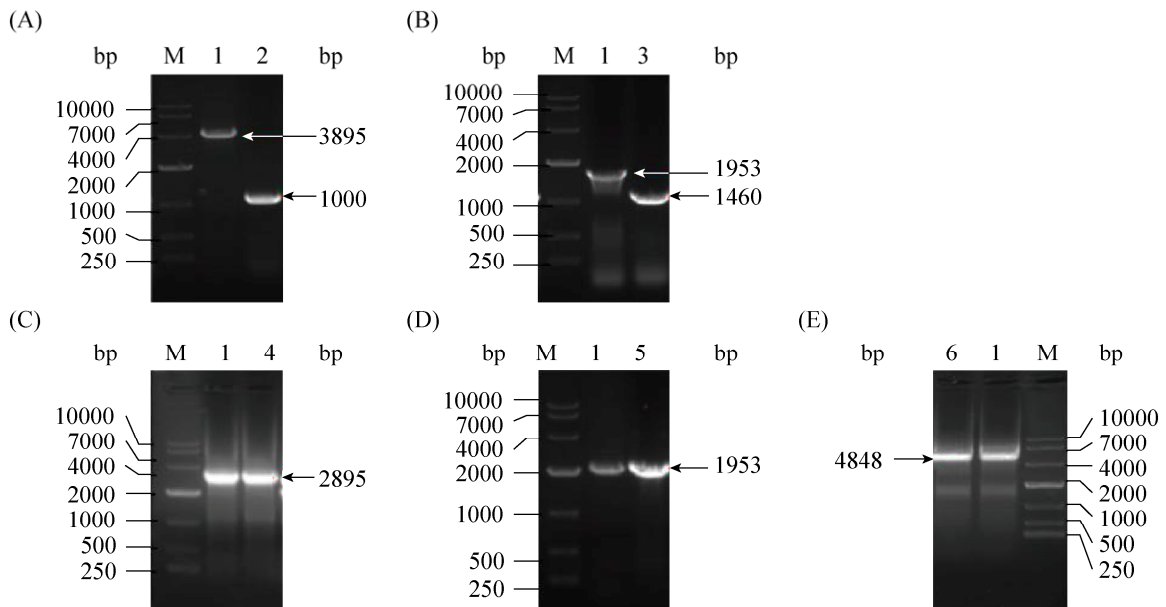


图 4. 重组菌株 PCR 验证

Figure 4. PCR verification of recombination strains. M: DL10000 marker; lane 1: PCR result of *C. crenatum* SYPA5-5; lane 2: PCR result of 5-5 $\Delta$ *mrp1*; lane 3: PCR result of 5-5 $\Delta$ *ctap1*; lane 4: PCR result of 5-5 (*mrp1*); lane 5: PCR result of 5-5(*ctap1*); lane 6: PCR result of 5-5 (*mrp1ctap1*).



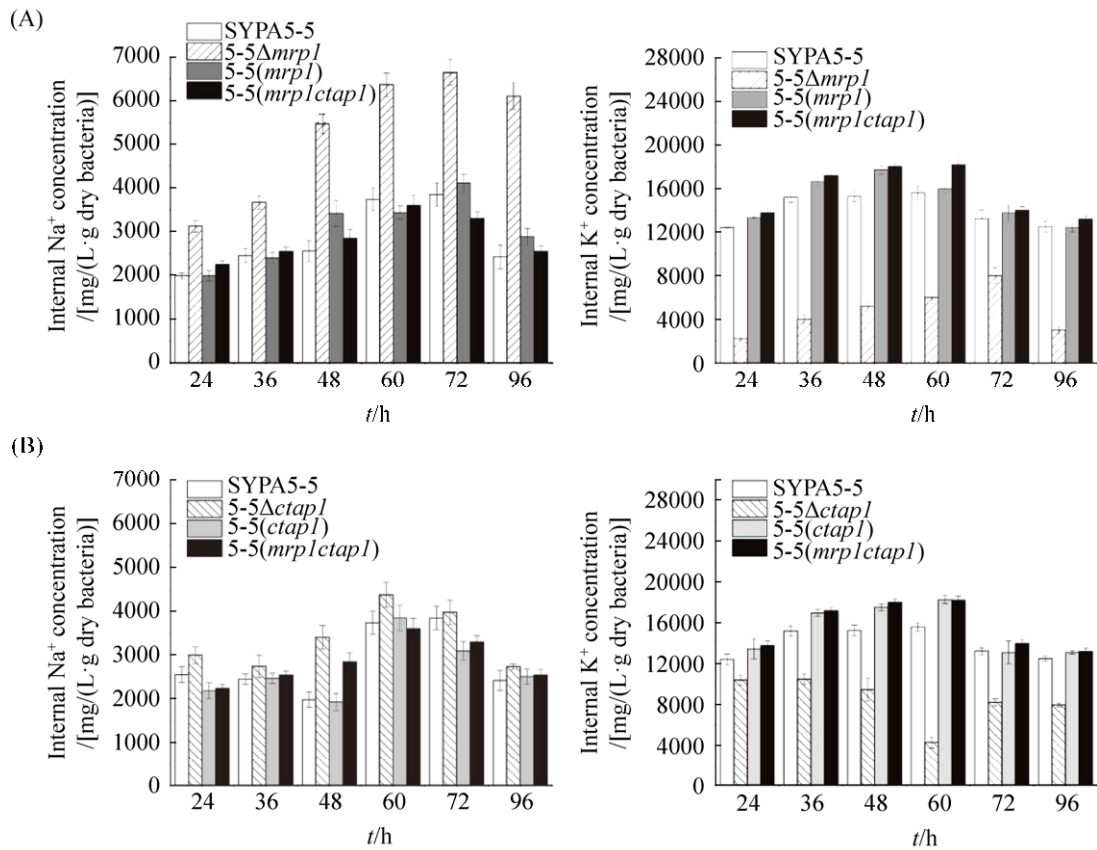


图 5. Mrp1A 和 CTAP1 对胞内[Na<sup>+</sup>]和[K<sup>+</sup>]的影响

Figure 5. The effects of Mrp1A and CTAP1 on intracellular [Na<sup>+</sup>] and [K<sup>+</sup>]. Intracellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> content was determined by ICP-MS analysis as described in Materials and Methods. A: Intracellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> concentrations of *C. crenatum* SYP A5-5, 5-5Δmrp1, 5-5(mrp1) and 5-5(mrp1ctap1). B: Intracellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> concentrations of *C. crenatum* SYP A5-5, 5-5Δctap1, 5-5(ctap1) and 5-5(mrp1ctap1). The results of intracellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> concentrations are shown as the mean of three biological replicates±standard.

(mrp1ctap1)的 2.48、2.09 和 2.35 倍, 而胞内[K<sup>+</sup>]随着[Na<sup>+</sup>]的升高而降低。如图 5-B 所示, 当离子转运蛋白 CTAP1 缺失时, 5-5Δctap1 胞内[K<sup>+</sup>]较 *C. crenatum* SYP A5-5、5-5(ctap1) 和 5-5(mrp1ctap1)明显下降, 而 5-5(ctap1) 和 5-5(mrp1ctap1)胞内[K<sup>+</sup>]含量较 *C. crenatum* SYP A5-5 丰富, 证明 CTAP1 是 K<sup>+</sup>偏好性转运蛋白。

CTAP1 可将培养基中的 K<sup>+</sup>运输至胞内, Mrp1A 逆转运蛋白将胞内 Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>运输至胞外, 胞外 H<sup>+</sup>运输至胞内, 从而维持胞内外的离子稳

态<sup>[18-19]</sup>, 同时 H<sup>+</sup>进入胞内还可调节胞内 pH。显然, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>转运蛋白参与了胞内离子稳态和 pH 调节, 为钝齿棒杆菌的生长和发酵提供了生理调节基础。

## 2.5 BCECF-AM 荧光探针检测胞内 pH

*C. crenatum* SYP A5-5 及重组菌株发酵合成 L-精氨酸阶段, 对胞内 pH 进行测定更有利于准确分析离子转运蛋白对于 L-精氨酸合成的影响机制。在外源添加 2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 的摇瓶发酵培养基中发酵 *C. crenatum* SYP A5-5 及突变株, 取稳定期

的发酵样品,利用 BCECF-AM 荧光探针检测法观察荧光亮度,碱性越强,荧光强度越高,根据不同 FIR(荧光强度比值)对应不同 pH 值,确定胞内酸碱状态。从图 6-B 可以看到,Mrp1A 逆转运蛋白失活时, $K^+/H^+$ 逆转运能力减弱,稳定期胞内合成 L-精氨酸,胞内 pH 8.5,呈碱性状态,荧光强度高。而图 6-E 过表达 Mrp1A 逆转运蛋白后, $H^+$ 运输到胞内,中和胞内碱性环境,胞内呈中性几乎不显荧光。敲除  $K^+$ 转运 ATP 酶 CTAP1 后,菌株 5-5 $\Delta$ ctap1 从培养基中转运  $K^+$ 进入胞内的能力减弱,导致没有充足的  $K^+$ 进行  $K^+/H^+$ 逆转运,导致胞内  $H^+$ 减少呈碱性状态,pH 8.2,荧光强度高(图 6-C)。反之过表达 CTAP1 后胞内呈中性,无荧光(图 6-F)。比较图 6-A 和 6-D,发现在稳定期,外源添加 0.5 g/L  $K_3PO_4$ 的 *C. crenatum* SYPA5-5 (pH 8.0)荧光亮度较 2.5 g/L  $K_3PO_4$  (pH 7.4)高。以上实验结果证明稳定期胞内合成 L-精氨酸呈碱性,只有培养基中含有充足的  $K^+$ 进行  $Na^+/K^+$ 、

$K^+/H^+$ 转运,才能中和胞内碱性环境。

## 2.6 探究 Mrp1A 和 CTAP1 对 L-精氨酸合成的影响

在含 30 mL 摇瓶发酵培养基的 250 mL 摇瓶中,对菌株进行发酵,5-5 (*mrp1ctap1*)菌体量明显提高,发酵前 50 h,5-5 (*ctap1*)菌体量增加较快,到 96 h,5-5 (*mrp1*)和 5-5 (*ctap1*)菌体量较 *C. crenatum* SYPA5-5 均有一定程度增加。同时 5-5 (*mrp1*)、5-5 (*ctap1*)和 5-5 (*mrp1ctap1*)的 L-精氨酸产量达 32.5、33.0、34.9 g/L,比 *C. crenatum* SYPA5-5 分别提高了 33.2%、35.8% 和 43.1%。5-5 (*ctap1*)和 5-5 (*mrp1ctap1*)耗糖速率明显提高,在发酵 85 h,将发酵液中的葡萄糖完全耗尽,产率为 0.307 g/g 和 0.316 g/g,较 *C. crenatum* SYPA5-5 提高了 35.8% 和 39.8%。5-5 (*mrp1*)在发酵结束时几乎耗尽发酵液中葡萄糖,L-精氨酸产率为 0.299 g/g,较 *C. crenatum* SYPA5-5 提高了 32.7%。

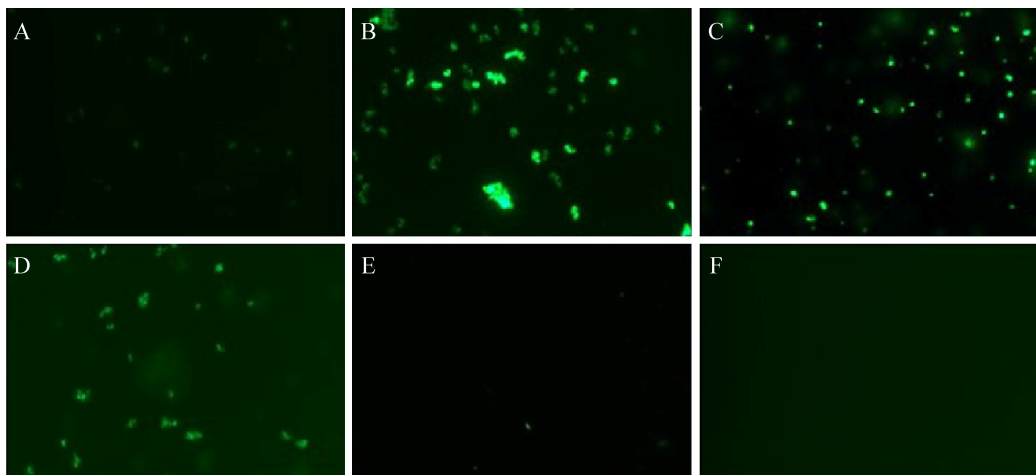


图 6. BCECF-AM 荧光探针检测 *C. crenatum* SYPA5-5 及突变株胞内 pH

Figure 6. Detect intracellular pH of *C. crenatum* SYPA5-5 and mutant strains by BCECF-AM. Intracellular pH levels were measured by using the pH-sensitive fluorescent probe BCECF as described in Materials and Methods. A: *C. crenatum* SYPA5-5 + 2.5 g/L  $K_3PO_4$ , FIR 16, pH 7.4; B: 5-5 $\Delta$ *mrp1* + 2.5 g/L  $K_3PO_4$ , FIR 20, pH 8.5; C: 5-5 $\Delta$ *ctap1* + 2.5 g/L  $K_3PO_4$ , FIR 19.5, pH 8.2; D: *C. crenatum* SYPA5-5 + 0.5 g/L  $K_3PO_4$ , FIR 18.5, pH 8.0; E: 5-5(*mrp1*) + 2.5 g/L  $K_3PO_4$ , FIR 12.5, pH 7.0; F: 5-5(*ctap1*) + 2.5 g/L  $K_3PO_4$ , FIR 12.5, pH 7.0.

在 5 L 发酵罐补料分批发酵 96 h, 发酵参数分析结果如图 7 所示。Mrp1A 和 CTAP1 过表达菌株耗糖速度明显提高。发酵前期, 5-5 (*mrp1ctap1*) 和 5-5 (*ctap1*) 菌体量增加较快, 明显高于原始菌株。三株过表达菌株与原始菌株相比, 对 L-精氨酸产量影响较大。5-5 (*mrp1*)、5-5 (*ctap1*) 和 5-5 (*mrp1ctap1*) 菌株 L-精氨酸产量分别达到 61.4、63.9 和 65.3 g/L。产率分别为 0.383、0.392、0.395 g/g, 比 *C. crenatum* SYPA5-5 分别提高了 34.9%、38.0%

和 39.1%。

在发酵过程中, 高浓度的底物和产物会导致渗透压和 pH 变化, 从而影响重要的生产参数<sup>[26]</sup>。在高渗透压和 pH 条件下, 生物量的形成速率降低, 产量和产率也受到影响<sup>[27]</sup>。此时离子转运蛋白 CTAP1 可从培养基中运输足够的  $K^+$  到胞内, 然后 Mrp1A 逆转运蛋白将  $K^+$  运输到胞外同时将胞外  $H^+$  运输至胞内<sup>[18-19]</sup>, 中和 L-精氨酸所导致的碱性环境, 起到维持胞内 pH 稳定的作用。同时  $K^+$

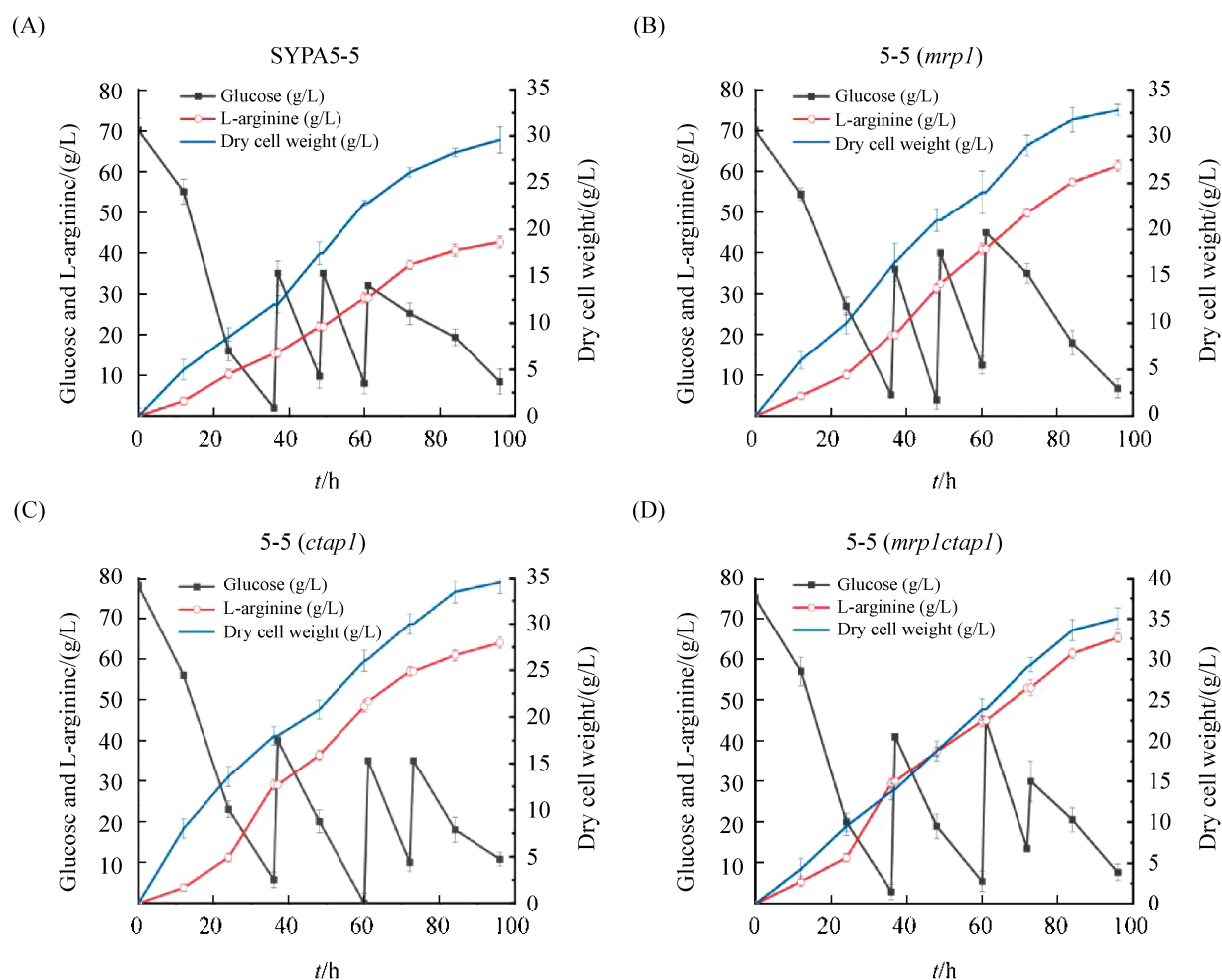


图 7. *C. crenatum* SYPA5-5 及突变株补料分批发酵

Figure 7. Fed-batch fermentation of *C. crenatum* SYPA5-5 and mutant strains. Comparison of cell dry weight, glucose concentration and L-arginine production in the *C. crenatum* SYPA5-5 (A), 5-5 (*mrp1*) (B), 5-5 (*ctap1*) (C) and 5-5 (*mrp1ctap1*) (D) strains under 5 L fermentation. The results of the fermentation are shown as the mean of three biological replicates  $\pm$  standard.

还可以作为一种渗透溶质且相对灵活，可以适应不同的离子通道孔<sup>[28]</sup>，在发酵时高浓度的底物和产物造成高渗透压胁迫，CTAP1 可迅速运输  $K^+$  至胞内以恢复其膨压<sup>[12,14]</sup>，因此  $K^+$  是维持 L-精氨酸高水平产量和产率的关键。

### 2.7 $K^+$ 对丙酮酸激酶活性及精氨酸的合成的影响

在发酵过程中，充足的能量供应也是保证 L-精氨酸高效合成关键因素之一，因此 ATP 在 L-精氨酸生物合成过程中扮演着重要角色。*C. crenatum* SYPA5-5 通过底物水平的磷酸化和氧化磷酸化获得 ATP<sup>[29]</sup>。底物水平磷酸化主要由糖酵解途径中的磷酸甘油酸激酶和丙酮酸激酶以及柠檬酸循环中的琥珀酰辅酶 A 合成酶催化含有高能键的化合物产生 ATP 等高能分子。

由表 3 可以看出，过表达 CTAP1 的菌株丙酮酸激酶活力较 *C. crenatum* SYPA5-5 有显著提高，而逆转运蛋白 Mrp1A 对丙酮酸激酶活力影响不大。CTAP1 可以将培养基中的  $K^+$  运输到胞内，而丙酮酸激酶催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸的反应中需要  $K^+$  的参与<sup>[30]</sup>。Agar 和 Bashan 等认为糖酵解中丙酮酸激酶的活性依赖于钾离子<sup>[30-32]</sup>。

表 3. 丙酮酸激酶活性( $n=3$ )

Table 3. The activity of PK ( $n=3$ )

Strains	PK/(U/mg protein)	
	0.5 g/L $K_3PO_4$	2.5 g/L $K_3PO_4$
<i>C. crenatum</i> SYPA5-5	0.48±0.031	0.71±0.026
5-5 $\Delta$ mrp1	0.39±0.017	0.67±0.024
5-5 $\Delta$ ctap1	0.21±0.040	0.40±0.019
5-5(mrp1)	0.50±0.013	0.73±0.030
5-5(ctap1)	0.63±0.022	0.83±0.015
5-5(mrp1ctap1)	0.66±0.041	0.85±0.021

参与精氨酸合成相关代谢途径糖酵解中丙酮酸激酶依赖  $K^+$  获得最佳活性<sup>[30-32]</sup>，催化含有高能键的化合物获得能量，从而为 *C. crenatum* SYPA5-5 生长提供能量。

## 3 讨论

当前，国内外规模化合成 L-精氨酸主要集中在对生产菌株代谢工程改造如 L-精氨酸合成途径的优化、辅因子 NADPH 优化、直接前体以及辅前体的供应等<sup>[1]</sup>。极少有涉及离子转运蛋白对 L-精氨酸生产菌株生长和发酵过程中离子浓度、pH 稳态和渗透压调节方面的研究。

在发酵过程中，*C. crenatum* SYPA5-5 细胞受到各种应激因素的影响，胞内外的渗透压和 pH 发生改变，从而导致产量和产率也受到影响<sup>[27]</sup>。本研究旨在探究 *C. crenatum* SYPA5-5 单价阳离子/ $H^+$  逆转运蛋白 Mrp1A 和阳离子转运 ATP 酶 CTAP1 在发酵过程中如何调节胞内离子浓度、pH 和渗透压。通过过表达 Mrp1A 和 CTAP1，L-精氨酸生成率明显提高，发酵 96 h 后，5-5 (mrp1ctap1) 菌株 L-精氨酸产量达 65.3 g/L，产率为 0.395 g/g，产率比 *C. crenatum* SYPA5-5 提高了 39.1%。

对发酵不同时间段的胞内  $[Na^+]$  和  $[K^+]$  进行测定，分析发现  $Na^+/K^+$  和  $K^+/H^+$  转运蛋白参与了 pH 的调节和胞内阳离子的动态平衡。转运蛋白 CTAP1 是  $K^+$  偏好性转运蛋白，其可从培养基中运输足够的  $K^+$  到胞内。 $K^+$  相对灵活，相比  $Na^+$  可以适应不同的离子通道孔，众多单价阳离子/ $H^+$  逆转运蛋白中  $K^+$  特异性的  $K^+/H^+$  逆转运蛋白占绝大多数<sup>[28]</sup>，这些  $K^+/H^+$  逆转运蛋白将胞内  $K^+$  运输到胞外同时将胞外  $H^+$  运输至胞内，中和 L-精氨酸所导

致的碱性环境,起到维持胞内 pH 稳定和离子稳态的作用。不同逆转运蛋白在碱性的胞内环境下活性并不相同,逆转运蛋白 Mrp1 在碱性条件下具有相对较高的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+/\text{H}^+$  转运活力<sup>[18]</sup>。在发酵过程中,适量的  $\text{PO}_4^{3-}$  有利于菌株的生长。磷是某些蛋白质和核酸的组成成分,ATP 和 ADP 是重要的能量传递者,参与一系列的代谢反应,同时磷酸盐在培养基中还具有缓冲作用<sup>[30]</sup>。

通过对钝齿棒杆菌逆转运蛋白 Mrp1A 和阳离子转运 ATP 酶 CTAP1 的研究,证实其具有调节离子浓度、pH 和渗透压稳态等重要生理功能,有利于提高 *C. crenatum* SYP5-5 生产菌株的性能。本研究的离子转运蛋白为解析离子转运机制和 L-精氨酸合成关系奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Shin JH, Lee SY. Metabolic engineering of microorganisms for the production of L-arginine and its derivatives. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 166.
- [2] Man ZW, Xu MJ, Rao ZM, Guo J, Yang TW, Zhang X, Xu ZH. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 28629.
- [3] Zhan ML, Kan BJ, Dong JJ, Xu GC, Han RZ, Ni Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved L-arginine synthesis by enhancing NADPH supply. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46: 45–54.
- [4] Wenda S, Illner S, Mell A, Kragl U. Industrial biotechnology-the future of green chemistry? *Green Chemistry*, 2011, 13(11): 3007–3047.
- [5] Becker J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(5): 718–726.
- [6] 陶文沂, 许正宏, 熊筱晶, 窦文芳, 史劲松. 一种生产 L-精氨酸的菌株及其诱变方法与利用该菌株生产 L-精氨酸的方法. 中国: CN03112896.3. 2003-02-25.
- [7] 徐美娟. 钝齿棒杆菌 SYP5-5 发酵产 L-精氨酸的代谢工程改造. 江南大学博士学位论文, 2012.
- [8] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, Xu ZH. The role of ARG R repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 170(3): 587–597.
- [9] Xu MJ, Rao ZM, Yang J, Xia HF, Dou WF, Jin J, Xu ZH. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic argC-H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of L-arginine production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(3): 495–502.
- [10] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, Yang J, Jin J, Xu ZH. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 255–266.
- [11] Corratgé-Faillie C, Jabnoute M, Zimmermann S, Véry AA, Fizames C, Sentenac H. Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(15): 2511–2532.
- [12] Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2003, 75: 293–320.
- [13] Follmann M, Becker M, Ochrombel I, Ott V, Krämer R, Marin K. Potassium transport in *Corynebacterium glutamicum* is facilitated by the putative channel protein CglK, which is essential for pH homeostasis and growth at acidic pH. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(9): 2944–2952.
- [14] Record MT Jr, Courtenay ES, Cayley DS, Guttman HJ. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, 23(4): 143–148.
- [15] Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Advances in Microbial Physiology*, 2009, 55: 1–79.
- [16] Wilson TH, Ding PZ. Sodium-substrate cotransport in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2001, 1505(1): 121–130.
- [17] 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.
- [18] Bartsch AM. Identification and functional characterization of cation/proton antiport systems in *Corynebacterium glutamicum*. Doctor Dissertation of der Universität zu Köln, 2015.
- [19] Xu N, Zheng YY, Wang XC, Krulwich TA, Ma YH, Liu J. The Lysine 299 residue endows the multisubunit Mrp1 antiporter with dominant roles in Na<sup>+</sup> resistance and pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(10): e00110–18.
- [20] Fujisawa M, Kusumoto A, Wada Y, Tsuchiya T, Ito M, Naha K, a novel monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter of *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 2005, 183(6): 411–420.
- [21] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1): 69–73.
- [22] Xu DQ, Tan YZ, Shi F, Wang XY. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2010, 64(2): 85–91.
- [23] Corvini PFX, Gautier H, Rondags E, Vivier H, Goergen JL, Germain P. Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis* by image analysis. *Microbiology*, 2000, 146(10): 2671–2678.
- [24] Reddy GK, Wendisch VF. Characterization of 3-phosphoglycerate kinase from *Corynebacterium glutamicum* and its impact on amino acid production. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 54.
- [25] Xu H, Dou WF, Xu HY, Zhang XM, Rao ZM, Shi ZP, Xu ZH. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced L-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43(1): 41–51.
- [26] Gong JH, Ding JY, Chen Q, Zheng CF, Liu ZQ. Studies on the scaling-up of the L-arginine fermentation process. *Acta Microbiologica Sinica*, 1991, 31(6): 460–465. (in Chinese) 龚建华, 丁久元, 陈琦, 郑翠凤, 刘增强. 发酵法生产 L-精氨酸放大过程的工艺研究. *微生物学报*, 1991, 31(6): 460–465.
- [27] Rönsh H, Krämer R, Morbach S. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104(1/3): 87–97.
- [28] Carrillo-Tripp M, Saint-Martin H, Ortega-Blake I. A comparative study of the hydration of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> with refined polarizable model potentials. *The Journal of Chemical Physics*, 2003, 118(15): 7062–7073.
- [29] Koch-Koerfges A, Kabus A, Ochrombel I, Marin K, Bott M. Physiology and global gene expression of a *Corynebacterium glutamicum* ΔF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2012, 1817(2): 370–380.
- [30] Sadowska-Bartosz I, Stefaniuk I, Cieniek B, Bartosz G. Tempo-phosphate as an ESR tool to study phosphate transport. *Free Radical Research*, 2018, 52(3): 335–338.
- [31] Agar NS, Gruca MA, Hellquist LNB, Harley JD, Roberts J. Red blood cell glycolysis and potassium type in sheep. *Experientia*, 1977, 33(5): 670–671.
- [32] Bashan N, Moses S, Gross Y, Livine A. The effect of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on glycolytic enzymes: differential response of pyruvate kinase from dog and human erythrocytes. *FEBS Letters*, 1975, 54(3): 323–326.

# The ion transporter endows ion- and pH-homeostasis enhancing L-arginine synthesis in *Corynebacterium crenatum*

Jing Liu<sup>1</sup>, Meijuan Xu<sup>1\*</sup>, Zaiwei Man<sup>2</sup>, Huifang Gao<sup>1</sup>, Xian Zhang<sup>1</sup>, Taowei Yang<sup>1</sup>, Zhenghong Xu<sup>1</sup>, Zhiming Rao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214000, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu Province, China

**Abstract:** L-arginine is a semi-essential amino acid that is widely used in food, pharmacy and feed industries. In recent years, the metabolic engineering of L-arginine producing strains is rarely involved in the field of ion transport. **[Objective]** In this study, we found that adding appropriate K<sup>+</sup> in the medium was beneficial to *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5 to increase L-arginine production. **[Methods]** Transcriptome of *C. crenatum* SYPA5-5 was analyzed under the concentrations of 0.5 g/L and 2.5 g/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. We selected significant monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter Mrp1A and cation transport ATPase CTAP1 to investigate the relation among K<sup>+</sup> transport, growth and L-arginine synthesis in *C. crenatum* SYPA5-5. **[Results]** The genes *mrp1* and *ctap1* were deleted and overexpressed to analyze their effects on the production of L-arginine in *C. crenatum* SYPA5-5. The overexpression of Mrp1A and CTAP1 was beneficial to ion homeostasis, pH tolerance and osmoregulation, ultimately increasing L-arginine production. In fed-batch fermentation, L-arginine production of 5-5(*mrp1*), 5-5(*ctap1*) and 5-5(*mrp1ctap1*) strains reached 61.4 g/L, 63.9 g/L and 65.3 g/L. The yield reached 0.383, 0.392 and 0.395 g/g, which were 34.9%, 38.0% and 39.1% increase compared with *C. crenatum* SYPA5-5, respectively. **[Conclusions]** The CTAP1 is K<sup>+</sup> transporter that can transport K<sup>+</sup> from extracellular to intracellular. Meanwhile, the Mrp1A can transport K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> to the extracellular, and the extracellular H<sup>+</sup> was transported into the cell, thus maintaining the intracellular pH stability. The study of Mrp1A and CTAP1 provide a foundation for understanding the relationship between ion transport mechanisms and L-arginine synthesis.

**Keywords:** *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5, cation transport ATPase CTAP1, monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporter Mrp1A, K<sup>+</sup>

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program (2018YFA0900300), by the National Natural Science Foundation of China (31770058), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20181205), by the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2019BCH01002), and by the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-06)

\*Corresponding authors. Meijuan Xu, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; Zhiming Rao, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 7 December 2019; Revised: 9 February 2020; Published online: 8 May 2020