

# 大肠杆菌 PTS 系统改造及重组菌生长性能测定

肖梦榕, 张梁, 刘双平, 石贵阳

江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

肖梦榕, 张梁, 刘双平, 等. 大肠杆菌 PTS 系统改造及重组菌生长性能测定. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1561-1572.  
Xiao MR, Zhang L, Liu SP, et al. Transformation of phosphotransferase system in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1561-1572.

**摘要:** 利用 Red 重组系统对野生大肠杆菌 *Escherichia coli* 磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统 (Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, PTS) 进行修饰改造, 敲除 PTS 系统中关键组分 E II CB<sup>Glc</sup> 的编码基因 (*ptsG*), 磷酸组氨酸搬运蛋白 HPr 的编码基因 (*ptsI*), 同时敲入来源于运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的葡萄糖易化体 (Glucose facilitator) 编码基因 (*glf*), 构建重组大肠杆菌, 比较测定并系统评价了基因敲除和敲入对细胞的生长、葡萄糖代谢和乙酸积累的影响。敲除基因 *ptsG* 和 *ptsI* 造成大肠杆菌 PTS 系统部分功能缺失, 细胞生长受到一定限制, 敲入 *glf* 基因后, 重组大肠杆菌能够利用 GIF-Glk (葡萄糖易化体-葡萄糖激酶) 途径, 消耗 ATP 将葡萄糖进行磷酸化并转运进入细胞。通过该途径转运葡萄糖能够提高葡萄糖利用效率, 降低副产物乙酸生成, 同时能够使更多的碳代谢流进入后续相关合成途径, 预期能够提高相关产物产量。

**关键词:** 大肠杆菌, 运动发酵单胞菌, PTS 系统, *glf*, Red 同源重组, 代谢工程, 发酵

**Received:** December 23, 2013; **Accepted:** February 10, 2014

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA021201), the Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-11-0665), Innovative Research Team of Jiangsu Province, the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (No. PADP), the Innovative Program for Graduate Student of Jiangsu Province (No. CXLX12\_0733), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUDCF12016).

**Corresponding author:** Guiyang Shi. Tel: +86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA021201), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-11-0665), 江苏高校优势学科建设工程项目 (No. PADP), 江苏省 2012 年度普通高校研究生科研创新计划项目 (No. CXLX12\_0733), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUDCF12016) 资助。

# Transformation of phosphotransferase system in *Escherichia coli*

Mengrong Xiao, Liang Zhang, Shuangping Liu, and Guiyang Shi

National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** We constructed several recombinant *Escherichia coli* strains to transform phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS system) and compared the characteristics of growth and metabolism of the mutants. We knocked-out the key genes *ptsI* and *ptsG* in PTS system by using Red homologous recombination in *E. coli* and meanwhile we also knocked-in the glucose facilitator gene *glf* from *Zymomonas mobilis* in the *E. coli* chromosome. Recombinant *E. coli* strains were constructed and the effects of cell growth, glucose consumption and acetic acid accumulation were also evaluated in all recombinant strains. The deletion of gene *ptsG* and *ptsI* inactivated some PTS system functions and inhibited the growth ability of the cell. Expressing the gene *glf* can help recombinant *E. coli* strains re-absorb the glucose through Glf-Glc (glucose facilitator-glucokinase) pathway as it can use ATP to phosphorylate glucose and transport into cell. This pathway can improve the availability of glucose and also reduce the accumulation of acetic acid; it can also broaden the carbon flux in the metabolism pathway.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, PTS system, *glf*, Red homologous recombination, metabolic engineering, fermentation

在大肠杆菌中, 葡萄糖的主要吸收形式是通过磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统 (Phosphoenolpyruvate :carbohydrate phosphotransferase system, 简称 PTS 系统)<sup>[1]</sup>以基团转移方式进行, 此系统参与细胞发酵过程中葡萄糖吸收、运输和磷酸化的过程, 消耗大量芳香族氨基酸合成前体物质磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 并导致乙酸生成, TCA 循环与糖酵解循环之间碳流分配不均衡, 副产物增多, 主产物产率降低, 菌体二次生长, 碳源利用效率低等不良后果<sup>[2]</sup>。PTS 系统由可溶性非底物特异性蛋白 E I (*ptsH* 编码)、磷酸组氨酸搬运蛋白 HPr (*ptsI* 编码) 和酶 II (E II s) 构成<sup>[3-4]</sup>。E I 可将来自 PEP 的磷酸基团依次传递给 HPr、E II s 和葡萄糖, 从而完成葡萄糖磷酸化转运。E II s 是一系列蛋白, 可以特异性识别和转运底物分子, 大肠杆菌染色

体中编码约有 20 种 E II s, 参与 20 多种不同碳水化合物的磷酸化转运, 其中 E II<sup>Glc</sup> 和 E II<sup>Man</sup> 主要参与葡萄糖的转运。E II<sup>Glc</sup> 主要由可溶性酶 E II A<sup>Glc</sup> (*crr* 编码), 以及膜透性酶 E II CB<sup>Glc</sup> (*ptsG* 编码) 构成<sup>[5]</sup>。研究表明<sup>[5-8]</sup> PTS 缺陷株能够有效减小葡萄糖转运速率, 平衡胞内糖酵解循环和三羧酸循环之间的碳流代谢, 进而减少乙酸分泌, 有利于高密度发酵。但同时发现 PTS 缺陷株生长受到限制, 延滞期较长, 不利于工业化生产。来源于运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中的葡萄糖易化体蛋白 Glf 是一种转运蛋白, 能够促进葡萄糖吸收<sup>[9-12]</sup>,  $K_m=4.1 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ 。Ren 等<sup>[13]</sup>研究显示表达 Glf 蛋白能够明显减弱碳代谢阻遏效应 (CCR), 提高碳源利用效率。Yi 等<sup>[14]</sup>通过在 PTS<sup>-</sup>菌株中表达插入 Glf 蛋白和葡萄糖激酶蛋白 Glk (*glk* 编码)的质粒, 改造后的

菌株产率能够达到与表达 GalP-Glk 途径的菌株相似的效果,可见,Glif 转运系统是一种较为有效的葡萄糖活性磷酸化转运系统,然而目前少有关于 Glif 系统的染色体水平整合表达的报道。本研究利用 Red 重组技术<sup>[15]</sup>构建了大肠杆菌 *ptsG*、*ptsI* 敲除菌,在敲除 *ptsI* 基因的同时在染色体上插入了 *glf* 基因,测定了重组菌的生长性能,为后续构建生产莽草酸及其他芳香族氨基酸工程菌株打下了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

*E. coli* W3110, *Zymomonas mobilis* (ATCC 31821) 和同源重组的协助质粒 pKD46 (温敏型复制子,带有氨苄青霉素抗性,阿拉伯糖诱导后表达  $\lambda$  噬菌体重组酶 Gam, Bet 和 Exo) 均为本实验室保藏;同源重组抗性打靶片段质粒 PKD13 和抗性消除质粒 pCP20 均购于美国耶鲁大学大肠杆菌菌株库 (CGSC, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA)<sup>[15]</sup>。重组菌株

*E. coli* G1、I1、I2 均为本研究中构建,各菌株及质粒见表 1。

#### 1.1.2 工具酶及试剂

实验中各种 DNA 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、Rnase 均为 Fermentas 公司产品;氨苄青霉素 (Amp)、氯霉素 (Cm)、卡那霉素 (Kan) 购自上海生物工程技术有限公司;L-阿拉伯糖购自 Sigma-Aldrich 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司;pMD18-T Vector 购自宝生物工程有限公司;Q5 高保真聚合酶购自 NEB (北京) 有限公司;酵母粉、蛋白胨购自 OXOID 公司;本研究中使用的试剂盒:质粒 DNA 小量提取试剂盒、纯化试剂盒、胶回收试剂盒都来自北京博大泰克生物基因技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.3 培养基及培养条件

普通大肠杆菌培养采用 LB 液体培养基 (L): 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g NaCl, 重组大肠杆菌构建过程中均采用 SOB 液体培养基 (L): 20 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 0.5 g NaCl, 0.186 g KCl, 0.95 g MgCl<sub>2</sub>, 固体培养基需另加 1.5% 的琼脂粉。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources or reference
Strains		
<i>E. coli</i> W3110	Wild type	This Lab
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4	ATCC 31821	This Lab
<i>E. coli</i> G1	W3110 ( $\Delta ptsG$ )	This research
<i>E. coli</i> I1	W3110 ( $\Delta ptsI$ )	This research
<i>E. coli</i> I2	W3110 ( $\Delta ptsI::glf$ )	This research
Plasmid		
PKD46	$\gamma$ $\beta$ <i>exo</i> (Red recombinase), temperature-conditional replicon	This Lab
PKD13	Amp and Kan markers	[15]
pCP20	Amp and Cm markers, helper plasmid	[15]

培养运动发酵单胞菌采用 T 培养基 (L) : 20 g 葡萄糖, 10 g 酵母粉, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 28 °C 静置, 厌氧培养。

重组大肠杆菌发酵实验使用 FM 培养基 (L) : 3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g NaCl, 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 另添加微量元素 [ $\mu\text{mol/L}$ ]:  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  8.88,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.26,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.88,  $\text{ZnCl}_2$  2.20,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.24,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.21,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2.5]。并根据需要加入适量葡萄糖。发酵实验初始值为 50 g/L。为了防止培养过程中菌体产酸影响菌体生长, 在摇瓶培养过程中添加 10 g/L 碳酸钙 (发酵罐中培养使用氨水)以中和 pH<sup>[16]</sup>。

氨苄青霉素、氯霉素和卡那霉素在培养基

中的工作浓度分别为 100  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  和 50  $\mu\text{g/mL}$ , 大肠杆菌的培养温度如无特殊说明均指 37 °C。

#### 1.1.4 引物

本实验中所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体序列见表 2。

## 1.2 方法

### 1.2.1 运动发酵单胞菌基因组 DNA 提取

具体方法参见文献[17]。

### 1.2.2 *glf* 基因的克隆

以运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 的 *glf* 基因 (GenBank Accession No. ATCC 31281) 为模板设计引物 IF1 和 IF2 (表 2), 其中下划线为 *ptsI* 基因上下游同源臂。

表 2 本研究中所用引物

Table 2 Primers used in this research

Primers	Sequence (5'-3')	Size (bp)
G1	<u>TTTAAGAATGCATTTGCTAACCTGCAAAAGGTCGGTAAATCGCTGATGCTATTC</u> CGGGGATCCGTCG	67
G2	<u>TTAGTGGTTACGGATGTACTCATCCATCTCGGTTTTTCAGGTTATCGGATTTGTAG</u> GCTGGAGCTGCTTCG	70
YG1	ATTCCGGGGATCCGTCG	17
YG2	TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	20
I1	<u>ATGATTTTCAGGCATTTTAGCATCCCCGGGTATCGCTTTCGGTAAAGCTCTATTCC</u> GGGGATCCGTCG	69
I2	<u>TTAGCAGATTGTTTTTCTTCAATGAACCTGTTAACCAGCGTCATTAACCTGTAG</u> GCTGGAGCTGCTTCG	70
YI1	GTAAACTGATGGCGGAACT	20
YI2	CAGTTTATCGAACAAACCCA	20
IF1	<u>GAGTAATTTCCCGGGTCTTTTTAAAAATCAGTCACAAGTAAGGTAGGGTTATGA</u> GTTCTGAAAGTAGTC	69
IF2	CGACGGATCCCCGGAATGTCCGCCCGCTTATAC	34
Kan11	GTATAAAGCGGGCGGACATTCCGGGGATCCGTCG	34
Kan12	<u>TTAGCAGATTGTTTTTCTTCAATGAACCTGTTAACCAGCGTCATTAACCTGTAG</u> GCTGGAGCTGCTTCG	70

The underlined part is the homologous sequence of underknock-out gene.

以运动发酵单胞菌的染色体为模板,以 IF1、IF2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: ddH<sub>2</sub>O 38.5 μL, 10×Ex Taq 缓冲液 5 μL, dNTPs 4 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL, Ex Taq 酶 0.5 μL。PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环后 72 °C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳进行结果分析, PCR 产物纯化后连接 pMD18 T-Vector 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆。挑取阳性克隆接种至氨苄青霉素抗性 LB 培养基中, 提质粒用 Hind III 和 EcoR I 酶切验证。将验证正确的克隆子送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

### 1.2.3 PCR 打靶片段的制备

以 PKD13 质粒为模板, 以打靶基因上下游同源臂为引物, Q5 高保真聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: ddH<sub>2</sub>O 33.5 μL, 5×Q5 缓冲液 10 μL, dNTPs 4 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL, Q5 高保真聚合酶 0.5 μL。PCR 扩增条件为: 98 °C 预变性 30 s, 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环后 72 °C 延伸 2 min。琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物胶回收并纯化。

### 1.2.4 目的基因的敲除、抗性片段的丢失及阳性转化子鉴定

目的基因的敲除: 首先制备带有辅助质粒 PKD46 的大肠杆菌电转化感受态细胞, 将 10 μL 打靶片段与 100 μL 感受态细胞混匀, 冰浴后转移至预冷的 1 mm 电转杯中, 1 800 V 电击转化, 立即加入 1 mL SOB 培养基, 30 °C 培养 2–4 h 后涂布 Kan 抗性平板。

抗性片段丢失: 敲除菌阳性菌落在抗性平

板划线分离纯化后再次制备电转化感受态细胞, 以相同的方法电击转化入辅助质粒 pCP20, 涂布 Cm 抗性平板。

阳性转化子的鉴定: 在抗性平板上筛选阳性转化子, 以验证引物进行 PCR 鉴定是否正确; 划线分离纯化验证正确的阳性菌落, 37 °C 下传代丢失温敏辅助质粒。

### 1.2.5 菌体生长曲线

分别挑取重组菌 *E. coli* G1、I1、I2 的单菌落于 5 mL LB, 37 °C、200 r/min 培养过夜后取等量菌体转接至 70 mL FM 培养基, 37 °C、200 r/min 继续培养, 定时测定 600 nm 下菌体密度, 同时保留部分样品以测定发酵液中葡萄糖浓度及乙酸含量。

### 1.2.6 重组大肠杆菌在发酵罐中的发酵实验

将重组菌株接种于 SOB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 8 h, 收集适量菌体, 以 LB 培养基重悬后在 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 作为发酵罐的种子液。发酵罐装液量为 6 L, 接种量为 5%, 初始葡萄糖浓度 50 g/L。初始通气量为 1 L/min, 搅拌转速为 200 r/min, 菌体生长过程中适时调节空气流量 (1–7 L/min) 和搅拌转速 (200–1 000 r/min) 使得溶解氧浓度大于 30%, 以 10% (V/V) 硫酸溶液和氨水控制 pH 值为 7, 37 °C 恒温发酵 60 h。

### 1.2.7 葡萄糖含量和乙酸含量的测定

发酵液中葡萄糖浓度检测采用生物传感仪 SBA-40C (山东省微生物研究所研制), 发酵液中乙酸浓度采用 HPLC 检测, 泵为 SHIMADAZU LC-10AT, 进样器为 Dionex UltiMate Autosampler 3000, 色谱柱为 Shodex SH1011 示差检测器 Shodex RI101 流动相为 0.01 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 流速 0.8 mL/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的敲除

将打靶片段按电击转化方法敲除目的片段,通过 PCR 鉴定阳性转化子。其中 *E. coli* G1 鉴定引物为 YG1/YG2, *E. coli* I 1 的鉴定引物为 YI1/YI2。经 PCR 验证 (图 1), 用 YG1/YG2 扩增, 出发菌株获得 1 700 bp 大小的电泳图谱; 转化子 G1' ( $\Delta ptsG::kan$ ) 获得 1 600 bp 左右的电泳图谱; 其抗生素抗性基因丢失后, 转化子 G1 获得 650 bp 大小电泳图谱。即菌株 G1 的 *ptsG* 基因已经被成功敲除。利用相似的策略进行敲除 *ptsI* 基因的验证。以引物 YI1/YI2 扩增, 出发菌株获得 1 700 bp 大小的电泳图谱 (图 2); 转

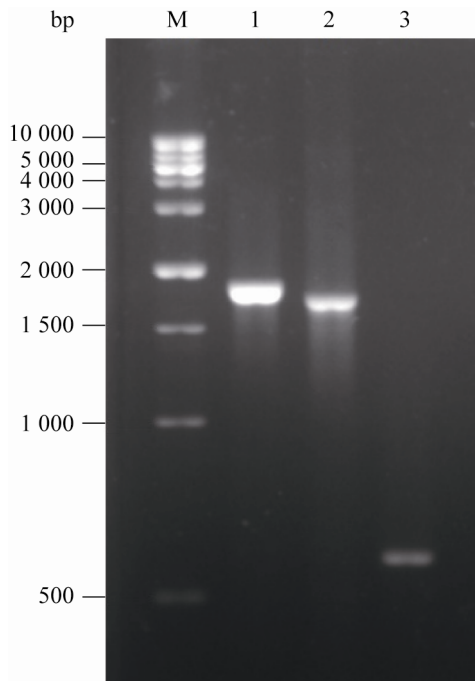


图 1 *ptsG* 基因缺失菌株的 PCR 鉴定电泳图谱  
Fig. 1 PCR identification of *ptsG* knockout mutant.  
M: 1 kb ladder marker; 1: W3110 PCR product; 2: G1' ( $\Delta ptsG::kan$ ) PCR product; 3: G1 ( $\Delta ptsG$ ) PCR product.

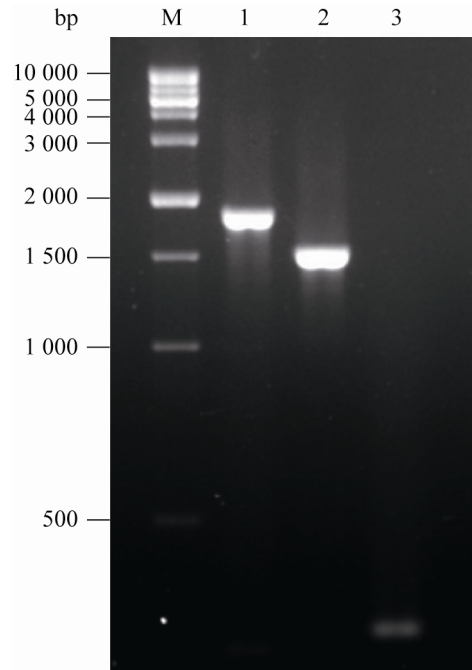


图 2 *ptsI* 基因缺失菌株的 PCR 鉴定电泳图谱  
Fig. 2 PCR identification of *ptsI* knockout mutant.  
M: 1 kb ladder marker; 1: W3110 PCR product; 2: I1' ( $\Delta ptsI::kan$ ) PCR product; 3: I1 ( $\Delta ptsI$ ) PCR product.

化子 I 1' ( $\Delta ptsI::kan$ ) PCR 扩增后电泳大小约为 1 400 bp; 经 FRT 重组而删除卡那霉素基因的转化子 I 1 电泳图谱大小为 200 bp。表明菌株 I 1 的 *ptsI* 基因已被成功敲除。通过上海生工生物工程公司测序确认, 成功敲除了 *ptsG* 和 *ptsI* 基因, 获得 *E. coli* G1、I 1 两株重组大肠杆菌。

### 2.2 外源基因在染色体上的整合表达

按图 3 制备打靶片段 *ptsI'::kan-glf*, 为了最大限度降低外源基因染色体水平表达对原始菌株可能造成的影响, 本研究并未对 *glf* 基因的启动子和 ORF 进行添加或删除的改动, 仅从 *ptsI* 基因的起始密码子 ATG 开始, 完全替换为 *glf* 基因, 即 *glf* 基因完全利用 *ptsI* 基因所使用的启动子、ORF 及核糖结合位点。通过电击转化敲除目的片段并在染色体上插入外源基因, PCR

鉴定阳性转化子。*E. coli* I2 鉴定引物为 YI1/YI2。经 PCR 验证 (图 4), 用 YI1/YI2 扩增, 出发菌株获得 1 800 bp 大小的电泳图谱; 转化子 I2' ( $\Delta ptsI::glf::kan$ ) 获得 3 000 bp 左右的电泳图谱; 删除卡那霉素筛选标记基因后, 筛选得到阳性

克隆 I2 经 PCR 扩增电泳图谱大小约为 1 600 bp。结果表明菌株 I2 的 *ptsI* 基因已被成功替换为 *glf* 基因。通过上海生工生物工程公司测序确认, 成功将 *ptsI* 基因替换为 *glf* 基因, 获得 *E. coli* I2 重组大肠杆菌。

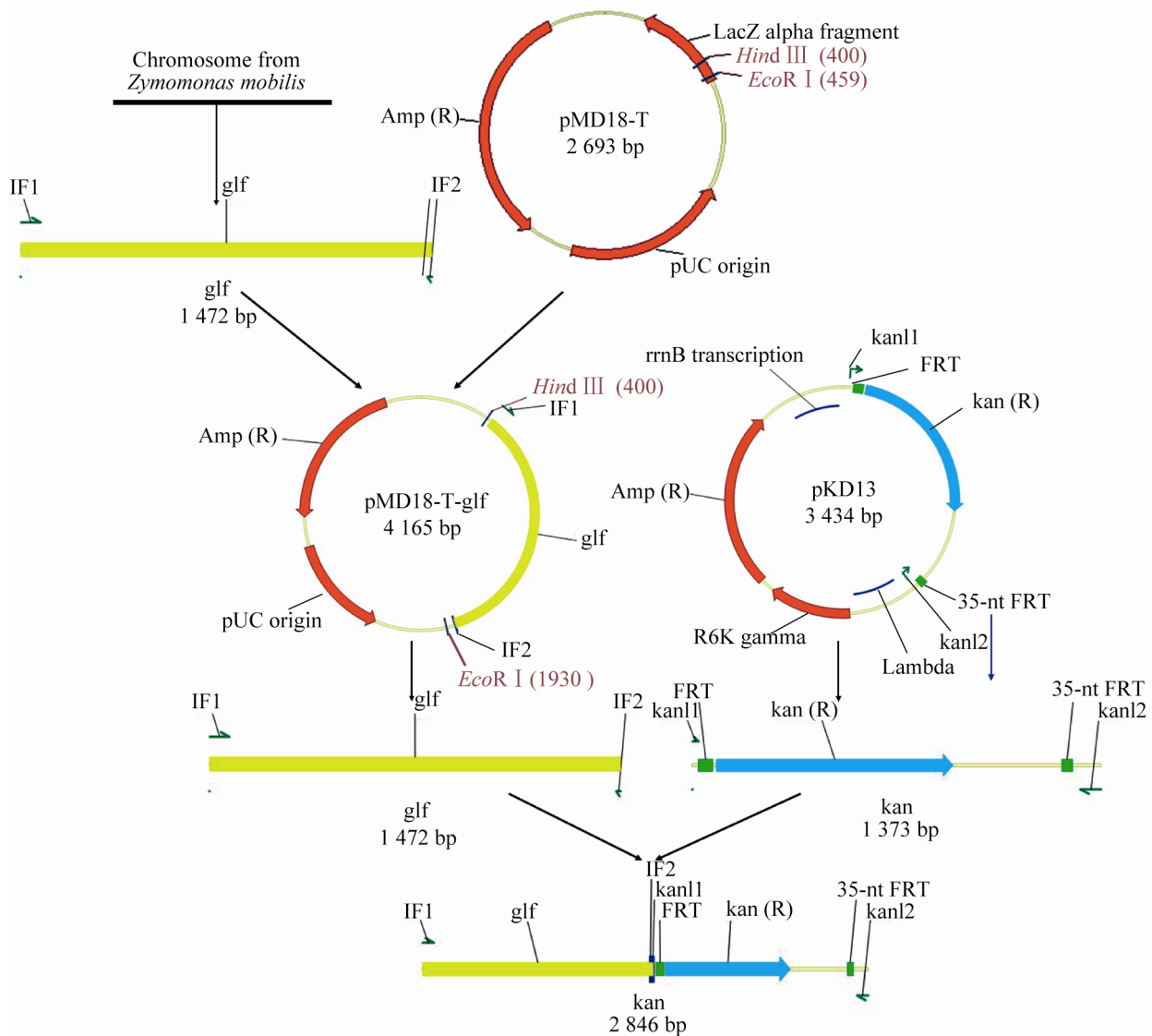


图 3 同源重组打靶片段 *ptsI::kan-glf* 的制备

Fig. 3 Construction of *ptsI::kan-glf* used for homologous recombination.

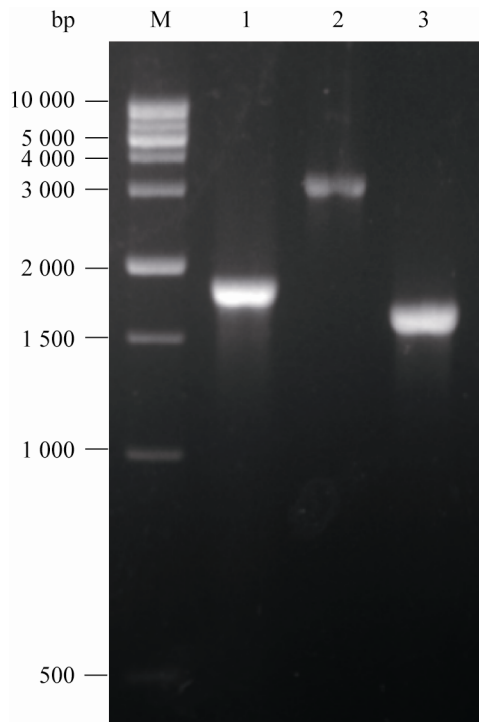


图 4 缺失 *ptsI* 基因同时插入 *glf* 基因菌株的 PCR 鉴定电泳图谱

Fig. 4 PCR identification of *ptsI* knock-out and *glf* knock-in mutant. M: 1 kb ladder marker; 1: W3110 PCR product; 2: I2' ( $\Delta ptsI::glf::kan$ ) PCR product; 3: I2 ( $\Delta ptsI::glf$ ) PCR product.

## 2.3 *E. coli* W3110、G1、I1 及 I2 生长代谢特征比较

### 2.3.1 FM 发酵培养基中生长性能

从图 5 可以看出, 在 FM 发酵培养基中, G1 重组大肠杆菌比生长速率为  $0.37 \text{ g}/(\text{h}\cdot\text{L})$ , 与 W3110 ( $0.42 \text{ g}/(\text{h}\cdot\text{L})$ ) 相近, 最终生物量 ( $2.74 \text{ g/L}$ ) 略高于 W3110 ( $2.34 \text{ g/L}$ ); 而 I1 重组大肠杆菌的延滞期较长, 前期生长缓慢, 最高生长速率仅为  $0.34 \text{ g}/(\text{h}\cdot\text{L})$  (表 3), 低于 W3110。但发酵后期生长显著加快, 对数生长期延长, 发酵结束时生物量达到  $3.48 \text{ g/L}$ , 约为 W3110 的 1.5 倍, 表明 I1 具有高密度发酵优势。将 I1 进一步进行分子

改造, 插入外源基因 *glf*, 在 FM 培养基中测定重组菌的生长性能。经过分子手段改造之后, I2 重组菌生长性能较 I1 重组菌明显提高, 改善了 I1 前期生长缓慢的缺陷, 最高生长速率可达  $0.63 \text{ g}/(\text{h}\cdot\text{L})$ ; 同时保留了 I2 生长对数期较长和可进行高密度发酵的优势, 发酵结束菌体生物量可达  $4.68 \text{ g/L}$ , 约为 I1 的 1.3 倍。显然, 通过在染色体组上插入 *glf* 基因能够显著改善敲除菌的生长缺陷, 具有高密度发酵的优势。

为进一步探讨重组菌的高密度发酵性能, 对重组菌进行了发酵罐放大实验 (图 6), 生长曲线与摇瓶结果基本符合。重组菌 *E. coli* I2 最高生物量可达  $17.40 \text{ g/L}$  ( $OD_{600}=45.8$ ), 为野生型大肠杆菌 ( $OD_{600}=25.1$ ) 的 1.82 倍, 充分说明了重组菌在生长方面具有的显著优势。

### 2.3.2 FM 培养基中重组菌生长代谢特征

为了较为准确地测定重组菌利用葡萄糖的能力, 本研究中采用 FM 发酵培养基以消除其

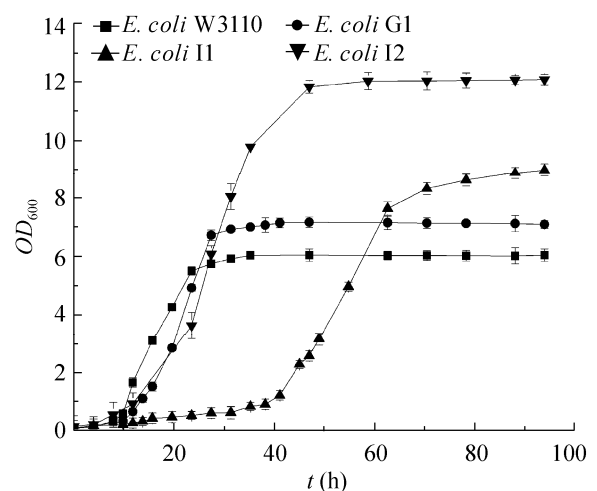


图 5 重组大肠杆菌 *E. coli* W3110、G1、I1、I2 在摇瓶中的生长情况

Fig. 5 The growth curve of recombinant strains *E. coli* W3110 and its mutants G1, I1, I2.



表 3 摇瓶发酵参数比较

Table 3 Comparison of parameters in shake-flask experiments

Strains	Biomass (g/L)	Maximum specific growth rate (g/(h·L))	Consumption of glucose (g/L)	Concentration of acetic acid (g/L)	Specific consumption rate of glucose (g/(h·L))
W3110	2.34±0.21	0.42±0.01	16.52±1.75	6.49±0.65	7.06
G1	2.74±0.13	0.37±0.00	15.46±1.38	5.74±0.51	5.64
I1	3.48±0.22	0.34±0.01	14.07±1.52	3.61±0.26	4.04
I2	4.68±0.19	0.63±0.00	21.99±1.14	1.74±0.18	4.69

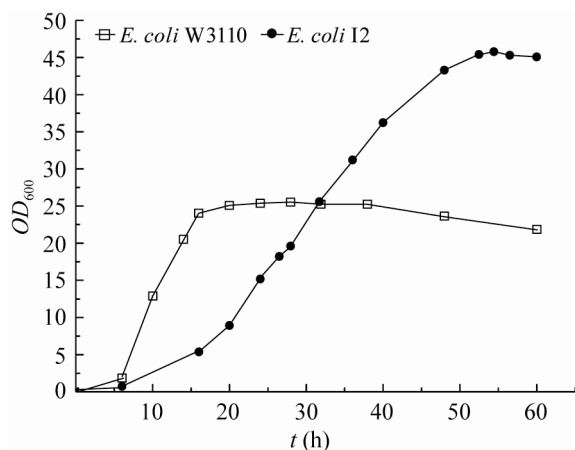
图 6 重组大肠杆菌 *E. coli* W3110、I2 在 6 L 发酵罐中的生长情况

Fig. 6 The growth curve of recombinant strains *E. coli* W3110 and its mutants I2 in a 6 L bioreactor.

他碳源物质对菌体生长的影响，初始添加葡萄糖为 50 g/L。测得葡萄糖消耗曲线及乙酸生成曲线如图 7 所示。通过相关公式<sup>[18]</sup>计算得出表 3 中数据，其中消耗葡萄糖量分别为 I2>W3110>G1>I1，葡萄糖比消耗速率分别为 W3110>G1>I2>I1。表明 *ptsI* 基因的敲除对大肠杆菌吸收利用葡萄糖影响较大，而重新插入外源基因 *glf* 后重组菌吸收葡萄糖能力又得到恢复。此结果在发酵罐中也得到了进一步验证，在发酵罐中，葡萄糖消耗量为 I2 (103.2 g)>W3110 (75.4 g)，葡萄糖比消耗速率为 W3110 (7.03 g/(h·L))>I2 (4.75 g/(h·L))。

同时，本研究还考察了各重组菌株的乙酸生成情况。结果显示，发酵培养结束时，乙酸产量 W3110>G1>I1>I2，在发酵罐中经过验证结果相符，重组菌 I2 在整个发酵过程中消耗氨水为 687 g，而 W3110 消耗氨水达 1 156 g，是重组菌的近 1.7 倍。可以看到，改造 PTS 系统后重组菌产酸水平大幅度下降，而 *Glf* 蛋白在恢复菌体葡萄糖利用能力的同时并未造成乙酸的大量生成，有利于重组菌进行高密度发酵。

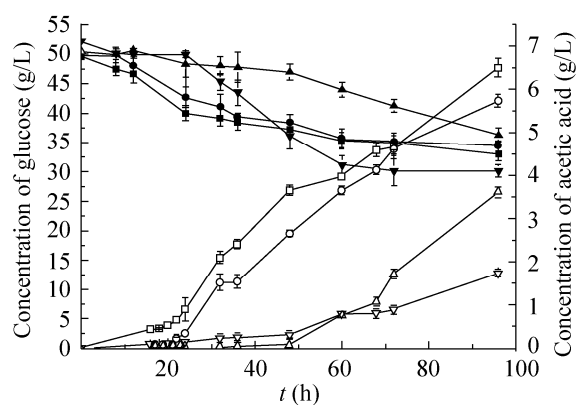
图 7 重组大肠杆菌 *E. coli* W3110、G1、I1、I2 在摇瓶中的生长代谢情况

Fig. 7 Acetic acid production and glucose consumption of strains *E. coli* W3110 and its mutants G1, I1, I2. ■, □: *E. coli* W3110; ●, ○: *E. coli* G1; ▲, △: *E. coli* I1; ▼, ▽: *E. coli* I2. Solid shape: consumption curve of glucose; Hollow shape: accumulation curve of acetic acid.

### 3 讨论

本研究利用 Red 重组技术删除了大肠杆菌中 PTS 系统关键组分 EII<sup>CB<sup>Glc</sup></sup> 的编码基因 (*ptsG*) 和磷酸组氨酸搬运蛋白 HPr 的编码基因 (*ptsI*)。通过摇瓶发酵,并在 6 L 发酵罐中进行了重组菌的进一步验证,结果表明:*ptsG* 和 *ptsI* 基因的删除均能够对大肠杆菌的生长产生影响。删除了 PTS 系统相关基因的重组菌株对葡萄糖的吸收速率降低,从而降低菌体生长速率,代谢产物乙酸生成减少,其中 *ptsI* 基因删除后效果更为显著。同时,PTS 系统的部分失活能够解除分解物代谢阻遏效应,使菌株生长能够获得更高的菌密度。相比  $\Delta ptsG$  重组菌 G1,  $\Delta ptsI$  重组菌 I1 彻底阻断了葡萄糖进入细胞的转运途径,通过半乳糖透性酶 (GalP) 介导的活性转运系统磷酸化转运葡萄糖至胞内<sup>[19-21]</sup>,不消耗 PEP,增加了产物合成前体,提高底物利用效率,有利于进一步构建高效合成芳香族氨基酸工程菌。但由于 GalP 转运系统诱导发生作用需要 H<sup>+</sup> 协同参与等一系列条件<sup>[19-21]</sup>,使得  $\Delta ptsI$  重组菌 I1 生长能力受到限制,生长缓慢,延滞期较长,并不适合工业化应用。

由于重组菌 G1 仍然能够利用 PTS 途径中的 EII<sup>Man</sup> 等运输体转运葡萄糖<sup>[22]</sup>,并利用 PEP 提供磷酸基团对其磷酸化,降低胞内 PEP 水平,故在生长特性等方面与原始菌株并无显著差异,因此不再进行进一步改造。本研究在 *E. coli* W3110 染色体上敲除 *ptsI* 基因的同时整合表达了来源于运动发酵单胞菌 *Zyomonas Mobilis* 的 Glf 蛋白,构建了重组菌 I2。该重组菌葡萄糖利用效果显著,表现出多种优于 I1 的生长优势。这是因为 *glf* 基因表达的葡萄糖易化体 Glf 同 GalP 类似,也是一种转运蛋白,能够促进葡萄

糖吸收,但其与 GalP 蛋白相比不需要过多限制条件,减轻了膜孔蛋白向胞内运输的压力,是一种较为有效的葡萄糖活性磷酸化转运系统。通过整合表达 *glf* 基因,重组菌 I2 能够通过 Glf-glk (葡萄糖易化体-葡萄糖激酶) 途径,利用 ATP 将葡萄糖进行磷酸化并转运进入细胞。本研究结果表明 Glf 蛋白能够在染色体上成功表达并介导葡萄糖的磷酸化转运,显著改善了 PTS 缺陷型菌株的生长劣势。Glf 系统相比较 PTS 系统减少了莽草酸合成途径中重要前体磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的损失,降低了副产物乙酸的生成,使 TCA 循环与糖酵解循环之间碳流分配趋向平衡,菌体恢复生长能力,从而实现菌体的高密度发酵。研究显示<sup>[9-12]</sup>Glf 蛋白能够显著减弱代谢阻遏效应,激活多个基因更有效利用复合培养基水解产物维持菌体生长,提高碳源的利用率,与本文结果一致。但是也有文献报道<sup>[14]</sup>,Glf 蛋白虽然与 GalP 蛋白转运效率相似,但从动力学参数显示 Glf 所需的葡萄糖底物浓度较高,由此也说明在进一步改造获得发酵产物过程中需要对底物浓度进行控制。

Chandran 等<sup>[23]</sup>通过不同质粒分别表达 Glf 和 Glk 蛋白使 PTS<sup>-</sup>宿主菌重新获得吸收葡萄糖的能力,结果显示,未表达 Glf 蛋白的 PTS 型大肠杆菌莽草酸产率低于同时表达 Glf 和 Glk 蛋白的菌株,可见 Glf 和 Glk 蛋白协同作用能够对葡萄糖的吸收起到促进效果。进一步研究结果显示,删除了大肠杆菌 PTS 系统关键操纵子 (*ptsH-I-crr*) 后的菌株表现出了极高的莽草酸产率 (27%) 和较低副产物水平,在添加 15 g/L 酵母提取物的 10 L 罐中效果更为显著。由此可见,游离表达 Glf 蛋白能够促进甚至完全替代 PTS 系统的功能,经过改造后的大肠杆菌重组菌在

莽草酸生产应用方面具有显著优势,此研究更进一步提示我们可以将 Glf 蛋白结合到大肠杆菌染色体上,以提高菌株的遗传稳定性。

Tang 等<sup>[24]</sup>在大肠杆菌 ATCC 8739 PTS<sup>-</sup>菌株染色体上整合表达了 Glf 和 Glk 蛋白,考察了其在厌氧条件下的细胞生长和葡萄糖利用性能,并与 GalP 转运系统进行了比较。结果表明表达 Glf 蛋白菌株的葡萄糖消耗速率为 0.7 g/(h·L),高于 GalP 转运系统 30%,而同时表达 Glf 和 Glk 蛋白的重组菌葡萄糖消耗速率可达 2.13 g/(h·L),对本研究后续进一步修饰改造提供了思路,研究同时也指出 Glf 转运系统在生产以 PEP 为前体的产物如琥珀酸等具有显著优势。

目前对于 PTS 系统改造主要针对于表达大肠杆菌的 GalP 系统<sup>[8,23,25-26]</sup>,Glf 蛋白多见于游离表达,而整合表达具有稳定遗传,避免抗生素的使用等优点,但目前相关报道较少。本研究利用改造大肠杆菌中的 PTS 系统为基础,在染色体上整合表达 Glf 蛋白能够构建高密度发酵重组菌,重组菌具有葡萄糖利用率高,菌体最终生物量高,副产物乙酸产量少等优势,是一株具有较高改造价值的优势菌株,但仍存在延滞期较长等缺点,同时限于培养基条件,重组菌的生长还有一定的上升空间,有待进一步对培养基以及培养条件等进行优化探究。我们将对该菌株进行进一步基因改造和完善,调控 Glf 蛋白的表达以改善菌体生长行为,进一步优化发酵培养基,以缩短重组菌延滞时间,提高生物量累积,为以后构建高效合成芳香族氨基酸工程菌打下基础。

## REFERENCES

- [1] Matsuoka Y, Shimizu K. Importance of understanding the main metabolic regulation in response to the specific pathway mutation for metabolic engineering of *Escherichia coli*. *Comp Struct Biotechnol J*, 2013, 3(4): e201210018.
- [2] Xiao MR, Zhang L, Shi GY. Improvements of shikimic acid production in *Escherichia coli* with ideal metabolic modification in biosynthetic pathway. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 1: 002 (in Chinese).  
肖梦榕, 张梁, 石贵阳. 改进莽草酸合成代谢的大肠杆菌工程化研究新进展. *微生物学报*, 2014, 1: 002.
- [3] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact*, 2005, 4(1): 14.
- [4] Escalante A, Cervantes AS, Gosset G, et al. Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94(6): 1483-1494.
- [5] Gabor E, Göhler AK, 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. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(9): 711-720.
- [6] Flores S, Gosset G, Flores N, et al. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by (13) C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 124.
- [7] De Anda R, Lara AR, Hernández V, et al. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng*, 2006, 8(3): 281-290.
- [8] Wang Q, Wu C, Chen T, et al. Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(2): 89-93.
- [9] Snoep JL, Arfman N, Yomano LP, et al. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis*

- genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J Bacteriol*, 1994, 176(7): 2133–2135.
- [10] Weisser P, Krämer R, Sahm H, et al. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J Bacteriol*, 1995, 177(11): 3351–3354.
- [11] Parker C, Barnell WO, Snoep JL, et al. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol Microbiol*, 1995, 15(5): 795–802.
- [12] Siedler S, Bringer S, Blank LM, et al. Engineering yield and rate of reductive biotransformation in *Escherichia coli* by partial cyclization of the pentose phosphate pathway and PTS-independent glucose transport. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(4): 1459–1467.
- [13] Ren C, Chen T, Zhang J, et al. An evolved xylose transporter from *Zymomonas mobilis* enhances sugar transport in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2009, 8(66): 1–9.
- [14] Yi J, Draths KM, Li K, et al. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(5): 1450–1459.
- [15] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2006, 2(1): 1–11.
- [16] Liu SP, Xiao MR, Zhang L, et al. Production of L-phenylalanine from glucose by metabolic engineering of wild type *Escherichia coli* W3110. *Process Biochem*, 2013, 48(3): 413–419.
- [17] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 2–137.  
Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 2–137.
- [18] Qi YZ, Wang SX. *Biochemical Reaction Kinetics and Bioreactor*. 3rd Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 8–40 (in Chinese).
- 戚以政, 汪叔雄. *生物反应动力学与反应器*. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2007: 8–40.
- [19] Martínez K, de Anda R, Hernández G, et al. Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact*, 2008, 7(1): 1–12.
- [20] Lu J, Tang J, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455–2462.
- [21] Hernández - Montalvo V, Martínez A, Hernández - Chavez G, et al. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(6): 687–694.
- [22] Zou YK, Zhou JZ, Sun X, et al. Construction of shikimic acid-producing engineered *Escherichia coli* strains based on *ptsHIcrr* mutants. *Microbiol China*, 2011, 38(8): 1186–1192 (in Chinese).  
邹永康, 周军智, 孙旭, 等. 基于 PTS 缺陷型大肠杆菌构建莽草酸生产菌. *微生物学通报*, 2011, 38(8): 1186–1192.
- [23] Chandran SS, Yi J, Draths KM, et al. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(3): 808814.
- [24] Tang J, Zhu X, Lu J, et al. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013: 1–8.
- [25] Escalante A, Calderón R, Valdivia A, et al. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact*, 2010, 9(1): 21.
- [26] Li MM, Chen XZ, Zhou L, et al. Rational design and construction of an overproducing shikimic acid *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Chin J Biotech*, 2013, 29(1): 56–67 (in Chinese).  
李明明, 陈献忠, 周丽, 等. 理性设计和构建过量合成莽草酸的大肠杆菌代谢工程菌. *生物工程学报*, 2013, 29(1): 56–67.

(本文责编 郝丽芳)