大肠杆菌 PTS^{Ntr} 相关基因缺失对苏氨酸合成的影响

张淑嫣[1,2]，胡晓清[1,2]，李 莹[1,2]，王小元[*1,2,3]

（1. 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 国际食品安全联合实验室，江苏 无锡 214122）

摘要： 大肠杆菌的氮磷酸转移酶系统（nitrogen phosphotransferase system，PTS^{Ntr}）在其工作过程中会消耗 *L*-苏氨酸合成的前体物质磷酸烯醇式丙酮酸，敲除相关基因或可影响苏氨酸合成。作者利用 CRISPR-Cas9 系统，分别敲除 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN*，构建得到突变株 MZ001、MZ002 和 MZ003。通过对出发菌株和突变菌株测定生长曲线，发现 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的单缺失使菌株培养前期生长迟缓，迟滞期延长，后期快速生长，稳定期生物量积累大于出发菌株。之后在出发菌株和突变菌株中引入含有苏氨酸合成的 3 个关键酶编码基因 *thrA**、*thrB* 和 *thrC* 以及苏氨酸转运蛋白编码基因 *rhtC* 的表达质粒。对比菌株 MG1655/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*，菌株 MZ001/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*、MZ002/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* 和 MZ003/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* 苏氨酸的产量有明显提高，分别为 3.805、1.722、3.091 g/L。本研究表明，大肠杆菌的 PTS^{Ntr} 相关基因的敲除对提高其 *L*-苏氨酸的合成能力有促进作用。

关键词： 大肠杆菌；*L*-苏氨酸；氮磷酸转移酶系统

中图分类号：Q 933　**文章编号：**1673-1689(2023)02-0031-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.02.005

Effects of Deleting Genes Related to PTS^{Ntr} on *L*-Threonine Synthesis in *Escherichia coli*

ZHANG Shuyan[1,2]，*HU Xiaoqing*[1,2]，*LI Ying*[1,2]，*WANG Xiaoyuan*[*1,2,3]

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

Abstract： Phosphoenolpyruvate, the precursor of *L*-threonine synthesis, is consumed by the nitrogen phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) of *Escherichia coli*, so the deletion of genes related to PTS^{Ntr} may affect the synthesis of *L*-threonine. In this study, *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* genes encoding the component proteins of PTS^{Ntr} in *E.coli* MG1655 were deleted using CRISPR-Cas9 system, and the corresponding mutants MZ001, MZ002 and MZ003 were constructed. The results showed that the single deletion of *ptsP*、*ptsO* or *ptsN* led to slower growth in the early stage and longer lag period. The mutant strains grew fast in the later stable stage and their biomass accumulation was greater than that of the original

收稿日期： 2021-03-16

基金项目： 国家重点研发计划项目(2021YFC2100901)。

* **通信作者：** 王小元(1965—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

E-mail：xwang@jiangnan.edu.cn

strain. Then, the expression plasmid pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*, which contained *thrA**、*thrB* and *thrC* encoding threonine synthesis as well as *rhtC* encoding threonine transporter, was introduced into the original and mutant strains. In comparison with MG1655/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*, the *L*-threonine titer of MZ001/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*, MZ002/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* and MZ003/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* significantly increased by 3.805 g/L, 1.722 g/L and 3.091 g/L, respectively. The results showed that the deletion of genes related to PTS^{Ntr} of *E. coli* promoted the synthesis of *L*-threonine.

Keywords: *Escherichia coli*, *L*-threonine, nitrogen phosphotransferase system

L-苏氨酸属于人体必需氨基酸，应用范围颇广，涉及食品、医疗等行业，市场需求大[1]。工业生产*L*-苏氨酸的方式主要是微生物发酵法，主要生产菌为发酵周期短、培养要求低的大肠杆菌[2]。

如图 1 所示，大肠杆菌以草酰乙酸为前体物质合成苏氨酸，天冬氨酸转氨酶催化草酰乙酸转化为*L*-天冬氨酸，再经过 5 步酶促反应合成苏氨酸[3]。其中，位于同一操纵子上的基因 *thrA*，*thrB* 和 *thrC* 分别编码 *L*-天冬氨酸转化为苏氨酸的 *3* 个关键酶，即天冬氨酸激酶、高丝氨酸激酶和苏氨酸合酶，抗苏氨酸反馈抑制的基因 *thrA** 是由基因 *thrA* 的第 1 034 位碱基 C 突变为 T 得到的[4]。*rhtC* 编码往胞外运输苏氨酸的转运蛋白[5]。本课题组赵慧等构建质粒 pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* 并转导至苏氨酸工程菌中，发现增强上述 4 个基因的表达水平可以增大苏氨酸的产量[4]。另一项研究报道，在脱敏大肠杆菌 MG442 中引入含有 *thrA***BC* 的质粒 PVIC40，菌株的 *L*-苏氨酸产量提高了 130%[6]。

微生物代谢工程推动了苏氨酸高产菌的构建[7]。本研究团队长期致力于苏氨酸生产菌株的代谢改造，构建了多株苏氨酸高产菌株[4,8-11]。杨俊等[9]通过敲除大肠杆菌苏氨酸生产菌株基因组上的基因 *fadR*、*fabR* 和 *lacI*，并且在基因组上插入基因 *aceBA* 和 *fadBA*，用 $P_{tac-trc}$ 替换 *acs* 的原启动子，将 *ppnK*、*thrA***BC*-*rhtC*、*aspC* 和 *ppc* 基因再插入基因组上，与出发菌株相比，最终菌株的产量提高了 36.67%。方宇等[10]设计的温度开关系统通过温度控制丙酮酸羧化酶的异源表达和草酰乙酸脱羧反应的进行，对丙酮酸和草酰乙酸之间的碳流进行了重新平衡。应用该系统后的菌株以葡萄糖为原料高产苏氨酸，最高产率可达 124.03%，超过了理论值(122.47%)。

大肠杆菌中存在 2 个磷酸转移酶系统，分别是糖磷酸转移酶系统（sugar phosphotransferase system）和氮磷酸转移酶系统（nitrogen phosphotransferase system，PTS^{Ntr}）[12]，前者主要负责碳源的转运[13]，将葡萄糖磷酸化并转运到细胞内[14]。而后者主要以 EIIA^{Ntr} 为输出域发挥调控功能[15]。EIIA^{Ntr} 可以在有额外碳源存在的情况下促进大肠杆菌对氮的吸收，因此，PTS^{Ntr} 被认为是调节大肠杆菌对碳源和氮源的利用的关键联系枢纽[15]，但是目前暂时没有文献报道这种联系的具体机制。大肠杆菌的 PTS^{Ntr} 由 3 类蛋白质构成，分别为 EI^{Ntr}、NPr 和 EIIA^{Ntr}，它们分别由基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 编码。EI^{Ntr} 接受来自 PEP 的磷酸基团发生自磷酸化，接着磷酸化 NPr，然后 NPr 将磷酸基团转移到 EIIA^{Ntr}。这一系列的磷酸化过程的完成需要消耗 PEP，而 PEP 是 *L*-苏氨酸合成的重要前体物质，推测 PTS^{Ntr} 相关基因的缺失可以使 PEP 的供给增加，从而增强苏氨酸的合成[12]。

作者采用 CRISPR-Cas9 系统[16]分别敲除大肠杆菌 MG1655 基因组中 PTS^{Ntr} 相关基因，构建了 MG1655Δ*ptsP*、MG1655Δ*ptsO* 和 MG1655Δ*ptsN*，分别将空载表达质粒 pFW01 和含有 *L*-苏氨酸合成关键酶编码基因以及转运蛋白编码基因的质粒 pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* 转入突变株与对照菌株 MG1655 中，摇瓶发酵探究比较 8 株重组菌苏氨酸合成能力。结果表明，在含有质粒 pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* 的情况下，PTS^{Ntr} 相关基因缺失的菌株 *L*-苏氨酸产量明显高于对照菌株。其中，缺失基因 *ptsP* 使 *L*-苏氨酸的产量增加得最多，而含有空载质粒的菌株苏氨酸产量很低。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株与培养基 表 1 为本研究使用的菌株和质粒。JM109 的感受态细胞用于构建质粒，MG1655 为本研究的出发菌株。

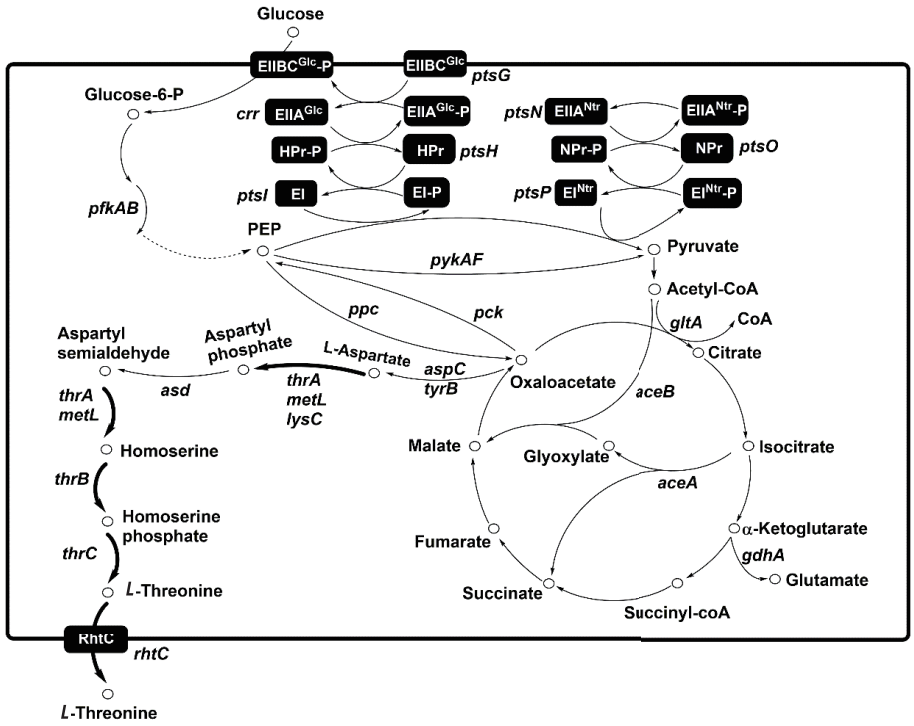


图 1　大肠杆菌 *L*–苏氨酸合成代谢途径

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

表 1　本研究使用构建的菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used and reconstructed in this study

菌株和质粒	描述	来源
菌株 JM109	Wild–type *E. coli*	NEB
菌株 MG1655	Wild–type *E. coli* K–12	CGSC 6300
菌株 MZ001	MG1655 敲除基因 *ptsP*	本研究构建
菌株 MZ002	MG1655 敲除基因 *ptsO*	本研究构建
菌株 MZ003	MG1655 敲除基因 *ptsN*	本研究构建
菌株 MG1655/pFW01	MG1655 携带质粒 pFW01	本研究构建
菌株 MZ001/pFW01	MZ001 携带质粒 pFW01	本研究构建
菌株 MZ002/pFW01	MZ002 携带质粒 pFW01	本研究构建
菌株 MZ003/pFW01	MZ003 携带质粒 pFW01	本研究构建
菌株 MG1655/ pFW01–*thrA*BC–rhtC*	MG1655 携带质粒 pFW01–*thrA*BC–rhtC*	本研究构建
菌株 MZ001/ pFW01–*thrA*BC–rhtC*	MZ001 携带质粒 pFW01–*thrA*BC–rhtC*	本研究构建
菌株 MZ002/ pFW01–*thrA*BC–rhtC*	MZ002 携带质粒 pFW01–*thrA*BC–rhtC*	本研究构建
菌株 MZ003/ pFW01–*thrA*BC–rhtC*	MZ003 携带质粒 pFW01–*thrA*BC–rhtC*	本研究构建
质粒 pCas	repA101(Ts) *kan Pcas–cas9 ParaB–Red lacIq Ptrc–sgRNA–pMB1*	[16]
质粒 pTargetF	*pMB1 aadA* sgRNA	[16]
质粒 pTargetF–*ptsP*	*pMB1 aadA* sgRNA–*ptsP*	本研究构建
质粒 pTargetF–*ptsO*	*pMB1 aadA* sgRNA–*ptsO*	本研究构建
质粒 pTargetF–*ptsN*	*pMB1 aadA* sgRNA–*ptsN*	本研究构建
质粒 pFW01	pF2 表达质粒中插入启动子 PJ,用 *fabV* 替换 *mfabI*	[4]
质粒 pFW01–*thrA*BC–rhtC*	pFW01 连接基因 *thrA*BC* 及 *rhtC*	[4]

M9 基本培养基：首先配制 M9 母液，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 17.1 g/L，KH_2PO_4 3 g/L，NaCl 0.5 g/L，NH_4Cl 1 g/L；然后在 1 L 的 M9 母液中添加 20 g/L 葡萄糖溶液 20 mL，1 mol/L $CaCl_2$ 溶液 100 μL，1 mol/L $MgSO_4$ 溶液 2 mL，最后于 121 ℃灭菌 20 min。

LB 培养基配方：酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L；固体 LB 培养基需额外添加质量分数 1.5%的琼脂粉；高压蒸汽锅 121 ℃灭菌 20 min。

摇瓶发酵培养基：葡萄糖 40 g/L，酵母粉 2 g/L，柠檬酸 2 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 25 g/L，KH_2PO_4 7.46 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L，$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.005 g/L，$CaCO_3$ 20 g/L，KOH 调至 pH 6.8，高压蒸汽锅 115 ℃灭菌 15 min。

1.1.2 实验仪器 高压蒸汽灭菌锅（MLS-3781L）：日本 Panasonic 公司；回旋式摇床（ZQZY-70s）：上海知楚公司；高效液相色谱仪（Agilent 1200）：Agilent 公司；PCR 仪（C100）：美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 酶与试剂 在本研究中，采用 PrimeStar DNA 聚合酶扩增基因片段，然后纯化 PCR 产物。用 2×Taq PCR MasterMix 进行菌落 PCR 验证，对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，并观察其条带长短以判断实验结果。PCR 反应的体系可以根据所用酶的说明书进行配制。

1.2 实验方法

1.2.1 基因缺失突变株的构建 本研究所用引物见表 2。采用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统敲除 MG1655 基因组中的基因 *ptsP*，构建得到 MZ001。提取 MG1655 的基因组作为模板，分别以 *ptsPf1*/*ptsPr1*、*ptsPf2*/*ptsPr2* 为引物，扩增得到基因 *ptsP* 上游和下游同源片段。将两个同源片段混合作为模板，以 *ptsPf1*/*ptsPr2* 为引物，通过重叠 PCR 得到打靶片段。以质粒 pTargetF 为模板，*sgRNA-ptsP*-F/T-sgRNA-R 为引物，进行反向 PCR，扩增片段消化、磷酸化、连接，化转至 JM109 感受态细胞，以 T-*ptsP*-F/T-sgRNA-R 为引物 PCR 验证阳性克隆，构建质粒 pTargetF-*ptsP*。

取保存在-80 ℃冰箱中的 MG1655/pCas 电转感受态细胞于冰上融化 10 min，将 100 ng pTargetF-*ptsP* 和 500 ng *ptsP* 上下游同源片段的重叠片段与 100 μL MG1655/pCas 感受态细胞混合，电击后快速加入 850 μL 预冷的 LB 培养基，于 30 ℃、100 r/min 条件下恢复培养 45 min，涂布至 LB 平板，此平板同时含有卡那霉素和壮观霉素。30 ℃恒温培养 24 h，以 *ptsPf1*/*ptsPr2* 为引物进行菌落 PCR 验证，得到正

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列（5′-3′）
T-*ptsN*-F	TGCCATCGACAACCAACCGG
sgRNA-*ptsN*-F	TGCCATCGACAACCAACCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
ptsNf1	TGCAGCTCAACATTACCG
ptsNr1	CTCTTCATCGCTCTGGGCTGCTCTGACAGTGGACGC
ptsNf2	GCGTCCACTGTCAGAGCAGCCCAGAGCGATGAAGAG
ptsNr2	GGAAGGTTATCCACGCAGTA
T-*ptsP*-F	CGGTGCACAAAAAGAAACGG
sgRNA-*ptsP*-F	CGGTGCACAAAAAGAAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
ptsPf1	AAACCAGCAGTACACCAGAG
ptsPr1	GACGCTCCATAAAGGCTGCAGATGTCGGTAACCAGAATA
ptsPf2	TATTCTGGTTACCGACATCTGCAGCCTTTATGGAGCGTC
ptsPr2	TCCTATTGAGAAAATGACCG
T-*ptsO*-F	ACGTAATGACGAAGGCACCG
sgRNA-*ptsO*-F	ACGTAATGACGAAGGCACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
ptsOf1	GGAAACCAACAACCGTAGC
ptsOr1	GTGCTTCCTCTTCCTGTGGAGCACTTCAGCGTCAAAAC
ptsOf2	GTTTTGACGCTGAAGTGCTCCACAGGAAGAGGAAGCAC
ptsOr2	GGGAGTTTGAAGGGAGTTG
T-sgRNA-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
PTFB-F(+)	GGATAACGCAGGAAAGAACA
PJFY1	AGGCACCCCAGGCTTTACAG
PJFY2	CCAGGGTTTTCCCAGTCACG

确的突变株。添加 IPTG 诱导去除 pTargetF-*ptsP*,42 ℃过夜培养去除 pCas 质粒。以上述相同方法构建得到 MZ002 和 MZ003。

1.2.2 重组菌株的构建 采用化转法,将含有 *L*-苏氨酸合成所需 3 个关键酶的编码基因 *thrA**,*thrB* 和 *thrC* 以及苏氨酸转运蛋白编码基因 *rhtC* 的重组质粒 pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*[4]转导入 MG1655、MZ001、MZ002 和 MZ003 化转感受态细胞,恢复培养 45 min 后涂布至含有三氯生的 LB 平板。37 ℃恒温培养 12 h 后,以 PJFY1 和 PJFY2 为引物进行菌落 PCR。挑取验证正确的菌落,接种至含有三氯生的 5 mL LB 液体培养基中,提取质粒,并以质粒为模板进行 PCR 验证,验证正确后保藏菌种。构建得到 MG1655/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*、MZ001/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*、MZ002/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC* 和 MZ003/pFW01-*thrA***BC*-*rhtC*。以上述相同方法,将空载表达质粒 pFW01 转导入菌株 MG1655、MZ001、MZ002 和 MZ003,构建得到 MG1655/pFW01、MZ001/pFW01、MZ002/pFW01 和 MZ003/pFW01。

1.2.3 摇瓶发酵 首先,从甘油保藏管中挑菌,接种于 5 mL 含三氯生的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养 12 h。再取适量培养好的菌液涂布到含三氯生的 LB 平板上,37 ℃静置培养 12 h。然后将平板上长出来的菌苔尽可能多地刮下来,接种到 5 mL 含三氯生的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养 1.5 h,再将试管中的菌液全部转移至 50 mL 含三氯生的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养 3.5 h 后,取 500 μL 菌液加 500 μL 超纯水稀释,测其 OD_{600}。根据测量结果计算接种体积分数,以初始 OD_{600} 为0.2 接种到 30 mL 摇瓶发酵培养基中,37 ℃、200 r/min 培养 36 h,发酵过程中每隔 6 h 取 1 mL 发酵样品。

1.2.4 发酵参数的测定

1)生物量的测定 将紫外分光光度计用去离子水标定,取适量 M9 基本培养基中的菌液,用去离子水稀释一定倍数并充分混匀,测定稀释液的 OD_{600},乘以稀释倍数得到最后值。

将紫外分光光度计用 1 mol/L 稀盐酸标定,取 50 μL 振荡混匀的发酵培养基菌液样品加到 950 μL 的 1 mol/L 稀盐酸中,充分振荡混匀。测定稀释液的 OD_{600},乘以稀释倍数得到最后值。

2)发酵液葡萄糖质量浓度的测定 取 10 μL 充分离心后的发酵样品上清液,加到 990 μL 超纯水中稀释,充分混匀后,用加样针取 25 μL 稀释液加到 SBA40 还原糖测定仪中,测定发酵液中剩余葡萄糖的质量浓度。

3)发酵液氨基酸质量浓度的测定 流动相均使用超纯水配制,其中 1 L 的 A 相中含有:3.01 g 醋酸钠,5 mL 四氢呋喃,200 μL 三乙胺,溶质充分混匀溶解后,用纯醋酸调节 A 相的 pH 至 7.2;1 L 的 B相中含有:3.01 g 醋酸钠,400 mL 甲醇,400 mL 乙腈,用 10%醋酸调节 pH 至 7.2;C 相为纯甲醇;D 相为超纯水。A、B、C、D 相都需要经过抽滤才能用于 HPLC。

对样品进行如下处理:设置离心机转速为 12 000 r/min,将发酵样品离心 3 min。取 500 μL 上清液加到 500 μL 5%的三氯乙酸溶液中,在 4 ℃冰箱中静置 4 h 以上,在 12 000 r/min 离心 15 min。取适量上清液用超纯水稀释合适的倍数,再用 0.22 μm 水相针式滤膜过滤,制样进行 HPLC 测定。

采用邻苯二甲醛柱前衍生化法,进行高效液相色谱测定发酵液中氨基酸质量浓度[17]。使用的超高效液相色谱仪型号为 Agilent 1200,色谱柱型号为 Thermo ODS-2HYPERSIL C18 column (250 mm×4.0 mm,USA)。柱温设置为 40 ℃,进样流量为 0.8 mL/min。

2 结果与讨论

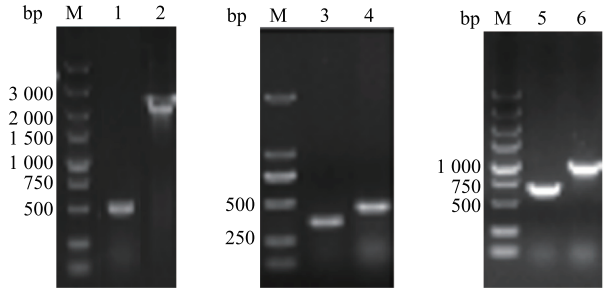
2.1 基因缺失突变株 MZ001、MZ002 和 MZ003 的构建验证

图 2 为 3 株基因缺失突变菌株构建过程的电泳验证结果。提取突变株 MZ001 基因组为模板,以 *ptsPf1*/*ptsPr2* 为引物 PCR 验证,扩增获得的条带长度为 552 bp,见泳道 1;以出发菌株 MG1655 的基因组为模板,以 *ptsPf1*/*ptsPr2* 为引物 PCR 验证,扩增得到的条带长度为 2 657 bp,见泳道 2;说明敲除基因 *ptsP* 成功。

提取突变株 MZ002 的基因组为模板,用引物 *ptsOf1*/*ptsOr2* 进行 PCR 验证,扩增的条带长度为 361 bp,见泳道 3;以出发菌株 MG1655 的基因组为模板,以 *ptsOf1*/*ptsOr2* 为引物 PCR 验证,扩增得到的条带长度为 464 bp,见泳道 4;说明敲除基因 *ptsO* 成功。

提取突变株 MZ003 的基因组为模板,以

ptsNf1/ptsNr2 为引物进行 PCR 验证,扩增出长度为 695 bp 的条带,见泳道 5;以出发菌株 MG1655 的基因组为模板,以 *ptsNf1/ptsNr2* 为引物进行 PCR 验证,扩增出的条带长度为 1 039 bp,见泳道 6;说明敲除基因 *ptsN* 成功。



泳道 1:MZ001 突变株;泳道 2:MZ001 野生型对照;泳道 3:MZ002 突变株;泳道 4:MZ002 野生型对照;泳道 5:MZ003 突变株;泳道 6:MZ003 野生型对照。

图 2 MZ001、MZ002 与 MZ003 构建验证

Fig. 2 Verification of MZ001、MZ002 and MZ003 by PCR

2.2 大肠杆菌 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的缺失对生长的影响

为研究大肠杆菌氮磷酸转移酶系统相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的缺失对其生长状况的影响,我们以出发菌株 MG1655 为对照,对基因缺失突变株 MZ001、MZ002 和 MZ003 进行生长曲线测定,所用培养基为 M9 基本培养基。如图 3 所示,突变株 MZ001、MZ002 和 MZ003 与出发菌株 MG1655 在 M9 培养基中的生长状况相差较大。MG1655 在培养的前 3 h 生长较慢,3~12 h OD_{600} 增长较快且速率减慢,12~24 h OD_{600} 逐渐稳定,最终 OD_{600} 为 1.306。MZ001 和 MZ002 在培养的前 6 h 生长非常缓慢,6~15 h 快速生长,15 h 之后生长速度减慢,OD_{600} 趋于平稳,最终 OD_{600} 分别为 2.33 和 2.01,均大于 MG1655 的最终 OD_{600}。MZ003 在培养的前 9 h 生长非常缓慢,9~15 h 快速生长,15 h 之后生长速度减慢,OD_{600} 趋于平稳,最终 OD_{600} 为 1.8。这些结果说明,与对照菌株相比,在基本培养基 M9 中,单独敲除基因 *ptsP*、*ptsO* 或 *ptsN* 的突变株前期生长速度较慢,迟滞期延长,而后期快速生长,稳定期的生物量均大于对照菌株。关于 PTS^{Ntr} 在大肠杆菌 K12 中心代谢中的碳通量分析表明,基因 *ptsN* 的缺失会造成 TCA 循环通量的减少[18],这可能是造成 MZ003 生长严重迟滞的原因。

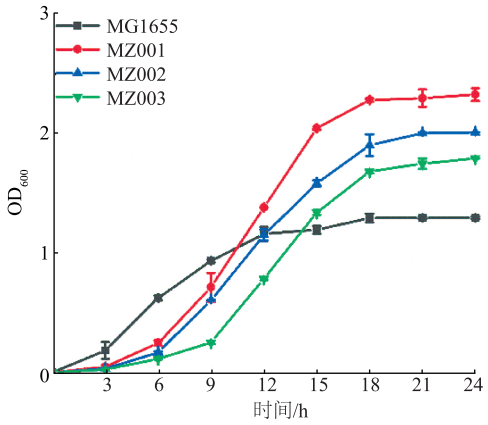


图 3 M9 基本培养基中 MG1655、MZ001、MZ002 和 MZ003 的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of MG1655, MZ001, MZ002 and MZ003 in M9 Medium

2.3 大肠杆菌 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的单缺失对 *L*-苏氨酸的合成能力的影响

为研究大肠杆菌 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的单缺失对其 *L*-苏氨酸合成能力的影响,将重组质粒 pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 转导入 MG1655、MZ001、MZ002 和 MZ003,构建得到 4 株重组菌株 MG1655/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC*、MZ001/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC*、MZ002/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 和 MZ003/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC*。为了考察在没有表达 *thrA**、*thrB*、*thrC* 以及 *rhtC* 的情况下分别敲除 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 对苏氨酸积累的影响,将空载表达质粒 pFW01 转导入 MG1655、MZ001、MZ002 和 MZ003,构建得到另外 4 株重组菌株 MG1655/pFW01、MZ001/pFW01、MZ002/pFW01 和 MZ003/pFW01。对这 8 株重组菌进行摇瓶发酵实验,发酵结果见图 4。

各重组菌株在发酵过程中的生长情况见图 4(a)。对照菌株 MG1655/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 发酵 12 h 时 OD_{600} 已达 30.7,后期生物量增长很小。MZ001/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC*、MZ002/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 和 MZ003/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 前期生长速率较对照菌株慢,这三者生长速率依次加快,重组菌株 MZ003/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 发酵 12~24 h 时生物量的增长最多,OD_{600} 从 23.88 增大到 46.28。发酵 24~36 h,重组菌株的生物量几乎不变,MG1655/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC*、MZ001/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC*、MZ002/pFW01-*thrA*BC*-*rhtC* 和

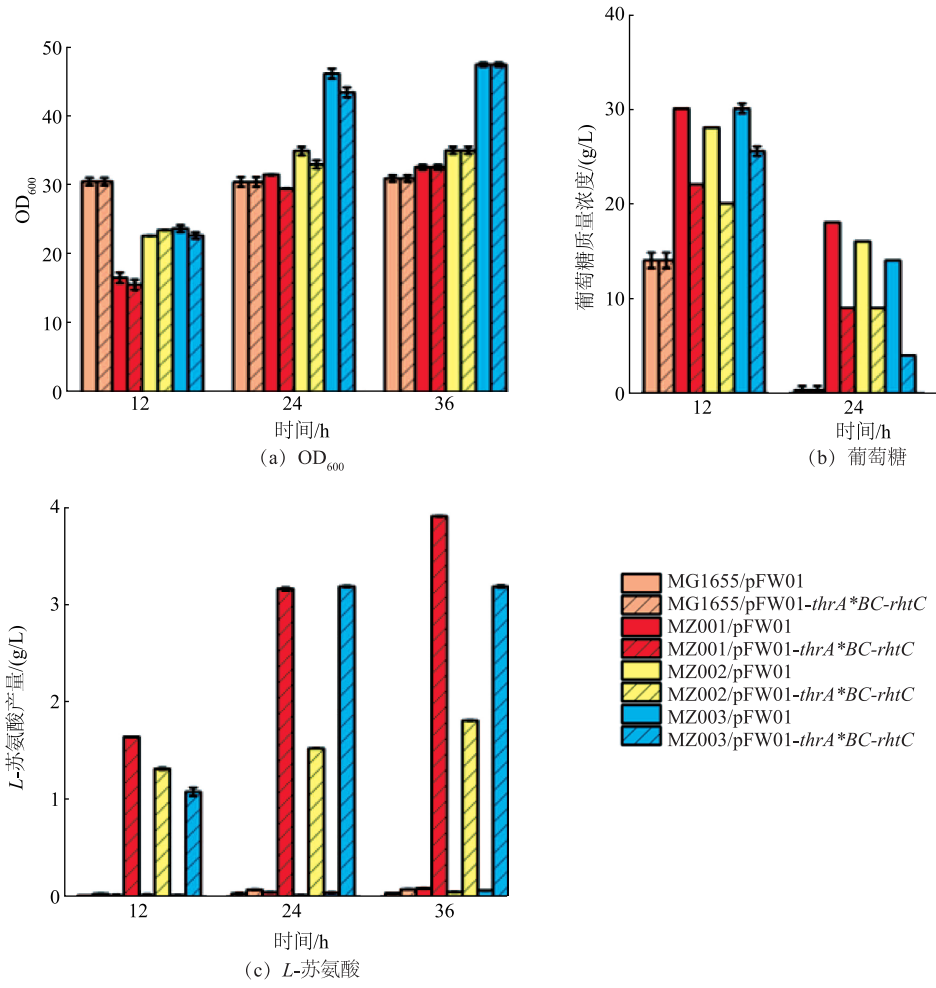


图 4　重组菌株的摇瓶发酵

Fig. 4　Flask fermentation of recombinant strains

MZ003/pFW01–*thrA***BC*–*rhtC* 发酵 36 h 时的 OD_{600} 分别达到 31.13,32.74,35.16 和 47.56。含空载表达质粒的重组菌株 MG1655/pFW01、MZ001/pFW01、MZ002/pFW01 和 MZ003/pFW01 生长情况分别与 MG1655/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC*、MZ001/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC*、MZ002/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC* 和 MZ003/pFW01–*thrA***BC*–*rhtC* 差不多。这些结果说明,单独敲除基因 *ptsP*、*ptsO* 或 *ptsN* 后,菌株发酵前期的生长速率减慢,但发酵后期生物量逐渐增大。

各重组菌株在发酵过程中消耗葡萄糖的情况见图 4 (b)。发酵 12 h 时,菌株 MG1655/pFW01–*thrA***BC* –*rhtC*、MZ001/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC*、MZ002/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC* 和 MZ003/pFW01 –*thrA***BC*–*rhtC* 的发酵液中剩余葡萄糖的质量浓度分别为 14、22、20、25.5 g/L。发酵 24 h 时,菌株 MG1655/pFW01–*thrA***BC*–*rhtC* 耗尽了发酵培养基中的葡萄糖,而 MZ001/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC*、MZ002/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC* 和 MZ003/pFW01 –*thrA***BC*–*rhtC* 的发酵液中剩余葡萄糖的质量浓度分别为 9,9 g/L 和 4 g/L。发酵 36 h 时,所有菌株均耗尽培养基中的葡萄糖。这些结果说明,单独敲除基因 *ptsP*、*ptsO* 或 *ptsN* 后,菌株消耗葡萄糖的速率减慢。含空载表达质粒 pFW01 的重组菌株消耗葡萄糖的速率比相应突变株含质粒 pFW01–*thrA***BC*–*rhtC* 的重组菌株慢,这说明过表达基因 *thrA**、*thrB*、*thrC* 和 *rhtC* 加快了突变菌株消耗葡萄糖的速率。

各重组菌株在发酵过程中生产苏氨酸的情况见图 4 (c)。发酵 36 h 时,对照菌株 MG1655/pFW01–*thrA***BC*–*rhtC* 的苏氨酸产量为 0.081 g/L;MZ001/pFW01 –*thrA***BC* –*rhtC*、MZ002/pFW01 –

*thrA*BC-rhtC* 和 MZ003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 的苏氨酸产量分别为 3.886、1.803、3.17 g/L,较对照菌株有明显提高。而含空载质粒的菌株苏氨酸的生产能力非常弱,发酵 36 h 时,菌株 MG1655/pFW01 的苏氨酸产量为 0.039 g/L,菌株 MZ001/pFW01、MZ002/pFW01、MZ003/pFW01 的苏氨酸产量分别为 0.088、0.052、0.068 g/L,较菌株 MG1655/pFW01 略有提高。这说明大肠杆菌 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的单缺失有利于增强其合成苏氨酸的能力。其中,缺失基因 *ptsP* 使 *L*-苏氨酸的产量增加得最多。

3 结 语

本研究利用 CRISPR-Cas9 系统分别敲除了大肠杆菌 MG1655 基因组中 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN*，构建了单基因缺失突变菌株 MZ001、MZ002 及 MZ003；以 MG1655 为对照，对 MZ001、MZ002 及 MZ003 进行生长曲线测定,发现分别单独敲除基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 后菌株培养前期生长迟缓,迟滞期延长,而后期快速生长,稳定期生物量大于对照菌株。重组质粒 pFW01-*thrA*BC-rhtC* 的转导使菌株具备了更强的苏氨酸合成能力,MZ001/pFW01 -*thrA*BC -rhtC*、MZ002/pFW01 -*thrA*BC -rhtC* 和 MZ003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 的苏氨酸产量较对照菌株 MG1655/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 有较明显提高，其中 MZ001/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 苏氨酸产量最高。说明大肠杆菌 PTS^{Ntr} 相关基因 *ptsP*、*ptsO* 和 *ptsN* 的缺失有利于增强其合成苏氨酸的能力,其中缺失基因 *ptsP* 增强苏氨酸合成能力的效果最明显，这对改造工业化生产菌株具有一定的启发意义。

参考文献:

[1] WANG J,CHENG L K,CHEN N. High-level production of *L*-threonine by recombinant *Escherichia coli* with combined feeding strategies[J]. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**,2014,28(3):495-501.

[2] LIU S,LIANG Y,LIU Q,et al. Development of a two-stage feeding strategy based on the kind and level of feeding nutrients for improving fed-batch production of *L*-threonine by *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(2):573-583.

[3] LEE K H,PARK J H,KIM T Y,et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for *L*-threonine production[J]. **Molecular Systems Biology**,2007,3:149-149.

[4] ZHAO H,FANG Y,WANG X Y,et al. Increasing *L*-threonine production in *Escherichia coli* by engineering the glyoxylate shunt and the *L*-threonine biosynthesis pathway[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2018,102(13):5505-5518.

[5] DONG X Y,QUINN P J,WANG X Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of *L*-threonine[J]. **Biotechnology Advances**,2011,29(1):11-23.

[6] LIVSHITS V A,ZAKATAEVA N P,ALESHIN V V,et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*[J]. **Research in Microbiology**,2003,154(2):123-135.

[7] DONG X,QUINN P J,WANG X. Microbial metabolic engineering for *L*-threonine production[J]. **Sub-Cellular Biochemistry**,2012,64:283-302.

[8] ZHAO L,LU Y,YANG J,et al. Expression regulation of multiple key genes to improve *L*-threonine in *Escherichia coli*[J]. **Microbial Cell Factories**,2020,19(1):1-23.

[9] YANG J,FANG Y,WANG J,et al. Deletion of regulator-encoding genes *fadR*,*fabR* and *iclR* to increase *L*-threonine production in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2019,103(11):4549-4564.

[10] FANG Y,WANG J,MA W,et al. Rebalancing microbial carbon distribution for *L*-threonine maximization using a thermal switch system[J]. **Metabolic Engineering**,2020,61:33-46.

[11] DING Z,FANG Y,ZHU L,et al. Deletion of *arcA*,*iclR*,and *tdcC* in *Escherichia coli* to improve *L*-threonine production[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,2019,66(5):794-807.

[12] PFLUGER-GRAU K,GORKE B. Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system[J]. **Trends in**

Microbiology，2010，18(5)：205-214.

[13] POSTMA P W，LENGELER J W，JACOBSON G R. Phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria [J]. **Microbiological Reviews**，1993，57(3)：543-594.

[14] GOSSET G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate：sugar phosphotransferase system[J]. **Microbial Cell Factories**，2005，4(1)：1-11.

[15] POWELL B S，COURT D L，INADA T，et al. Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*：Enzyme IIA^{Ntr} affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an erats mutant[J]. **Journal of Biological Chemistry**，1995，270(9)：4822-4839.

[16] 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.

[17] KOROS A，VARGA Z，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]. **Journal of Chromatography A**，2008，1203(2)：146-152.

[18] JAHN S，RIJSEWIJK B，SAUER U，et al. A role for EIIA（Ntr）in controlling fluxes in the central metabolism of *E. coli* K12[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)– Molecular Cell Research**，2013，1833(12)：2879-2889.

科　技　信　息

欧盟批准乳酸片球菌 CNCM I–4622 作为所有动物的饲料添加剂

据欧盟官方公报消息，欧洲食品安全局在其 2022 年 6 月 29 日的意见中得出结论，在建议的使用条件下，酸制皮球菌 CNCM I–4622 的制备对动物健康、消费者安全或环境没有不利影响。它是一种呼吸增敏剂，但对眼睛/皮肤没有刺激性，也不是皮肤增敏剂。管理局进一步得出结论，该制剂显示出降低液体饲料中 pH 值和大肠菌群生长的潜力。此外，还验证了根据法规(EC) No 1831/2003 设立的参考实验室提交的关于饲料中饲料添加剂分析方法的报告。

2023 年 1 月 5 日，欧盟委员会发布法规(EU)2023/53 号条例，根据欧洲议会和理事会法规(EC) No 1831/2003 第 5 条的规定，批准乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)CNCM I–4622 作为所有动物的饲料添加剂。根据附件中规定的条件，这种添加剂被授权作为动物添加剂的所属类别为“技术添加剂”，功能组别为“酸度调节剂”“卫生条件增强剂”。授权结束日期为 2033 年 1 月 24 日。

[信息来源]EUR–Lex home.Commission Implementing Regulation (EU) 2023/53 of 4 January 2023 concerning the authorisation of a preparation of Pediococcus acidilactici CNCM I–4622 as a feed additive for all animal species (Text with EEA relevance)[EB/OL]. (2023–1–4).https://eur–lex.europa.eu/legal–content/EN/ALL/?uri=uriserv:OJ.L_.2023.003.01.0008.01.ENG