

• 生物育种与工艺优化 •

大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统改造对产L-色氨酸的影响

吴涛, 赵津津, 毛贤军

梅花生物科技集团股份有限公司 廊坊梅花生物技术开发有限公司, 河北 廊坊 065001

吴涛, 赵津津, 毛贤军. 大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统改造对产L-色氨酸的影响. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1877-1882.

Wu T, Zhao JJ, Mao XJ. Effect of PTS modifications on L-tryptophan production in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2017, 33(11): 1877-1882.

摘要: L-色氨酸是芳香族氨基酸的一种, 被广泛应用于医药、食品和饲料等领域。大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统 (PTS 系统) 在葡萄糖转运和磷酸化过程中起重要作用, 是糖代谢基因表达调控的核心。利用 Red 同源重组系统, 构建包含两类典型 PTS 系统突变 (*ptsHlcr^r glf-gl^k* 和 *ptsG*) 的 L-色氨酸生产菌, 并对相关菌株进行补料分批发酵研究。结果表明, 不同类型 PTS 系统突变对菌体生长、L-色氨酸产量、糖酸转化率及副产物生成均有较大影响。与出发菌相比, *ptsHlcr^r glf-gl^k* 突变株最高 OD_{600} 达到 125, 提高 47.0%, 产酸 38.5 g/L, 提高 25.9%, 糖酸转化率 16.7%, 提高 26.5%, 乙酸生成略有增加; *ptsG* 突变株最高 OD_{600} 达到 100, 提高 17.6%, 产酸 33.4 g/L, 提高 9.4%, 糖酸转化率 15.5%, 提高 17.4%, 乙酸生成略有减少。对葡萄糖转运系统的进一步研究将为大肠杆菌合成 L-色氨酸效率的提升提供帮助。

关键词: 大肠杆菌, L-色氨酸, PTS 系统, 补料分批发酵

Effect of PTS modifications on L-tryptophan production in *Escherichia coli*

Tao Wu, Jinjin Zhao, and Xianjun Mao

Meihua Biotech (Langfang) Co., Ltd., Meihua Holdings Group, Langfang 065001, Hebei, China

Abstract: L-tryptophan, one of the aromatic amino acids, is widely used in the fields of medicine, food and feed additives. The phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) plays an important role in glucose transport and phosphorylation in *Escherichia coli*. PTS-mediated regulation dominates the carbohydrates' uptake and metabolism in *E. coli*. We constructed L-tryptophan-producing bacteria containing two typical PTS mutations (*ptsHlcr^r glf-gl^k* and *ptsG*) by Red homologous recombination system, and studied in 50 L jar fermenter using fed-batch fermentation. Both PTS system mutants had a great impact on the biomass (increasing 47.0% and 17.6%, respectively), L-tryptophan production (increasing 25.9% and 9.4%, respectively), glucose conversion rate (increasing 26.5% and 17.4%, respectively) and byproduct acetic acid generation (slightly increased and decreased, respectively).

Keywords: *Escherichia coli*, L-tryptophan, phosphotransferase system, fed-batch fermentation

Received: November 28, 2016; **Accepted:** July 21, 2017

Corresponding author: Jinjin Zhao. Tel: +86-316-2359999; E-mail: Zhaojinjin@meihuagrp.com

网络出版时间: 2017-11-07

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171107.1128.001.html>

L-色氨酸是芳香族必需氨基酸的一种, 被广泛应用于饲料、医药和食品等领域。目前 L-色氨酸的合成效率偏低, 高昂的价格严重限制了其应用规模。提高 L-色氨酸的生物合成效率、降低生产成本具有重要的应用价值。L-色氨酸生物合成途径复杂, 前体来源于糖酵解途径、磷酸戊糖途径及三羧酸循环等多个基础代谢途径。每合成 1 mol L-色氨酸需要 1 mol 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 1 mol 4-磷酸赤藓糖 (E4P) 作为起始前体, 另外还需分别消耗 PEP、谷氨酰胺、5-磷酸核糖焦磷酸 (PRPP) 和丝氨酸各 1 mol^[1]。因此, 研究色氨酸合成代谢对研究微生物代谢平衡具有重要的科学意义。

1979年, Tribe等^[2]利用DNA重组技术首次将 *trpE* 基因引入大肠杆菌, L-色氨酸产量达到 1 g/L。此后, 随着代谢工程改造的深入和发酵工艺的优化, 利用重组大肠杆菌或谷氨酸棒杆菌发酵生产 L-色氨酸的效率得到了数十倍的提升^[3-7]。1996年, Berry^[3]在大肠杆菌中高表达去除反馈抑制 (Feed-back resistance, fbr) 的 *aroG^{fbr}*、*trpE^{fbr}DCBA* 基因, 发酵 52 h 产 L-色氨酸近 45 g/L, 过程最高糖酸转化率约为 22%。1999年, Ikeda等^[4]在产 L-色氨酸的谷氨酸棒杆菌 pIK9960 中高表达 *tktA* 基因, 增加 L-色氨酸合成前体 E4P 的水平, 从而提高 L-色氨酸的合成效率, 发酵 80 h 的 L-色氨酸产量达到 58 g/L。2012年, Cheng等^[7]通过对产 L-色氨酸大肠杆菌 TRJH 的发酵补料策略优化, 发酵 40 h 左右, 产量达到 38.8 g/L, 糖酸转化率达 19.9%。

大肠杆菌可通过多种途径转运并磷酸化葡萄糖生成 6-磷酸葡萄糖, 然后将其导入糖酵解途径。野生型大肠杆菌利用磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统 (简称 PTS 系统) 转运并磷酸化葡萄糖。PTS 系统由 E I、HPr 和 E II s 构成, E I、HPr 分别由 *ptsI*、*ptsH* 基因编码, 为胞质可溶性蛋白; E II s 包括 E II^{Man}、E II^{Fru}、E II^{Bgl}、E II A^{Glc}、E II CB^{Glc} 等, 多为蛋白复合体, 对碳水化合物具有特异性, 其中 E II A^{Glc}、E II CB^{Glc} 分别由 *crr*、*ptsG* 基因编码^[8-9]。PTS 系统转运 1 mol 葡萄糖需消耗 1 mol PEP^[9-10]。当大肠杆菌在以葡萄糖为碳源的限制性培养基中生长时, PTS 系统消耗了约 50% 的 PEP 用于葡萄糖的转运和磷酸化^[11], 直接影响以 PEP 为前体的化合物 (如莽草酸、芳香族氨基酸、天冬氨酸族氨基酸等) 的合成。在 PTS 系统缺陷大肠杆菌中, 葡萄糖可以通过半乳糖/氢离子协同转运蛋白 (D-Galactose/H⁺ symporter, GalP) 和葡萄糖激酶 (Glucokinase, Glk) 协同作用进入胞内^[9-11], 以 ATP 为磷酸基团供体, 但以 GalP、Glk 协同作用磷酸化转运葡萄糖的效率较低^[11]。另外, 大肠杆菌也可通过引入外源高效的

葡萄糖转运磷酸化系统, 如运动假单胞菌来源的 *glf*、*glk* 基因, 分别编码葡萄糖转运蛋白 (Glucose facilitator, Glf) 和葡萄糖激酶 (Glk), 以 ATP 为磷酸基团供体, 转运并磷酸化葡萄糖^[11-12]。

PTS 系统改造的大肠杆菌被广泛应用于多种化合物的发酵生产, 如莽草酸、苯丙氨酸、乙醇等^[11-12]。对于 PTS 系统的修饰改造可分为 3 类: *ptsG*⁻、PTS⁻ Glc⁺ (*ptsHlcr* 突变菌经进化获得可在葡萄糖为碳源的限制性培养基上生长的 Glc⁺ 表型) 和 PTS⁻ *glf-glk*⁺ (*ptsHlcr* 突变菌通过表达外源 *glf*、*glk* 基因获得 Glc⁺ 表型)^[11]。本研究采用 Red 同源重组系统, 构建了两类典型的 PTS 系统突变体 *ptsHlcr*⁻ *glf-glk*⁺ 和 *ptsG*⁻, 将其应用于产 L-色氨酸生产菌的构建, PTS 系统突变后, 葡萄糖转运将不再消耗 PEP, 胞内色氨酸重要前体物 PEP 的水平提高 1 倍, 色氨酸生产能力有望显著提高。本研究还对不同 PTS 系统改造菌株的生产性能进行了补料分批发酵初步研究, 首次综合评价了不同类型 PTS 系统改造对大肠杆菌产 L-色氨酸的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究使用的菌株和质粒见表 1。产 L-色氨酸大肠杆菌 MA01 为出发菌, 公开保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC), 保藏编号为 CGMCC No. 6863, 根据专利 WO8701130A1^[13] 及 Mascarenhas 等^[14] 描述的方法构建, 其宿主菌 SA01

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains & plasmids | Relevant genotype | Source or reference |
|--------------------|---|----------------------|
| Strains | | |
| SA01 | <i>E. coli</i> K-12 CICC 10303 | CGMCC |
| MA01 | Δ <i>tnaA</i> Δ <i>serA</i> | CGMCC |
| SA09 | SA01 <i>ptsHlcr</i> ⁻ | This study |
| SA29 | SA01 <i>ptsG</i> ⁻ | This study |
| MA10 | SA09 pMG43 | This study |
| MA103 | SA09 pMG56 | This study |
| MA209 | SA29 pMG43 | This study |
| Plasmids | | |
| pMG43 | pBR322 ori, <i>serA</i> , <i>aroG^{fbr}</i> , <i>trpE^{fbr}DCBA</i> , Tc ^R | CGMCC |
| pMG56 | pMG43 <i>Ptac-glf-glk</i> , Tc ^K | This study |
| pKD4 | oriR6Kgamma, rgnB(Ter), kan, Ap ^R | CGSC ^[15] |
| pKD46 | oriR101, repA101(ts), araBp-gam-bet-exo, Ap ^R | CGSC ^[15] |
| pCP20 | ts-rep, [cI857](lambda)(ts), cat, FLP, Ap ^R | CGSC ^[15] |
| pSC6.090B | pSU18 <i>Ptac-glf-glk</i> , <i>tktA</i> , <i>serA</i> | ATCC ^[16] |

为 *E. coli* K-12 CICC 10303 衍生的 *E. coli* K-12 CICC 10303 $\Delta tnaA \Delta serA$, 所含质粒 pMG43 为 pBR322 来源, 包含有 *serA*、*aroG^{fbr}* 和 *trpE^{fbr}DCBA* 基因。

1.2 培养基

种子培养基: 20 g/L 葡萄糖, 15 g/L 酵母浸粉, 10 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g/L 柠檬酸钠, 5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 15 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2 mg/L V_{B1} , pH 7.0。

发酵培养基: 10 g/L 葡萄糖, 1 g/L 酵母浸粉, 4 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/L 柠檬酸钠, 5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 6.3 mg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 7.4 mg/L $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 5.6 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.8 mg/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, pH 7.0。

1.3 主要试剂

Phusion[®] High-Fidelity DNA 聚合酶购于 NEB 公司, 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于 Fermentas 公司, 质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购于 Tiangen 公司, L-色氨酸、有机酸标准品购于 Sigma-Aldrich 公司。其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.4 质粒载体构建

采用常规分子克隆技术^[17], 如 PCR 扩增、酶切、连接和转化等构建重组质粒 pMG56, 具体方法如下, 所用引物序列见表 2。

1.4.1 质粒载体 pET28-glfglk 的构建

以质粒 pSC6.090B 为模板, 用引物 glfglk1 和

glfglk2 扩增约 2.3 kb 的 FK1 片段, 用引物 glfglk3 和 glfglk4 扩增约 1.0 kb 的 FK2 片段。以 FK1 和 FK2 为模板, 用引物 glfglk1 和 glfglk4 扩增约 3.3 kb 的 *glf-glk* DNA 片段, 产物用 *Xba* I、*Sph* I 双酶切, 与经同样酶切的质粒 pET28a 连接, 产物转化 Top10 感受态细胞, 转化子用 glfglk1 和 glfglk4 为引物 PCR 鉴定, 阳性约 3.3 kb。提取重组质粒, 用 *Xba* I、*Sph* I 双酶切鉴定, 所得重组质粒 pET28-glfglk 约 8.3 kb。

1.4.2 重组质粒 pMG56 的构建

质粒 pET28-glfglk 用 *Xba* I、*Sph* I 双酶切, 回收约 3.3 kb 的 *glf-glk* DNA 片段, 与经同样酶切的质粒 pMG43 连接, 产物转化 Top10 感受态细胞, 转化子用 glfglk1 和 glfglk4 为引物 PCR 鉴定, 阳性约 3.3 kb。提取重组质粒, 用 *Spe* I、*Sph* I 双酶切鉴定, 所得重组质粒 pMG56 约 15.8 kb。

1.5 突变菌的构建

采用 Datsenko KA 等^[15]所述的 Red 同源重组方法构建突变菌株, 具体方法如下。

1.5.1 *ptsHIcrr* 基因敲除菌的构建

以质粒 pKD4 为模板, *pts1* 和 *pts2* 为引物, PCR 扩增约 1.5 kb 的 *ptsHIcrr* 突变基因, 电击转化 100 μ L 含有质粒 pKD46 的 SA01 感受态细胞, 30 $^{\circ}$ C 孵育 1–2 h, 涂布含卡那霉素 (25 μ g/mL) 的 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h, 挑单克隆以 *pts3* 和 *pts4* 为引物菌落 PCR 鉴定, 阳性约 1.5 kb, 所得菌株即为 *ptsHIcrr* 基因的突变菌株 SA01 $\Delta ptsHIcrr::kan$ 。

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Summary of primers used in this study

| Name | Primer sequence (5'-3') | Function |
|---------|--|--|
| glfglk1 | <u>GCTCTAGACGACATCATAACGGTTCTG</u> | |
| glfglk2 | ACGCGCATGGGTTCCACCGATGTCAATCG | |
| glfglk3 | CGGTGGAACCCATGCGCGTTTCTCTATTG | To amplify <i>Ptac-glf-glk</i> |
| glfglk4 | ACATGCATGCGACTAGTCAGCCTCTTAAATTCAGTTC | |
| pts1 | CTAGACTTTAGTTCCACAACACTAAACCTATAAGTTGGGGAAATACAATG | |
| pts2 | <u>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u> | To delete <i>ptsHIcrr</i> |
| pts3 | AAATGGCGCCGATGGGCGCCATTTTCTACTGCGGCAAGAATTACTTCTTG | |
| pts4 | <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u> | |
| pts6 | GCTAAAGTCGAACCGCCAGG | To screen the positive mutation of <i>ptsHIcrr</i> |
| ptsG1 | CCAGCAGCATGAGAGCGATG | |
| ptsG2 | <u>TTGCCGCGATCTCGACAGTG</u> | |
| ptsG3 | AAAGCACCCATACTCAGGAGCACTCTCAATTATGTTTAAAGAATGCATTTGG | |
| ptsG4 | <u>TGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u> | To delete <i>ptsG</i> |
| ptsG5 | AGTCTCCCCAACGTCTTACGGATTAGTGGTTACGGATGTACTCATCCATCC | |
| ptsG6 | <u>ATATGAATATCCTCCTTAG</u> | |
| ptsG7 | <u>CCTTGCCACGCGTGAGAACG</u> | To screen the positive mutation of <i>ptsG</i> |
| ptsG8 | AAAGGCAGCCATCTGGCTGC | |

The coding region are underlined, the restriction sites are indicated by bold letters.

将质粒 pCP20 电击转化菌株 SA01 $\Delta ptsHIcrr::kan$, 菌液涂布含氯霉素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h。得到的单菌落转接无抗 LB 平板, 42 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 12 h, 以 *pts3* 和 *pts6* 为引物进行菌落 PCR 鉴定, 阳性约 0.5 kb, 所得菌株即为 *ptsHIcrr* 基因敲除的重组菌株 SA01 *ptsHIcrr⁻*。

1.5.2 *ptsG* 基因敲除菌的构建

与 *ptsHIcrr* 基因敲除菌的构建方法相同。

1.6 培养条件

摇瓶培养: 从冻存管取菌种在 LB 平板上划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h; 将菌体接种至装有 20 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、240 r/min 振荡培养 48 h。

发酵培养: 将过夜培养的菌液接种至 50 mL 种子培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、240 r/min 振荡培养 5–10 h, OD_{600} 控制在 6–8; 将菌液转接至装有 10 L 种子培养基的 20 L 发酵罐, 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 9–18 h, OD_{600} 控制在 13–18, 溶氧控制在 30% 以上, pH 控制在 6.8–7.0; 取 2.2 L 菌液转接至装有 20 L 发酵培养基的 50 L 发酵罐, 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 40–45 h, 溶氧控制在 10%–20%, 转速 200–800 r/min, 罐压 0.05–0.10 MPa, pH 6.5–6.6, 待初糖耗尽后, 流加 60% (*m/V*) 葡萄糖, 流加糖速率为 3–17 g/(L·h)。

1.7 葡萄糖、L-色氨酸及其他有机酸含量的测定

取 1 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 3 min, 测定上清液中葡萄糖、L-色氨酸及有机酸的含量。葡萄糖采用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院) 进行测定。L-色氨酸及有机酸分别采用 HPLC 法进行测定^[18–19]。

2 结果与分析

2.1 L-色氨酸生产菌的构建

按 1.4 所述方法, 构建重组质粒 pMG56。按 1.5 所述方法, 分别构建了 *ptsHIcrr* 缺失突变株 SA09 和 *ptsG* 缺失突变株 SA29。以 SA09 为宿主转化质粒 pMG43 或 pMG56, 分别构建了 L-色氨酸生产菌 MA10 和 MA103; 以 SA29 为宿主转化质粒 pMG43, 构建了 L-色氨酸生产菌 MA209。

2.2 PTS 系统改造对 L-色氨酸生产菌生长的影响

MA01、MA10 (*ptsHIcrr⁻*)、MA103(*ptsHIcrr⁻ glf-glk⁺*)、MA209 (*ptsG⁻*) 按 1.6 所述的方法进行摇瓶培养, 每 2 h 取样, 测定生长曲线 (图 1), 重复实验 3 次。与出发菌 MA01 相比, *ptsHIcrr* 缺失突变株 MA10 葡萄糖摄入能力差, 生长缓慢; 在 MA10 内引入 *glf*、*glk* 基因, 获得的菌株 MA103 生长旺盛, 最高 OD_{600} 值达到

16.9, 较 MA01 提高了 35.6%; *ptsG* 缺失突变株 MA209, 延滞期较出发菌 MA01 延长近 4 h, 但最终 OD_{600} 值仍达到 14.8, 较 MA01 提高 19.4%。

2.3 PTS 系统改造对 L-色氨酸生产菌发酵性能的影响

MA01、MA103 和 MA209 按 1.6 所述的方法进行发酵培养, 测定各菌株的生长曲线, 发酵液中葡萄糖、L-色氨酸及其他有机酸含量的变化, 最终产酸及糖酸转化率 (图 2)。发酵过程采用葡萄糖限制补料分批发酵工艺, 控制发酵液中葡萄糖浓度接近 0 g/L, 见图 2A。*ptsHIcrr* 缺陷株 MA103 最高 OD_{600} 值达到 125, 较出发菌 MA01 提高 47.0%; *ptsG* 缺陷株 MA209 虽然前期生长稍慢, 最高 OD_{600} 值也能达到 100, 较出发菌 MA01 提高 17.6%, 但 32 h 后 OD_{600} 值有明显下降的趋势。

L-色氨酸合成过程及最终产酸、糖酸转化率如图 2B 和 2D 所示, 与出发菌 MA01 相比, *ptsHIcrr* 缺陷株 MA103 能够达到的最高产酸为 38.5 g/L, 提高 25.9%, 糖酸转化率为 16.7%, 提高 26.5%; *ptsG* 缺陷株 MA209 最高产酸为 33.4 g/L, 提高 9.4%, 糖酸转化率为 15.5%, 提高 17.4%。

发酵液中的有机酸副产物, 如乙酸、甲酸、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、莽草酸的含量也进行了测定。结果表明, 乙酸含量差别最大, 变化趋势也最明显, 如图 2C 所示。*ptsHIcrr* 缺陷株 MA103 最高乙酸含量是 MA01 的 2.1 倍, 达到 4.1 g/L, 而 *ptsG* 缺陷株 MA209 的乙酸含量较 MA01 低, 最高值仅为 1.5 g/L。其他有机酸含量偏低, 且无显著变化。

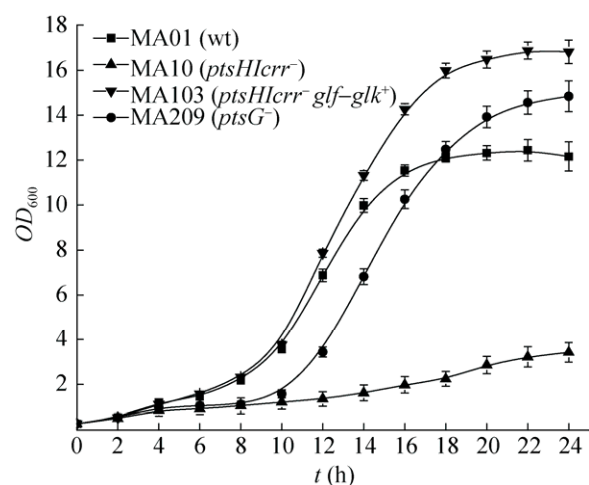


图 1 PTS 系统改造 L-色氨酸生产菌生长曲线
Fig. 1 Comparison of growth curves of different PTS modified L-tryptophan producing strains.

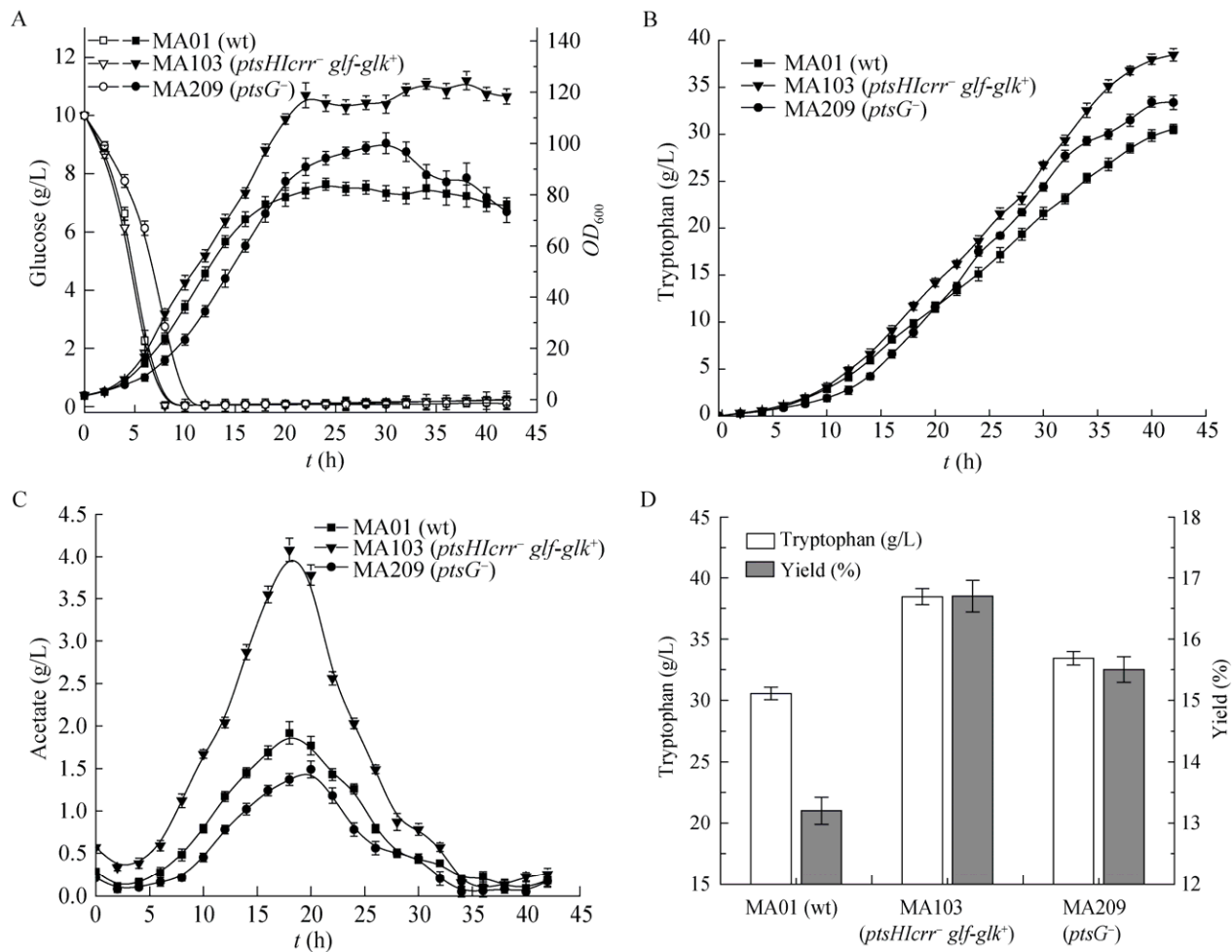


图2 PTS系统改造L-色氨酸生产菌的发酵性能

Fig. 2 Results of L-tryptophan fermentation using different PTS modified L-tryptophan producing *E. coli* strains. (A) Glucose concentration (open symbols) and growth curves (filled symbols). (B) Concentration of L-tryptophan. (C) Concentration of acetic acid. (D) L-tryptophan accumulation and product yields in g L-tryptophan per g glucose.

3 讨论

当大肠杆菌在以葡萄糖为碳源的限制性培养基中生长时, PTS系统消耗了约50%的PEP用于葡萄糖的转运和磷酸化,而用于合成3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(DAHP)的PEP仅占3%^[12,20],因此将PTS系统替换成利用ATP进行磷酸化的葡萄糖转运系统,对以PEP为前体的芳香族化合物的生物合成具有重要的应用价值。

然而大肠杆菌PTS系统与碳代谢总体调控蛋白CRP-cAMP紧密关联。腺苷酸环化酶催化ATP生成cAMP,其活性受磷酸化的EIIA^{Glc}(由*crr*基因编码)激活,因此不同类型的PTS系统改造会直接影响胞

内cAMP的含量。一般认为*ptsHIcrr⁻*突变体因缺失*crr*基因,cAMP含量较低,而*ptsG⁻*突变体因含有磷酸化的EIIA^{Glc},cAMP含量较高^[9,12]。在RegulonDB和EcoCyc数据库(<http://regulondb.ccg.unam.mx/index.jsp>和<http://biocyc.org/ecocyc/index.shtml>)中,除糖(阿拉伯糖、木糖、乳糖等)代谢相关基因外,还有131个“简单”或“复杂”的转录单元被CRP-cAMP激活、抑制或双重调控。这些调控单元与TCA循环、呼吸、渗透压调节、压力响应、生物膜形成、毒力、氮代谢、铁的吸收、感受态能力、多种药物抗性、非编码RNA等相关^[12]。因此,不同类型PTS系统突变对于不同化合物生物合成的影响可能存在显著的差异。

本研究首次综合评价了不同类型 PTS 系统改造对于大肠杆菌产 L-色氨酸的影响。结果表明, 不同类型 PTS 系统突变对菌体生长、L-色氨酸产量、糖酸转化率及副产物生成均有较大影响, 且表型存在较大差异。MA103 (*ptsHlcr^r glf-glk⁺*) 在发酵罐中的最高 OD_{600} 值能达到 120 以上, 对高密度发酵产 L-色氨酸非常有利, 最高产酸达 38.5 g/L。但发酵液中乙酸含量也相对偏高, 达到 4.1 g/L, 这可能与引入的外源基因 *glf*、*glk* 的表达强度有关, 调整合适的 *glf*、*glk* 基因表达水平, 将有望降低乙酸的水平, 得到 L-色氨酸产量更高的重组菌株。或者通过优化发酵补料策略, 降低乙酸水平^[7, 21-22]。

MA209 (*ptsG*) 因 PTS 系统被阻断, PEP 不再作为葡萄糖磷酸化的磷酸供体^[8-9], 葡萄糖通过半乳糖/氢离子协同转运蛋白 (GalP) 和葡萄糖激酶(Glk) 协同作用进入胞内^[9-11], 以 ATP 为磷酸基团供体, 但以 GalP、Glk 协同作用磷酸化转运葡萄糖的效率较低^[11], 故 MA209 菌的葡萄糖摄入系统较弱, 延滞期较出发菌 MA01 偏长, 进入对数中后期, 蛋白表达系统已经建立, 比生长速率和糖耗速率与 MA01 菌接近。但 MA209 菌的葡萄糖摄入水平较弱, 不易积累乙酸, 有利于发酵控制。通过增大接种量或优化培养基配方等手段可进一步缩短延滞期时长, 获得更高的 L-色氨酸产酸和糖酸转化率。另外, 与 MA103 菌相比, MA209 菌需激活自身另一套转运葡萄糖系统, 涉及复杂的代谢调控, 代谢调控过程中浪费较多的碳骨架和能量, 故而生长速率、转化效率都会受到影响。

REFERENCES

- [1] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 69(6): 615–626.
- [2] Tribe DE, Pittard J. Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 38(2): 181–190.
- [3] Berry A. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(7): 250–256.
- [4] Ikeda M, Katsumata R. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(6): 2497–2502.
- [5] Bongaerts J, Krämer M, Müller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 289–300.
- [6] Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(6): 651–658.
- [7] Cheng LK, Wang J, Xu QY, et al. Effect of feeding strategy on L-tryptophan production by recombinant *Escherichia coli*. *Ann Microbiol*, 2012, 62(4): 1625–1634.
- [8] Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(4): 939–1031.
- [9] Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, et al. *Escherichia coli* and *Salmonella*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 1996: 1824–1866.
- [10] 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.
- [11] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact*, 2005, 4(1): 14.
- [12] 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.
- [13] Mascarenhas D. Tryptophan producing microorganism: WO, 8701130A1. 1985-08-15.
- [14] Mascarenhas D, Ashworth DJ, Chen CS. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(10): 2995–2999.
- [15] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [16] Frost JW, Frost KM, Knop DR. Biocatalytic synthesis of shikimic acid: US, 6472169B1. 2002-10-29.
- [17] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 2–110.
- [18] Cheng LK, Xu QY, Xie XX, et al. Quick determination of L-tryptophan in fermented broth by HPLC. *J Tianjin Univ Sci Technol*, 2010, 25(1): 9–12 (in Chinese).
程立坤, 徐庆阳, 谢希贤, 等. HPLC 快速测定发酵液中 L-色氨酸. *天津科技大学学报*, 2010, 25(1): 9–12.
- [19] Suárez DC, Kilikian BV. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 2000, 35(9): 1051–1055.
- [20] Flores S, Gosset G, Flores N, et al. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 124–137.
- [21] Eiteman MA, Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(11): 530–536.
- [22] de Mey M, de Maeseneire S, Soetaert W, et al. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(11): 689–700.

(本文责编 郝丽芳)