调整葡萄糖转运系统提高大肠杆菌 L-苏氨酸产量

朱丽飞[1,3]，　王小元[*1,2,3]

（1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品安全国际联合实验室，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：葡萄糖的有效利用是提高大肠杆菌合成 L-苏氨酸能力的关键，作者通过优化葡萄糖转运来提高大肠杆菌 L-苏氨酸合成能力。利用 CRISPR 基因编辑技术在大肠杆菌 TWF001 中分别敲除了 PTS 系统关键基因 *pts*H 和 *pts*G，并在 30 g/L 葡萄糖质量浓度下进行了摇瓶发酵。与对照菌株 TWF001 相比，TWF001Δ*pts*H 和 TWF001Δ*pts*G 合成 L-苏氨酸能力均有明显改善；TWF001Δ*pts*H L-苏氨酸产量提升 38.02%。在 TWF001Δ*pts*H 基因组上用 trc 启动子过表达 *gal*P 基因，构建了 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P。对 3 株突变菌在 40、50、60 g/L 葡萄糖质量浓度下进行了摇瓶发酵；36 h 后 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在 40 g/L 葡萄糖质量浓度时，L-苏氨酸产量达到 26.16 g/L，糖酸转化率为 0.65 g/g，L-苏氨酸产量提升幅度达 42.12%。研究结果说明优化葡萄糖转运可以有效提高大肠杆菌 L-苏氨酸合成能力。

关键字：大肠杆菌；L-苏氨酸；PTS 系统；*gal*P；*pts*H；*pts*G

中图分类号：Q 933　　**文章编号：**1673-1689(2020)08-0070-11　　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.009

Adjusting the Glucose Transport System to Increase L-Threonine Production in *Escherichia coli*

ZHU Lifei[1,3]，　*WANG Xiaoyuan*[*1,2,3]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, the improvement of L-threonine synthesis in *E. coli* was achieved by optimizing transport of glucose. The CRISPR gene-editing method was used to delete the key genes *ptsH* and *ptsG* in the PTS system. The flask fermentation was carried out under 30 g/L glucose. Compared with the control strain TWF001, the productivity of L-threonine synthesis was significantly improved in either TWF001Δ*pts*H or TWF001Δ*pts*G, and the L-threonine yield of TWF001Δ*pts*H increased 38.02% . The strains TWF001Δ*pts*H, *Ptrc::Pgal*P were successfully constructed via the enhancement of *gal*P expression though adding the trc promoter in TWF001Δ*pts*H genome.Three mutant strains were grown by flask fermentation under 40, 50 or 60 g/L glucose, respectively. The fermentation yield of L-threonine in TWF001Δ*pts*H, *Ptrc::Pgal*P after

收稿日期：2019-03-01

基金项目：国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-10)。

*** 通信作者：**王小元(1965—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物代谢工程方面的研究。E-mail：xwang@jiangnan.edu.cn

36 h increased by 42.12%, which was 26.16 g/L with a sugar acid conversion rate of 0.65 g/g. The modification of glucose transport was confirmed to effectively improve L-threonine synthesis in *E. coli*.

Keyword: *Escherichia coli*, L-threonine, PTS, *galP*, *ptsH*, *ptsG*

L–苏氨酸是人体必需 8 种氨基酸之一，广泛应用于食品添加剂、饲料添加剂、化妆品、医药、水产养殖和保健品等多个领域，是一种非常重要的发酵工业产品[1–3]。大肠杆菌（*Escherichia coli*）作为一种模式微生物，具有遗传背景清晰、易改造、生长迅速、对发酵条件要求低等优点，最常用的是 L–苏氨酸生产菌株[4–7]。

磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）依赖的磷酸酶转移系统（PTS）是大肠杆菌中转运葡萄糖的最主要方式，通过 PEP 提供磷酸，把葡萄糖转运到胞内的同时使其磷酸化成葡萄糖–6–磷酸（G–6–P）[8–9]，*ptsH* 基因编码 PTS 系统中磷酸组氨酸搬运蛋白 HPr，*ptsG* 基因编码膜透性酶 $EIICB^{Glc}$。葡萄糖还可以通过 *galP* 基因编码的半乳糖转运蛋白 GalP 进入胞内[10]。G–6–P 由己糖磷酸异构酶 PgI（*pgi* 基因编码）催化生成 6–磷酸果糖（F–6–P），再由磷酸果糖激酶 PfkA（pfkA 基因编码）催化生成 1,6–二磷酸果糖；由于这一步是糖酵解的关键限速步骤，*pfkA* 基因的表达水平一定程度上可以反映出糖酵解的强弱以及糖酵解中碳流到磷酸烯醇式丙酮酸的强弱[11–13]。PEP 作为糖酵解的产物，由 *eno* 基因编码的烯醇化酶催化合成，PEP 可被 *pykA* 基因编码的丙酮酸激酶催化生成丙酮酸，丙酮酸脱氢生成乙酰辅酶 A，再经 *gltA* 基因编码的柠檬酸合酶催化生成柠檬酸，进入柠檬酸循环生成草酰乙酸。草酰乙酸经 *aspC* 基因编码的天冬氨酸转氨酶 AspC 催化生成天冬氨酸[14]，再经 *thrA* 基因编码的天冬氨酸激酶、*thrB* 基因编码的高丝氨酸激酶、*thrC* 基因编码的苏氨酸合成酶等关键酶催化生成 L–苏氨酸，见图 1。

作为 PTS 系统的关键基因，*ptsH* 和 *ptsG* 的缺失或者突变会使 PTS 系统不能正常转运葡萄糖，而只能利用 GalP 系统等其他不消耗 PEP 的方式转运葡萄糖[8,15]。作者在一株大肠杆菌 L–苏氨酸高产菌 TWF001 中敲除了 *ptsH* 和 *ptsG* 基因，并且在 *ptsH* 的敲除菌基因组上过表达 *galP* 基因，发现改善葡萄糖转运系统有利于大肠杆菌 L–苏氨酸的合成。

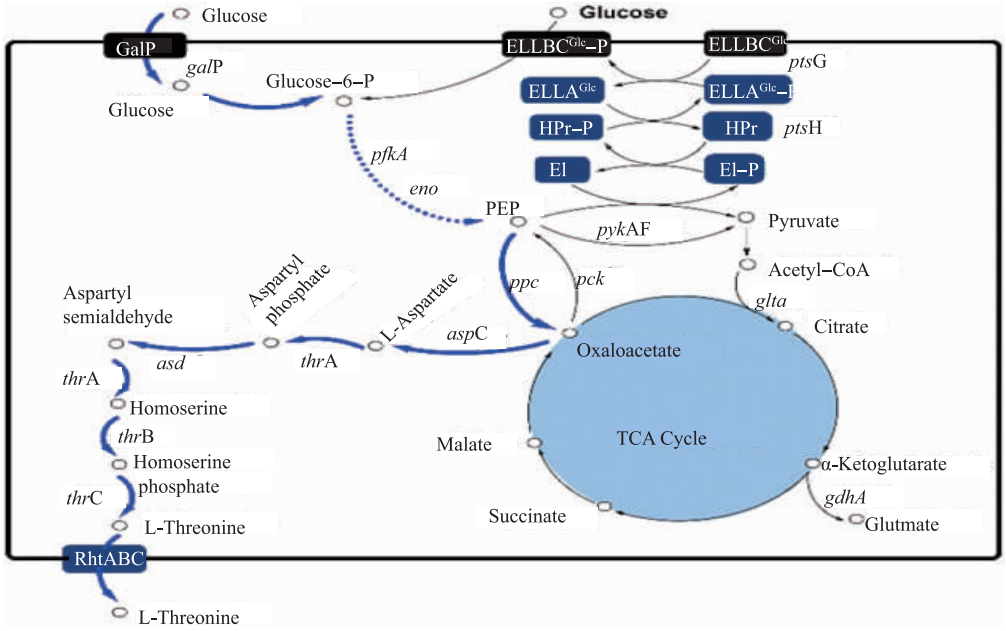


图 1　大肠杆菌中 L–苏氨酸合成代谢路程

Fig. 1　Biosynthesis pathway of L–threonine in *E. coli*

1 材料与方法

1.1 材料与设备

本研究所有的菌株和质粒见表 1，所有的菌株都为大肠杆菌。JM109 是用来构建质粒制作感受态用，发酵菌株 TWF001 是作者所在实验室筛到的一株 L-苏氨酸高产菌，保藏编号为 CCTCC no. M2017730[17]。LB 培养基(g/L)：蛋白胨 10，NaCl 10，酵母粉 5，固体需要添加质量分数为 1.5%的琼脂。发酵种子培养基(g/L)：蛋白胨 10，NaCl 10，酵母粉 5，蔗糖 10，121 ℃灭菌 20 min。摇瓶发酵培养基(g/L)：葡萄糖(30、40、50、60，根据需要添加)，$(NH_4)_2SO_4$ 25，酵母粉 2，柠檬酸 2，KH_2PO_4 7.46，$MgSO_4·7H_2O_2$，$FeSO_4·7H_2O_5$，$MnSO_4·4H_2O_5$，$CaCO_3$ 20；pH 6.8 (NaOH 调 pH)，115 ℃灭菌 15 min。酵母粉和蛋白胨：购自 OXIOD 公司；氨基酸标准品：购自 Sigma 公司；其他化学试剂：均购自国药集团化学试剂有限公司；HPLC 级甲醇和乙腈：购自苏州科盛公司；2×Taq PCR MasterMix：购自南京博尔迪生物科技有限公司；QuickCut DpnI 酶、PrimerStar DNA 聚合酶：购自 TaKaRa 公司；T4 DNA 连接酶、反转录 cDNA 试剂盒：购自 Fermentas 公司；T4 多聚核苷酸激酶：购自纽英伦生物技术（北京）有限公司；ChamQ™ Universal SYBR qPCR Master Mix：购自诺唯赞生物；Simply P 总 RNA 提取试剂盒：购自 Bioflux 公司；质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒：购自天根生物科技有限公司；SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒：均购自生工生物工程股份有限公司。

1.2 实验方法

本研究所有用来构建质粒和突变菌的引物信息见表 1，敲除突变菌株所用引物设计参照 MG1655 基因组。基因组和质粒的提取根据基因组和质粒提取试剂盒的说明书进行；基因组片段用 PrimerStar DNA 聚合酶 PCR 获得，片段回收用 SanPrep 柱式DNA 胶回收试剂盒，操作见说明书；菌落验证用 2×Taq PCR MasterMix 进行 PCR 验证。

以 MG1655 基因组为模板，以引物 *pts*Hf1/*pts*Hr1 扩增出 *pts*H 基因上游片段 *pts*H-U，以引物 *pts*Hf2/ *pts*Hr2 扩增出 *pts*H 基因上游片段 *pts*H-D，再通过重叠 PCR 把上下游片段重叠到一起得到 *pts*H 的敲除片段 *pts*H-UD。以 pTargetF 为模板，以

表 1 本研究中所用到菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the study

菌株和质粒	描述	来源
菌株 JM109	Wild-type *E.coli*	NEB
菌株 TWF001	L-threonine-producing *E.coli* strain	CCTCC no. M2017730
菌株 TWF001Δ*pts*H	TWF001 敲除 *pts*H 基因	本研究构建
菌株 TWF001Δ*pts*G	TWF001 敲除 *pts*G 基因	本研究构建
菌株 TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P	TWF001 敲除 *pts*H 基因，并用 *trc* 启动子替换 *gal*P 的启动子	本研究构建
质粒 pTargetF	pMB1 aadA sgRNA	[16]
质粒 pCas	repA101 (Ts) kan Pcas-cas9 ParaB -Red lacIq Ptrc -sgRNA-pMB1	[16]
质粒 pTargetF-*pts*H	pMB1 aadA sgRNA-*pts*H	本研究构建
质粒 pTargetF-*pts*G	pMB1 aadA sgRNA-*pts*G	本研究构建
质粒 pTargetF-*gal*P	pMB1 aadA sgRNA-*gal*P	本研究构建

引物 sgRNA-*pts*H-F/T-sgRNA-R 扩增出构建 pTargetF-*pts*H 的片段，片段经过 DpnI 酶消化，T4 Pnk 激酶磷酸化，T4 DNA 连接酶连接后化转到 JM109 感受态中，构建和扩增质粒，在含 50 mg/L 壮观霉素的 LB 平板上生长 10 h 后，用引物 Y-*pts*H-F/T-sgRNA-R 筛选正确的转化子，得到敲除质粒 pTargetF-*pts*H。100 ng 敲除质粒 pTargetF-*pts*H 和 500 ng 敲除片段 *pts*H-UD 同时电转入 80 uL 的 TWF001/pCas 电转感受态中，在 30 ℃、100 r/min 慢摇复苏 2 h，涂在含 50 mg/L 壮观霉素和卡那霉素的 LB 平板，30 ℃培养 48 h 后用引物 *pts*Hf1/ *pts*Hr2 验证，得到正确敲除的转化子，正确的转化子转接含 50 mg/L 卡那霉素和 0.5 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)的 LB 试管诱导培养去除 pTargetF-*pts*H 质粒，42 ℃过夜培养去除 pCas 质粒，去除 pTargetF-*pts*H 和 pCas 质粒后分别在含壮观霉素和卡那霉素的 LB 平板上进行反筛，确定是否去除质粒成功，最后得到不含质粒的正确敲除 *pts*H 基因的突变菌 TWF001Δ*pts*H。

TWF001Δ*pts*G 的构建过程同上述 TWF001Δ*pts*H 的构建，所用引物参照表 2 中的 ptsGf1/*pts*Gr1、ptsGf1/*pts*Gr1、sgRNA-*pts*G-F/T-sgRNA-R、Y-*pts*G-F/T-sgRNA-R。

TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P 的构建是以 MG1655 基因组为模板，以引物 *gal*Pf1/*gal*Pr1 扩增出 *gal*P 基因上游片段 *gal*P-U，以引物 *gal*Pf2/*gal*Pr2

表 2　本研究构建质粒和菌株所用引物

Table 2　Primers usedused to construct plasmids andstrains in this study

引物	序列 (5′-3′)
T-sgRNA-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
sgRNA-*pts*H-F	AGGCGAAGACGAGCAGAAAGGTTTTAGAGC TAGAAATAGC
Y-*pts*H-F	AGGCGAAGACGAGCAGAAAG
*pts*Hf1	CATCATCGGGTGAGCGTTAT
*pts*Hr1	CGAGTTCCGCCATCAGTTTCGTTCGGAGCGG TAATGGT
*pts*Hf2	ACCATTACCGCTCCGAACGAAACTGATGGCG GAACTCG
*pts*Hr2	TACGGCATCCAGAATCAGATAGTC
sgRNA-*pts*G-F	CATAACATGCGATACAACGGGTTTTAGAGCT AGAAATAGC
Y-*pts*G-*F*	CATAACATGCGATACAACGG
*pts*Gf1	GCAGAAGAGGGTGTTGTAGC
*pts*Gr1	AACCACTACGCCCGCTCATCAGCGATTTACC GACC
*pts*Gf2	GGTCGGTAAATCGCTGATGAGCGGGCGTAGT GGTT
*pts*Gr2	TAAAGCGGTGGATGGGAC
sgRNA-*gal*P-F	TTACAAATCTTTGTCTGTTGGTTTTAGAGCTA GAAATAGC
Y-*gal*P-F	TTACAAATCTTTGTCTGTTG
*gal*Pf1	CTACGCAGCACGTTATGTC
*gal*Pr1	GCCGGATGATTAATTGTCAATGGTGTAATCG GTTTCAGT
*gal*Pf2	TTTCACACAGGAAACAGACCATAACCATATT GGAGGGCAT
*gal*Pr2	GAGGATAGAGCGAAGAAAAG
Trc-F	TTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTG TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACA GGAAACAGACC
Trc-R	GGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT CACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGA TTAATTGTCAA

扩增出 *gal*P 基因上游片段 *gal*P-D，引物 Trc-F/Trc-R 95 ℃变性、4 ℃退火形成 *trc* 启动子片段，再通过重叠 PCR 把上游、*trc* 启动子和下游片段重叠到一起得到 *gal*P 的敲入片段 *trc*-*gal*P。以 pTargetF 为模板，以引物 sgRNA-*gal*P-F/T-sgRNA-R 扩增出构建 pTargetF-*gal*P 的片段，片段经过 DpnI 酶消化，T4 Pnk 激酶磷酸化，T4 DNA 连接酶连接后化转到 JM109 感受态中，构建和扩增质粒，在含 50 mg/L 壮观霉素的 LB 平板上生长 10 h 后，用引物 Y-*gal*P-F/T-sgRNA-R 筛选正确的转化子，得到敲除质粒 pTargetF-*gal*P。100 ng 敲除质粒 pTargetF-*gal*P 和 500 ng 敲除片段 *trc*-*gal*P 同时电转入 80 uL 的 TWF001Δ*pts*H/pCas 电转感受态中，在 30 ℃、100 r/min 慢摇复苏 2 h，涂在含 50 mg/L 壮观霉素和卡那霉素的 LB 平板，30 ℃培养 48 h 后用引物 Trc-F/*gal*Pr2 验证，得到正确敲入的转化子，正确的转化子转接含 50 mg/L 卡那霉素和 0.5 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)的 LB 试管诱导培养去除 pTargetF-*gal*P 质粒，42 ℃过夜培养去除 pCas 质粒，去除 pTargetF-*gal*P 和 pCas 质粒后分别在含壮观霉素和卡那霉素的 LB 平板上进行反筛，确定是否去除质粒成功，最后得到不含质粒的正确敲入 *trc*-*gal*P 基因的突变菌 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P。

表 3　本研究 RT-PCR 所用引物

Table 3　Primers used for RT-PCR in this study

引物	序列 (5′-3′)
RT-16sRNA-F	TCGGGAACCGTGAGACAGG
RT-16sRNA-R	CCGCTGGCAACAAAGGATAAG
RT-*thr*A-F	TTCCTACTTCGGCGCTAAAG
RT-*thr*A-R	TTGCCATGTTATTCAGATTG
RT-*thr*B-F	GCTGAACCCTACCGTGAACG
RT-*thr*B-R	ATATGAACAAAACCTTCCTG
RT-*thr*C-F	CGCTGGCATTTAAAGATTTC
RT-*thr*C-R	TTGCCGCCCAATGTACAGAAC
RT-*pfk*A-F	GTTCTGGGACTGGGTTGGCG
RT-*pfk*A-R	GCGTGGTGGAGAAATGCTTG
RT-*eno*-F	GCTCCGTCAGGTGCTTCTA
RT-*eno*-R	TCTTGTCAATGCCAGCCT
RT-*pyk*A-F	CGACAATGTGGAAGAAGC
RT-*pyk*A-R	TGGTGATGATCGCCGTAA
RT-*glt*A-F	GCGACCGATTCTAACTACC
RT-*glt*A-R	CCACACATGACTGCCATTG
RT-*asp*C-F	ACCGCATATACGCCAAACTC
RT-*asp*C-R	GTTGCCACCATCCTGAGC
RT-*gdh*A-F	GGTAGACTCGGCTCAGGAT
RT-*gdh*A-R	TGGTATTGAAGCGGGTAG

1.3　发酵过程参数测定

1.3.1　生物量的测定　生长在 LB 培养基中的种子液的 OD_{600} 的测定：取 1 mL 菌液，再用去离子水稀释相应的倍数充分混匀，用紫外分光光度计测定 600 nm 下的吸光度，再乘以相应倍数得到最后值。

生长在发酵培养基中的菌液的 OD_{600} 的测定：

取 1 mL 菌液充分混匀,再用去 1 mol/L 的稀盐酸稀释相应的倍数，用紫外分光光度计测定在波长为 600 nm 下的吸光度,再乘以相应倍数得到最后值。

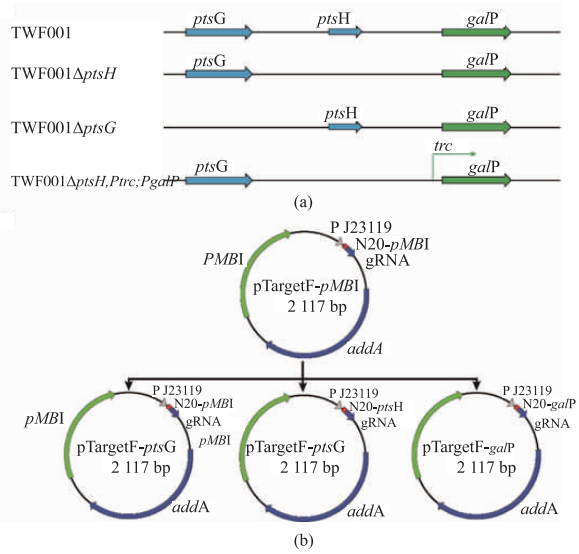


图 2　菌株构建流程和质粒图

Fig. 2　Construction process of mutant strains and the map of plasmids

1.3.2　葡萄糖质量浓度的测定　发酵液取样,发酵液样品 12 000 r/min 离心，取上清液 10 μL 用去离子稀释 100 倍,用 SBA40 还原糖测定仪测定葡萄糖的质量浓度。

1.3.3　氨基酸含量的测定

1）样品预处理　发酵液 12 000 r/min 离心,取 500 μL 上清液加入到 500 μL 的 10%的三氯乙酸溶液中,充分混匀,4 ℃静置 4 h 以上。12 000 r/min 离心 15 min,用0.22 μm 的水相针式滤膜过滤上清液,上清液稀释合适的倍数后用 HPLC 测定氨基酸含量。

2）高效液相色谱　采用邻苯二甲醛柱前衍生法[18]。仪器采用 Agilent 1200 超高效液相色谱仪,色谱柱为 Thermo ODS-2HYPERSIL C18 column (250 mm×4.0 mm,USA)。流动相(水相):3.01 g 无水乙酸钠溶解于超纯水中,200 μL 三乙胺,5 mL 四氢呋喃,超纯水定容到 1 L,乙酸调至 pH 7.2。洗脱相(有机相):3.01 g 无水乙酸钠溶解于 200 mL 超纯水中,用 5%醋酸调至 pH 7.2,再加 400 mL 的 HPLC 级甲醇和 400 mL 的 HPLC 级乙腈。

1.4　实时荧光定量 PCR 分析

相关基因转录水平通过 StepOnePlus 实时荧光定量仪(美国 Applied Biosystems 公司)检测,所用引物见表 2。发酵对数中期的发酵液,低速短暂离心取上清液去除发酵液中的 $CaCO_3$,12 000 r/min 离心收集菌体,RNA 的提取步骤、cDNA 的反转录合成以及RT-qPCR 的详细步骤及参数分别按照 Bioflux RNA 提取试剂盒说明书、Fermentas 公司反转录 cDNA 试剂盒和诺唯赞生物 ChamQTM Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书,数据的分析参照文献[19]。

2　结果与分析

2.1　突变菌 TWF001Δ*pts*H、TWF001Δ*pts*G 和 TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P 的构建验证

3 株突变菌构建的电泳验证结果见图 3。对照菌 TWF001 用引物 *pts*Hf1/*pts*Hr2 进行 PCR 验证,扩增出 1 500 bp 左右大小的条带，如 1 泳道所示,大小正确;突变菌 TWF001Δ*pts*H 用引物 *pts*Hf1/*pts*Hr2 扩增出了 1 200 bp 左右大小的条带，如 2 泳道所示,大小正确,电泳结果显示敲除了正确大小的条带,*pts*H 基因敲除成功。

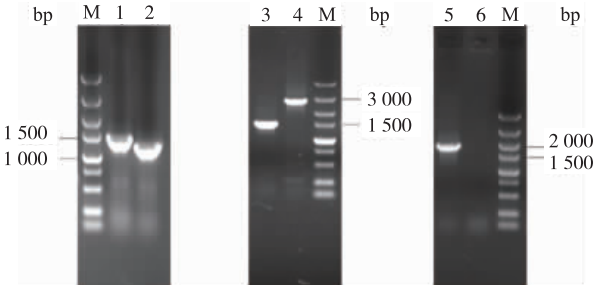


图 3　TWF001Δ*pts*H、TWF001Δ*pts*G 和 TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P 构建验证

Fig. 3　Verification of TWF001Δ*pts*H,TWF001Δ*pts*G and TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P by PCR

突变菌 TWF001Δ*pts*G 用引物 *pts*Gf1/*pts*Gr2 PCR 验证,扩增出 1 500 bp 左右大小的条带,如 3 泳道所示，大小正确；而对照菌 TWF001 用引物 *pts*Gf1/*pts*Gr22 扩增出的片段大小为 3 000 bp 左右,如 4 泳道所示,大小正确。电泳结果显示敲除了正确大小的条带,*pts*G 基因敲除成功。

对照菌 TWF001 经过基因组测序显示没有完整的 *gal*P 基因，只存在 *gal*P 起始十几个碱基的片段,且没有其它同源性较高的序列。要插入的片段包括一段 *gal*P 位置上的上游同源片段、*trc* 启动子

和 *gal*P 基因，大小为 2 048 bp，突变菌 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 用引物 *gal*Pf1/*gal*Pr2 PCR 验证，扩增出 2 000 bp 左右大小的条带，如 5 泳道所示，大小正确；而 TWF001Δ*pts*H 基因组上没有引物 *gal*Pr2 结合位点，所以扩增不出条带，如 6 泳道所示。TWF001 基因结构特殊，*gal*P 基因本身有 1 395 bp，在基因组上插入 *trc* 启动子过表达 *gal*P 基因片段的难度较大。PCR 验证正确的转化子，提取基因组，高保真酶扩增插入片段，对片段进行测序检验，完全正确插入片段并且没有突变的就是最终正确突变株。

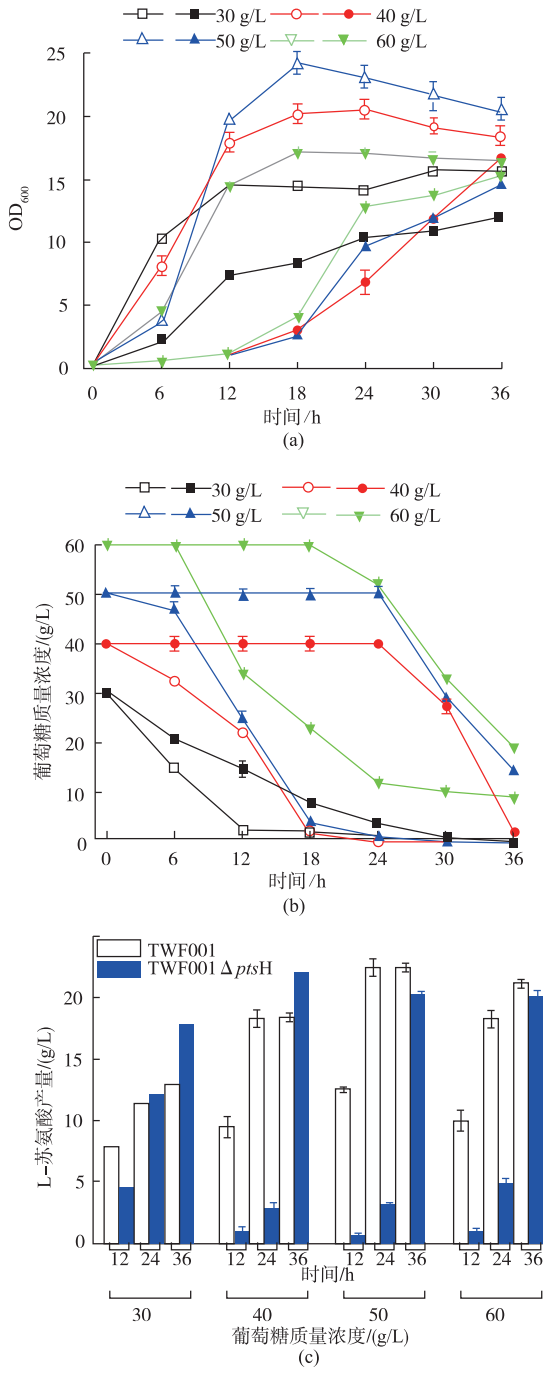
2.2 TWF001Δ*pts*H 在不同葡萄糖质量浓度培养基中的摇瓶发酵结果分析

为了进一步提高 TWF001 的 L-苏氨酸含量，在 TWF001 中敲除 *pts*H 基因，得到突变株 TWF001Δ*pts*H。突变株在葡萄糖质量浓度为 30 g/L[6] 的培养基中进行摇瓶发酵，测定生长 OD_{600}、葡萄糖质量浓度和 L-苏氨酸的产量。为了探究 L-苏氨酸产量和转化率能否随着葡萄糖质量浓度的升高进一步提升，又分别在含 40、50、60 g/L 葡萄糖质量浓度的培养基中进行摇瓶发酵。

出发对照菌 TWF001 和突变菌 TWF001Δ*pts*H 在含 30、40、50、60 g/L 葡萄糖的培养基中的摇瓶发酵结果见图 4。

由图 4(a)可知，TWF001Δ*pts*H 在各个葡萄糖质量浓度中的生长都要比 TWF001 慢，生长受到明显的抑制。当葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时，TWF001 的最大 OD_{600} 为 15.59，当葡萄质量浓度继续升高到 40、50 g/L 时，随着葡萄糖质量浓度的升高，TWF001 的生长越好，60 g/L 的葡萄糖就开始抑制菌体的生长。TWF001Δ*pts*H 在 30 g/L 葡萄糖中的最大 OD_{600} 为 12.03，随着葡萄糖质量浓度升高到 40、50、60 g/L 时，虽然 OD_{600} 变大了，但是发酵前期 18 h 内，菌体生长非常缓慢，不利于发酵合成 L-苏氨酸。

如图 4(b)所示，TWF001 在 30 g/L 葡萄糖质量浓度发酵时，发酵 24 h 耗尽葡萄糖；随着葡萄糖质量浓度的升高，发酵 36 h 最多能耗掉 50 g/L 的葡萄糖。TWF001Δ*pts*H 在 30 g/L 葡萄糖质量浓度发酵时，发酵 30 h 耗尽葡萄糖，随着葡萄糖质量浓度的升高，耗糖明显被抑制，发酵 36 h 最多能耗掉 40 g/L 的糖，并且当葡萄糖质量浓度等于或者高于 40 g/L 时，发酵前 18 小时几乎不消耗葡萄糖，葡萄糖摄取



空心图例：TWF001；实心图例：TWF001Δ*pts*H

图 4 TWF001 和 TWF001Δ*pts*H 在葡萄糖质量浓度为 30、40、50、60 g/L 的培养基中摇瓶发酵

Fig. 4 Flask fermentation of TWF001 and TWF001Δ*pts*H in medium with 30, 40, 50, 60 g/L glucose

被严重抑制，各个质量浓度中的耗糖速度都比对照菌慢。

如图 4(c)所示，TWF001 在 30 g/L 葡萄糖质量浓度发酵时 L-苏氨酸产量为 12.97 g/L，糖酸转化

率为0.43 g/g；随着葡萄糖质量浓度升高到 40 g/L 时，L-苏氨酸产量为 18.41 g/L，此时达到最大转化率 0.46 g/g；随着葡萄糖质量浓度升高到 50 g/L 时，L-苏氨酸产量达到最大的 22.56 g/L，转化率下降到 0.45 g/g；当葡萄糖质量浓度为 60 g/L 时，苏氨酸产量反而下降。TWF001Δ*pts*H 在 30 g/L 葡萄糖发酵时 L-苏氨酸产量为 17.90 g/L，比对照 TWF001 提高 38.01%，这时的转化率为 0.60 g/g；葡萄糖质量浓度升高到 40 g/L 时，L-苏氨酸产量达到最大的 22.16 g/L，但是转化率下降到 0.58 g/g，随着葡萄糖质量浓度升高到 50、60 g/L 时，苏氨酸产量反而下降，并且比对照菌要低。

*pts*H 基因的敲除在 30、40 g/L 葡萄糖质量浓度时能明显地提高 L-苏氨酸的产量以及糖酸转化率，但是生长和糖耗受到抑制，并且 40 g/L 的葡萄糖就开始明显抑制生长和糖耗，降低转化率，只适合在 30 g/L 的葡萄糖进行发酵。

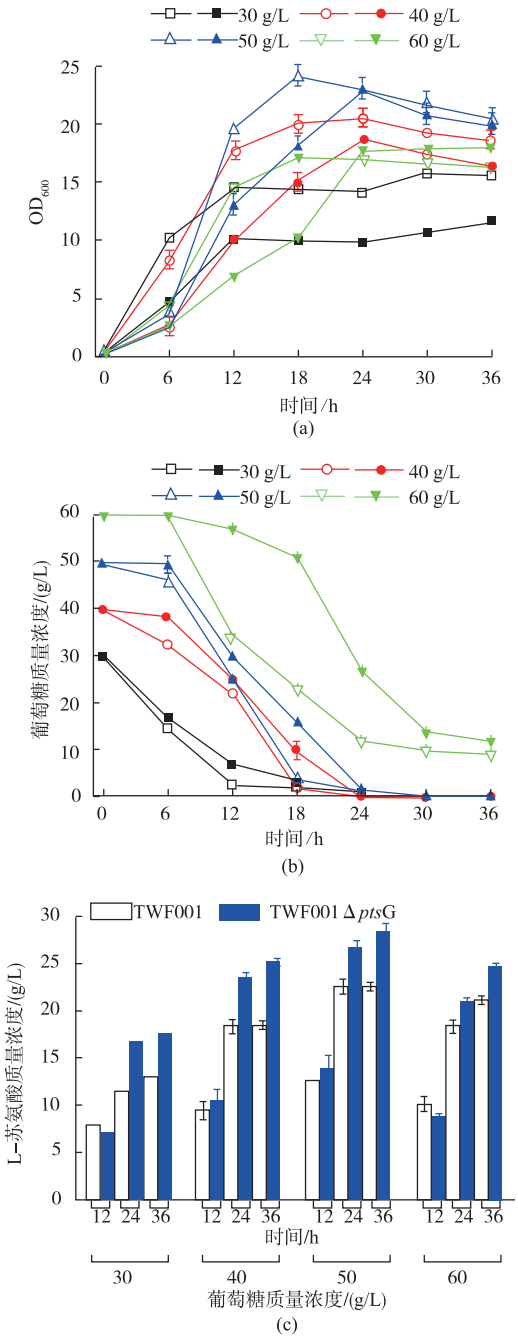
2.3 TWF001Δ*pts*G 在不同葡萄糖质量浓度培养基中的摇瓶发酵结果分析

为了进一步提高 TWF001 的 L-苏氨酸含量，在 TWF001 中敲除 *pts*G 基因，得到突变株 TWF001Δ*pts*G。突变株在 30 g/L 葡萄糖的培养基中进行摇瓶发酵，测定生长 OD_{600}、葡萄糖质量浓度和 L-苏氨酸的产量。为了探究 L-苏氨酸产量和转化率能否随着葡萄糖质量浓度的升高进一步提升，又分别在含 40、50、60 g/L 葡萄糖的培养基中进行摇瓶发酵。

出发对照菌 TWF001 和突变菌 TWF001Δ*pts*G 在含 30、40、50、60 g/L 葡萄糖的培养基中的摇瓶发酵结果见图 5。

如图 5(a)所示，TWF001Δ*pts*G 在各个葡萄糖质量浓度中的生长比 TWF001 要慢一些，但生长没有受到太大的抑制。当葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时，TWF001Δ*pts*G 的最大 OD_{600} 为 11.61，当葡萄糖质量浓度继续升高到 40、50 g/L 时，随着葡萄糖质量浓度的升高，菌体生长的越好，60 g/L 的葡萄糖在发酵前 18 小时抑制菌体的生长。

如图 5(b)所示，TWF001Δ*pts*G 在 30 g/L 葡萄糖发酵时，发酵 24 h 耗尽葡萄糖，与对照 TWF001 一致；并且在 40、50 g/L 的葡萄糖中的耗糖速度与对照菌十分接近，没有明显被抑制，当葡萄糖质量浓度升高到 60 g/L 时，突变菌的葡萄糖摄取才表现出明显被抑制。



空心图例：TWF001；实心图例：TWF001Δ*pts*G.

图 5 TWF001 和 TWF001Δ*pts*G 在葡萄糖质量浓度为 30、40、50、60 g/L 的培养基中摇瓶发酵

Fig. 5 Flask fermentation of TWF001 and TWF001Δ*pts*G in medium with 30,40,50,60 g/L glucose

如图 5(c)所示，TWF001Δ*pts*G 在 30 g/L 葡萄糖发酵时 L-苏氨酸产量为 17.59 g/L，比对照 TWF001 提高了 35.62%，这时的转化率为 0.59 g/g；当葡萄糖质量浓度升高到 40 g/L 时，L-苏氨酸产量

为 25.23 g/L，比对照 TWF001 提高 37.05%，为这个菌的最高幅度，此时的转化率达到最大 0.63 g/g；当葡萄糖质量浓度升高到 50 g/L 时，L-苏氨酸产量达到最大的 28.39 g/L，只比对照提高了 25.84%，转化率也下降为 0.57 g/g，当葡萄糖质量浓度升高到 60 g/L 时，苏氨酸产量反而下降。

*pts*G 基因的敲除既能能明显提高 L-苏氨酸的产量和糖酸转化率，40 g/L 葡萄糖时达到最大的转化率和 L-苏氨酸产量提升幅度，是最适宜的葡萄糖质量浓度。

2.4 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在不同葡萄糖质量浓度培养基中的摇瓶发酵结果分析

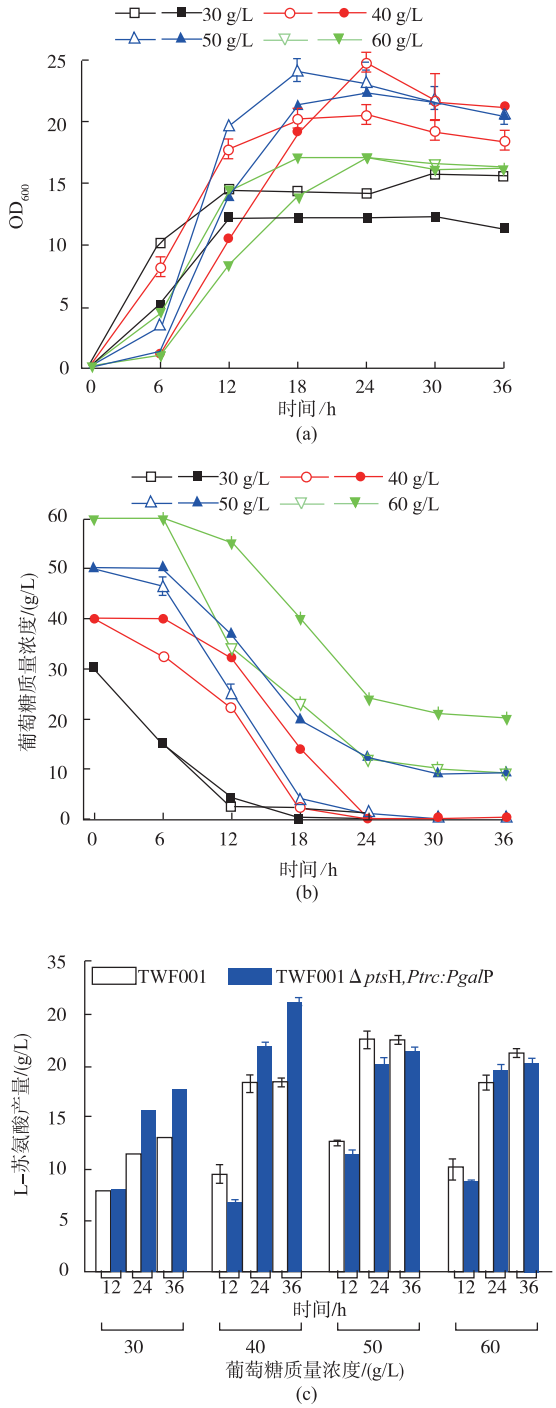
上述发酵结果显示，在 30 g/L 葡萄糖培养基中进行发酵，TWF001Δ*pts*H 的 L-苏氨酸产量为 17.90 g/L，TWF001Δ*pts*G 的 L-苏氨酸产量为 17.59 g/L。为了进一步提高 L-苏氨酸产量，在 TWF001Δ*pts*H 的基因组上用 *trc* 启动子过表达 *gal*P 基因，得到突变株 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P。对突变株在 30 g/L 葡萄糖的培养基中进行摇瓶发酵，为了探究 L-苏氨酸产量和转化率能否随着葡萄糖质量浓度的升高进一步提升，又分别在含 40、50、60 g/L 葡萄糖的培养基中进行摇瓶发酵。

出发对照菌 TWF001 和突变菌 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在含 30、40、50、60 g/L 葡萄糖的培养基中的摇瓶发酵结果见图 6。

如图 6(a)所示，TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在 30、50、60 g/L 葡萄糖中的生长比 TWF001 要慢一些，但生长没有受到太大的抑制。当葡萄糖质量浓度为 30 g/L 时，TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 的最大 OD_{600} 为 12.32；当葡萄糖质量浓度继续升高到 40 g/L 时，生长达到最好，并且比对照 TWF001 略好。升高到 50 g/L 时，最大 OD_{600} 开始下降，当继续升高到 60 g/L 时，生长开始受到较明显的抑制。

如图 6(b)所示，TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在 30 g/L 的葡萄糖中的耗糖速度与对照菌几乎一致，发酵 18 h 耗尽 30 g/L 的葡萄糖，当葡萄糖质量浓度高于 40 g/L 时，耗糖受到一定抑制，且质量浓度越高抑制越明显，发酵 36 h，最多能耗尽 40 g/L 的葡萄糖。

如图 6(c)所示，TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在 30 g/L 葡萄糖发酵时 L-苏氨酸产量为 17.66 g/L，比对照 TWF001 提高了 36.16%，这时的转化率为



空心图例:TWF001; 实心图例: TWF001Δ*pts*H, *Ptrc*::*Pgal*P

图 6 TWF001 和 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在葡萄糖质量浓度为 30、40、50、60 g/L 的培养基中摇瓶发酵情况

Fig. 6 Flask fermentation of TWF001 and TWF001Δ*pts*H, *Ptrc*::*Pgal*P in medium with 30, 40, 50, 60 g/L glucose

0.60 g/g；当葡萄糖质量浓度升高到 40 g/L 时，L-苏氨酸产量为 26.16 g/L，比对照 TWF001 提高了

42.10%,为 3 株突变菌的最高幅度,此时的转化率达到最大的0.65 g/g,也是所有菌中最高的;当葡萄糖质量浓度升高到 50、60 g/L 时,L-苏氨酸产量分别下降到到21.43、20.16 g/L。

*pts*H 基因的敲除能提高 L-苏氨酸的产量和糖酸转化率,但是 *pts*H 的生长和糖耗受到明显的抑制,在敲除 *pts*H 突变菌的基础上用 *trc* 启动子过表达 *gal*P 基因,不仅能改善生长和葡萄糖摄取[20],还能进一步提高 L-苏氨酸的产量和糖酸转化率。

2.5 基因 *pts*H 和 *pts*G 的敲除以及 *gal*P 的过表达对 L-苏氨酸合成相关基因的转录水平的影响

为了探究造成这 3 株突变菌 L-苏氨酸产量差异的原因,对大肠杆菌中影响 L-苏氨酸合成的相关基因 *thr*A、*thr*B、*thr*C、*pfk*A、*eno*、*pyk*A、*glt*A、*gdh*A 和 *asp*C 进行了实时荧光定量 PCR 分析。如图 7 所示,TWF001Δ*pts*H 中 *thr*A、*thr*B 和 *thr*C 的表达都有所提高,*thr*C 上升的最明显,这可能是苏氨酸产量增加的主要原因之一;*eno* 基因明显提高有利于合成更多的 PEP [21],*pyk*A 基因的上调虽然不利于积累 PEP,但有利于糖酵解的顺利进行合成丙酮酸,*pfk*A 和 *glt*A 基因是糖酵解和 TCA 循环的关键限速步骤,它们的下调比较不利于生长[5],这可能是 TWF001Δ*pts*H 生长和糖耗受到抑制的原因之一。TWF001Δ*pts*G 中 *thr*A 基因明显上调,使得苏氨酸合成加强,*pfk*A 和 *eno* 基因上调的比较明显,这表示糖酵解的碳流和流向 PEP 的碳流的提高,这有利于糖酵解和合成更多的 PEP[11-13],更多的 PEP 供应于苏氨酸的合成,*pyk*A 基因的上调也使得生长更好,*gdh*A 基因的上调有利于合成更多谷氨酸,而胞内氮源绝大部分来自谷氨酸[21],有利于 L-苏氨酸的合成,*aps*C 基因的上调有利于合成天冬氨酸,天冬氨酸是重要的苏氨酸前体物质。在 TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P 中,*thr*A、*thr*B、*thr*C、*gdh*A 和 *asp*C 这些基因都有明显的上调,这些基因的上调都直接有利于 L-苏氨酸的合成,这些可能是 TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P 的 L-苏氨酸产量的提升幅度和糖酸转化率最高的原因;*eno* 基因也明显上调有助于 PEP 的合成,但是 *pfk*A 和 *glt*A 基因上调较弱,不利于糖酵解和 TCA 循环。

TWF001、TWF001Δ*pts*H 和 TWF001Δ*pts*G 中没有 *gal*P 基因,3 株菌中 *gal*P 的相对表达量相同,都为 1;TWF001Δ*pts*H,*Ptrc*::*Pgal*P 中 *gal*P 的相对表达量上升到 16.2,提升幅度较大,表明插入基因组上的 *gal*P 基因得到表达。

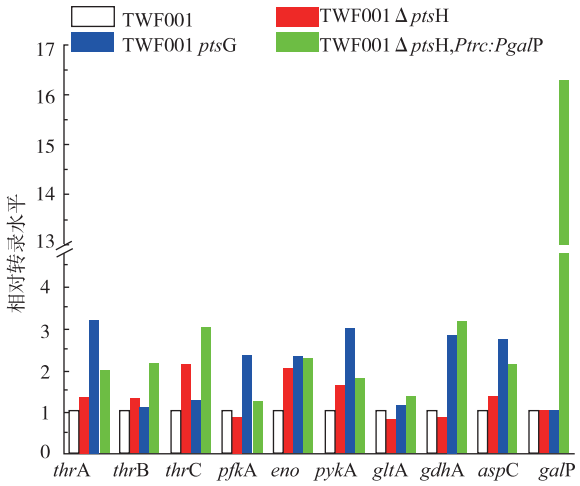


图 7 L-苏氨酸合成相关基因的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 7 RT-qPCR analysis of genes involved in L-threonien synthesis

3 结 语

在一株高产 L-苏氨酸的大肠杆菌中分别单独敲除 *pts*H 和 *pts*G 基因,并在 *pts*H 敲除菌的基础上过表达 *gal*P 基因,进行摇瓶发酵,都能较大幅度提高 L-苏氨酸产量和提高糖酸转化率,且菌株不携带任何表达质粒,有利于工业发酵。

*pts*G 编码 PTS 系统中特异识别结合葡萄糖的膜结合蛋白 EIICBGlc,*pts*H 编码 PTS 中磷酸组氨酸搬运蛋白 HPr,是转运磷酸基团过程的一种蛋白质,但是它为 PTS 系统转运其他物质所共用。敲除这两个基因都能使 PTS 系统转运葡萄糖受阻,从而通过其他转运蛋白质如 GalP 和 MglABC 转运葡萄糖,能使用于 PTS 系统转运葡萄糖消耗的 PEP 积累而用于代谢合成如 L-苏氨酸;RT-qPCR 也显示这两个基因的敲除能增加 L-苏氨酸合成相关基因的表达,从而促进苏氨酸的合成。

对 TWF001、TWF001Δ*pts*H 和 TWF001Δ*pts*G 进行摇瓶发酵,此时葡萄糖质量浓度为 30 g/L,TWF001Δ*pts*H 的生长和糖耗没有受到非常明显抑制,此时它的 L-苏氨酸产量和糖酸转化率是最高的,为了进一步提高 TWF001Δ*pts*H 的生长糖耗和 L-苏氨酸产量,在基因组上用 *trc* 过表达 *gal*P 基因。GalP 蛋白转运的葡萄糖只需要消耗一分子 ATP,积

累的 PEP 可大部分用于合成代谢，而且能改善葡萄糖的摄取速度。继续提升培养基中葡萄糖质量浓度，并进行摇瓶发酵，研究结果显示 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 在 40 g/L 的葡萄糖质量浓度时达到最大的 L-苏氨酸产量 26.16 g/L，提高幅度为 42.11%，转化率能达到 0.65 g/g。先敲除 PTS 系统中与转运葡萄糖相关的编码基因，使细菌不能以 PTS 系统为主要的转运葡萄糖的途径，从而减少用于转运葡萄糖所需要的 PEP，这样来自糖酵解的 PEP 可大部分用于合成代谢，再过表达 GalP 这样不需要消耗其他重要中间代谢物的葡萄糖转运蛋白质，这样在不严重影响生长和糖耗的同时能大幅度提高 L-苏氨酸产量和转化率。

之前有文献报道敲除 *pts*G 或者 *pts*H 基因可以用来生产其他物质[22-24]，本试验在一株高产 L-苏氨酸中只敲除 *pts*H、*pts*G 以及过表达 *gal*P 就能较大幅度的提升产量和转化率，效果是十分明显的，这在工业应用上是比较有利的，但还可以进一步继续改造，使得生长和糖耗进一步提升。

因为本出发菌基因组结构较 MG1655 复杂，生长缓慢、单菌落非常小，构建较困难，可以继续在本研究的基础上，在突变菌 TWF001Δ*pts*G 中用 *trc* 过表达 *gal*P 基因，以及在 TWF001Δ*pts*H，*Ptrc*::*Pgal*P 中过表达 *glk* 基因，探究生长和 L-苏氨酸产量情况并进行其他能提高苏氨酸产量的代谢改造。

参考文献：

[1] PARKJ H，LEES Y. Metabolic pathways and fermentative production of L-aspartate family amino acids[J]. **Biotechnol J**，2010，5(6)：560-577.

[2] LEEJ H，LEED E，LEEB U，et al. Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain[J]. **Journal of Bacteriology**，2003，185(18)：5442-5451.

[3] 董迅衍，王小元. 微生物生产 L- 苏氨酸的代谢工程研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(12)：1233-1240.

[4] DONG X，QUINNP J，WANG X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine[J]. **Biotechnol Adv**，2011，29(1)：11-23.

[5] XI E X，LIANG Y，LIU H，et al. Modification of glycolysis and its effect on the production of L-threonine in *Escherichia coli* [J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**，2014，41(6)：1007-1015.

[6] LEEK H，PARKJ H，KIMT Y，et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. **Mol Syst Biol**，2007，149(3)：1744-4294.

[7] XU Y，LIU Y，LI F，et al. Identification of a new gene *yec*C involved in threonine export in *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiol Lett**，2017，364(17)：1078-1097.

[8] LIU L，CHEN S，WU J. Phosphoenolpyruvate：glucose phosphotransferase system modification increases the conversion rate during L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**，2017，44(10)：1385-1395.

[9] GABORE，GOHLERA K，KOSFELD A，et al. The phosphoenolpyruvate-dependent glucose-phosphotransferase system from *Escherichia coli* K-12 as the center of a network regulating carbohydrate flux in the cell[J]. **Eur J Cell Biol**，2011，90(9)：711-720.

[10] HERNANDEZ-Montalvo V，MARTINEZ A，HERNANDEZ-Chavez G，et al. Expression of *gal*P and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products[J]. **Biotechnol Bioeng**，2003，83(6)：687-694.

[11] MUNOZ-Marquez M E，PONCE-Rivas E. Effect of *pfk*A chromosomal interruption on growth，sporulation，and production of organic acids in *Bacillus subtilis*[J]. **J Basic Microbiol**，2010，50(3)：232-240.

[12] SABNISN A，YANGH，ROMEOT. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*[J]. **Journal of Biological Chemistry**，1995，270(49)：29096-29104.

[13] HOGEMAB M，ARENTSJ C，BADERR，et al. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates：the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc[J]. **Molecular Microbiology**，2002，30(3)：487-498.

[14] 董迅衍，徐大庆，李烨，等. 乳糖发酵短杆菌lysC 突变对 L- 赖氨酸积累的影响[J]. 食品与生物技术学报，2011，30(4)：592-

596.

[15] WANG D,LI Q,MAO Y,et al. High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *ptsG* mutant *Escherichia coli*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2010,87(6):2025-2035.

[16] ZHAOH,FANGY,WANGX,et al. Increasing L-threonine production in *Escherichia coli* by engineering the glyoxylate shunt and the L-threonine biosynthesis pathway[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2018,102(13):5505-5518.

[17] JIANG Y,CHEN B,DUAN C,et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2015,81(7):2506-2514.

[18] KOROSA,VARGAZ,MOLNAR-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography[J]. **J Chromatogr A**,2008,1203(2):146-152.

[19] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. **Methods**,2001,25(4):402-408.

[20] LIUH,SONGR,LIANGY,et al. Genetic manipulation of *Escherichia coli* central carbon metabolism for efficient production of fumaric acid[J]. **Bioresour Technol**,2018,270:96-102.

[21] SHIMIZU K. Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on *Escherichia coli* metabolism[J]. **ISRN Biochem**,2013(2013):2090-7729.

[22] CHENY,LIUY,DINGD,et al. Rational design and analysis of an *Escherichia coli* strain for high-efficiency tryptophan production [J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**,2018,45(5):357-367.

[23] SONGC W,LEEJ,KOY S,et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-aminopropionic acid [J]. **Metab Eng**,2015,30:121-129.

[24] SONGC W,KIMD I,CHOIS,et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid[J]. **Biotechnol Bioeng**,2013,110(7):2025-2034.

科　技　信　息

赖氨酸水平引起瘤胃微生物代谢途径变化

近日,中国农业科学院饲料研究所(以下简称饲料所)反刍动物饲料创新团队对犊牛日粮氨基酸需要量和平衡模式进行了系统研究,发现赖氨酸缺乏对母犊牛瘤胃发酵功能和微生物区系组成具有调控作用,为反刍动物绿色养殖及饲料生产中合理使用氨基酸、降低日粮蛋白质水平提供了理论依据。相关研究成果在线发表于《应用微生物学与生物技术》。

饲料所研究员、团队首席科学家屠焰介绍,我国蛋白质饲料资源较为缺乏,亟待养殖业优化日粮蛋白质中氨基酸的配比以降低对蛋白质饲料原料的需求,此外也可避免过多的氮排放造成的环境污染。因此,在拟定配方时,氨基酸平衡已经成为配制日粮时遵循的基础原则之一。赖氨酸一直被认为是动物多个不同生长阶段的第一或第二限制性氨基酸,赖氨酸的缺乏会严重影响动物的生长和生产性能。在反刍动物瘤胃中含有多种菌属可消耗赖氨酸用于氨气或微生物蛋白质的合成,因此,日粮赖氨酸水平不同可通过调控瘤胃发酵和微生物区系的组成来影响日粮的消化和吸收。

该团队基于早期瘤胃发育和调控对反刍动物培育的重要作用,评价了降低日粮赖氨酸水平对母犊牛瘤胃发酵和微生物合成的影响。在荷斯坦母犊牛采食赖氨酸扣除日粮 90 d 后,取瘤胃液样品进行检测,发现两组牛瘤胃微生物组成存在差异,产生短链脂肪酸的菌属相对丰度显著减少,瘤胃液丁酸与产丁酸细菌 UCG 010 的相对丰度呈正相关。总之,日粮赖氨酸水平降低 30%(过瘤胃保护赖氨酸)并未影响瘤胃发酵参数,但影响了瘤胃氨基酸代谢相关菌属的相对丰度,尤其对产生丁酸的菌属具有明显的调节作用。

[信息来源] 中国科学报 张晴丹. 赖氨酸水平引起瘤胃微生物代谢途径变化 [EB/OL]. (2020-07-27). http://paper.sciencenet.cn//htmlpaper/2020/7/202072710301746557798.shtm