

大肠杆菌酪氨酸转运系统基因敲除对酪氨酸生产的影响

王钦^{1,2}, 曾伟主^{1,2}, 周景文^{1,2}

1 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

王钦, 曾伟主, 周景文. 大肠杆菌酪氨酸转运系统基因敲除对酪氨酸生产的影响. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1247–1255.

Wang Q, Zeng WZ, Zhou JW. Effect of gene knockout of L-tyrosine transport system on L-tyrosine production in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1247–1255.

摘要: 酪氨酸是三大芳香族氨基酸之一, 广泛用于食品、医药和化工等领域。转运系统工程为代谢工程改造大肠杆菌选育酪氨酸生产菌株提供了一种重要的研究策略。大肠杆菌中酪氨酸胞内转运主要通过 *aroP* 和 *tyrP* 基因编码的通透酶进行调控。以酪氨酸生产菌株 HGXP 为出发菌株, 利用 CRISPR-Cas9 技术成功构建了 *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌, 并通过发酵试验考察了调节转运系统对酪氨酸生产的影响。发酵结果表明, *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌酪氨酸产量分别达到 3.74 g/L 和 3.45 g/L, 较出发菌株酪氨酸产量分别提高了 19% 和 10%。对诱导温度进行了优化, 结果表明 38 °C 为最佳诱导温度。在 3 L 发酵罐上进行了补料分批发酵, *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌酪氨酸产量进一步提高至 44.5 g/L 和 35.1 g/L, 较出发菌株酪氨酸产量分别提高了 57% 和 24%。研究结果对代谢工程强化大肠杆菌生产酪氨酸具有重要的参考价值。

关键词: 大肠杆菌, L-酪氨酸, 转运系统, 基因敲除

Effect of gene knockout of L-tyrosine transport system on L-tyrosine production in *Escherichia coli*

Qin Wang^{1,2}, Weizhu Zeng^{1,2}, and Jingwen Zhou^{1,2}

1 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-tyrosine is one of three aromatic amino acids that are widely used in food, pharmaceutical and chemical industries. The transport system engineering provides an important research strategy for the metabolic engineering of

Received: December 25, 2018; **Accepted:** January 31, 2019

Supported by: National Science Fund for Excellent Young Scholars (No. 21822806), National Natural Science Foundation of China (No. 31770097).

Corresponding author: Jingwen Zhou. Tel: +86-510-85918312; E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

国家优秀青年科学基金 (No. 21822806), 国家自然科学基金 (No. 31770097) 资助。

网络出版时间: 2019-03-12

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190311.1553.005.html>

Escherichia coli to breed L-tyrosine producing strain. The intracellular transport of L-tyrosine in *E. coli* is mainly regulated by two distinct permeases encoded by *aroP* and *tyrP* genes. The *aroP* and *tyrP* gene knockout mutants were constructed by CRISPR-Cas technique on the basis of L-tyrosine producing strain HGXP, and the effects of regulating transport system on L-tyrosine production were investigated by fermentation experiments. The fermentation results showed that the *aroP* and *tyrP* knockout mutants produced 3.74 and 3.45 g/L L-tyrosine, respectively, which were 19% and 10% higher than that of the original strain. The optimum induction temperature was determined to be 38 °C. Fed-batch fermentation was carried out on a 3-L fermentor. The L-tyrosine yields of *aroP* and *tyrP* knockout mutants were further increased to 44.5 and 35.1 g/L, respectively, which were 57% and 24% higher than that of the original strain. The research results are of great reference value for metabolic engineering of *E. coli* to produce L-tyrosine.

Keywords: *Escherichia coli*, L-tyrosine, transport system, gene knockout

酪氨酸 (L-tyrosine, Tyr) 是一种人体的条件必需氨基酸, 广泛应用于食品、饲料、医药、化工等行业。酪氨酸常被用作苯丙酮尿症患者的营养补充剂^[1], 也是多肽类激素、抗生素、L-多巴等医药化工产品的制备原料^[2], 以及合成如白藜芦醇、柚皮素、生松素等高附加值酪氨酸衍生物的前体^[3-5]。目前, 工业上主要由酶法来制备酪氨酸^[6], 虽然其具有周期短、选择性强、转化率高和分离纯化步骤简单的优点, 但天然酶活性低和稳定性差等缺点限制了酶法的应用^[7-8]。与酶法相比, 微生物发酵法可以利用生物质原料实现酪氨酸的从头合成, 可以降低生产成本。代谢工程和先进生物技术的快速发展为合理设计和优化微生物的代谢途径以生产酪氨酸提供了有力的工具^[9-10], 因此微生物发酵法生产酪氨酸具有非常广阔的发展前景^[11-12]。

目前微生物发酵法生产酪氨酸的研究主要集中在提高前体物质供应、解除反馈抑制、阻断竞争代谢途径等方面, 但对转运系统的研究较少^[13-15]。酪氨酸的转运涉及到细胞对外界环境的感应, 对优化代谢途径也起到了重要的作用^[16]。大肠杆菌中酪氨酸的胞内转运主要是由 *aroP* 和 *tyrP* 基因编码的通透酶进行调控。AroP 通透酶为通用芳香族氨基酸转运体, 负责酪氨酸、苯丙氨酸以及色氨酸向胞内的转运。TyrP 通透酶为酪氨酸特异性转运体, 特异性地将酪氨酸转运到胞内。在大肠杆菌中, DAHP 合成

酶(DS)催化酪氨酸合成的前体物 4-磷酸赤藓糖 (Erythrose-4-phosphate, E4P)和磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP)缩合生成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(DAHP), 它包含 AroG、AroF 和 AroH 这 3 个同工酶, 它们的活性分别受胞内苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的反馈阻遏和反馈抑制^[17]。胞内酪氨酸积累过高会抑制 DAHP 合成酶的表达, 进而影响酪氨酸的合成。本研究以酪氨酸生产菌株 HGXP 为出发菌株, 利用 CRISPR-Cas9 技术敲除了酪氨酸转运系统编码基因 *aroP* 和 *tyrP*, 从而减弱酪氨酸向胞内转运的能力, 一定程度上减轻酪氨酸的积累对 DAHP 合成酶的阻遏作用。并通过发酵试验考察了酪氨酸转运系统相关基因的敲除对大肠杆菌菌体生长和酪氨酸生产的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

出发菌株为酪氨酸生产菌株 HGXP, 其宿主菌 HGX 由大肠杆菌 WSH-Z06 (pAP-B03) 通过连续传代消除 pAP-B03 质粒选育而来^[18]。HGXP 带有 pAP-*aroG^{fbr}*-*tyrA^{fbr}* 质粒, pAP-*aroG^{fbr}*-*tyrA^{fbr}* 质粒带有抗反馈抑制的大肠杆菌酪氨酸合成途径关键酶基因 *aroG^{fbr}* 和 *tyrA^{fbr}*, 具有 P_{RP_L} 启动子和 Kan 抗性筛选标记。酪氨酸生产菌株 HGXP 由实验室前期通过基因工程手段构建。本研究以

HGXP 为出发菌株, 分别构建了 *aroP* 和 *tyrP* 单基因敲除菌。基因敲除所需的工具质粒 pCas 和 pTarget 由中国科学院上海植物生理生态研究所提供^[19]。本研究中所使用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10。

酪氨酸发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 35, 蛋白胨 4, 酵母粉 2, (NH₄)₂SO₄ 5, KH₂PO₄ 3, MgSO₄·7H₂O 3, NaCl 1, 柠檬酸钠 1.5, CaCl₂·2H₂O 0.015, FeSO₄·7H₂O 0.112 5, 维生素 B₁ 0.075, 微量元素营养液 (TES) 1.5 mL/L, 卡那霉素 0.04, pH 6.8±0.1。摇瓶发酵时, 添加 12 g/L CaCO₃ 用于调节 pH。

TES (g/L): Al₂(SO₄)₃·18H₂O 2.0, CoSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 2.5, H₃BO₃ 0.5, MnSO₄·H₂O 24, Na₂MoO₄·2H₂O 3.0, NiSO₄·6H₂O 2.5, ZnSO₄·7H₂O 15。

1.1.3 主要试剂

蛋白胨和酵母粉购自 Oxoid 公司。NaCl、葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、柠檬酸钠、

CaCl₂·2H₂O、FeSO₄·7H₂O、维生素 B₁、CaCO₃、Al₂(SO₄)₃·18H₂O、CoSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、H₃BO₃、MnSO₄·H₂O、Na₂MoO₄·2H₂O、NiSO₄·6H₂O、ZnSO₄·7H₂O 均购于上海国药集团。L-酪氨酸标准品购自 Sigma-Aldrich 公司 (上海)。卡那霉素 (Kan)、壮观霉素 (Spc)、质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒和高效制备感受态细胞试剂盒均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 使用 CRISPR-Cas9 系统敲除大肠杆菌目的基因

Jiang 等^[19] 先前描述了在大肠杆菌 K12 基因组中敲除目的基因的方法。此方法采用了双质粒系统, 其中一个为含有 Cas9 编码基因的 pCas 质粒, 另一个为含有打靶目的基因的 sgRNA 的 pTarget 质粒。将 pTarget 质粒和目的基因上下游同源臂同时通过电转化到含有 pCas 质粒的细胞中, 可以达到敲除目的基因的目的。pCas 质粒在终浓度为 0.01 mol/L 的阿拉伯糖诱导下, 合成重组酶, 更有利于同源重组的发生。pTarget 质粒会组成型的产生靶向目的基因的 sgRNA, 与 pCas

表 1 本研究所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
WSH-Z06(pAP-B03)	L-phenylalanine producing strain	[18]
HGX	Elimination pAP-B03 plasmid of WSH-Z06 (pAP-B03)	Stock in lab
HGXP	HGX, pAP- <i>aroG</i> ^{fbt} - <i>tyrA</i> ^{fbt}	Stock in lab
HGXΔ <i>aroP</i>	HGX knocking out <i>aroP</i> gene	This study
HGXΔ <i>tyrP</i>	HGX knocking out <i>tyrP</i> gene	This study
HGPP	HGXΔ <i>aroP</i> , pAP- <i>aroG</i> ^{fbt} - <i>tyrA</i> ^{fbt}	This study
HGEP	HGXΔ <i>tyrP</i> , pAP- <i>aroG</i> ^{fbt} - <i>tyrA</i> ^{fbt}	This study
Plasmid		
pAP- <i>aroG</i> ^{fbt} - <i>tyrA</i> ^{fbt}	P _R - <i>aroG</i> ^{fbt} , P _L - <i>tyrA</i> ^{fbt} , p15A replicon, Kan resistance	Stock in lab
pCas	repA101(Ts), P _{cas} - <i>cas9</i> , P _{araB} - <i>Red</i> , <i>lacI</i> ^Δ , P _{trc} -sgRNA- <i>pMB1</i> , Kan resistance	[19]
pTarget- <i>cadA</i>	<i>pMB1</i> , <i>aadA</i> , sgRNA- <i>cadA</i> , Spc resistance	[19]
pTarget- <i>aroP</i>	<i>pMB1</i> , <i>aadA</i> , sgRNA- <i>aroP</i> , Spc resistance	This study
pTarget- <i>tyrP</i>	<i>pMB1</i> , <i>aadA</i> , sgRNA- <i>tyrP</i> , Spc resistance	This study

质粒产生的 Cas9 蛋白结合, sgRNA 20 bp 的 N₂₀ 序列与目的基因碱基配对成功后 Cas9 蛋白会切断目的基因的双链。如果此 20 bp 定位在基因组上, 那么基因组就会被切断, 从而无法繁殖。但是如果同时导入线性的同源臂, 在切口两侧发生同源重组, 那么同源臂就会取代原来的基因序列, 而使得繁殖继续下去。pCas 质粒在 IPTG 诱导下可以产生定位在 pTarget 质粒上的 sgRNA, 从而消化 pTarget 质粒, pCas 质粒本身在 42 °C 下会被消除, 因此可以把敲除目的基因的菌株中两个质粒消除掉。本研究所用引物见表 2。

1.2.2 培养方法

种子培养: 从 LB 平板上挑取单菌落接种至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中培养, 37 °C、200 r/min 培养 10–14 h。

摇瓶发酵培养: 将培养好的种子培养液以 10% 的接种量, 接种至装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中进行培养, 发酵温度 33 °C, 摇

床转速 200 r/min, 当菌体生长至 OD₆₀₀ 为 1.5–2.0 时, 升温至 38 °C 诱导产 L-酪氨酸。

发酵罐发酵培养: 将培养好的种子液以 10% 的接种量接入装有 1.1 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中, 通过流加 20% 的氨水控制 pH 在 6.7–6.9, 发酵温度 33 °C, 待菌体浓度达到 OD₆₀₀=23–27 时, 升温至 38 °C 诱导产 L-酪氨酸。初始转速 400 r/min, 当溶解氧 (Dissolved oxygen, DO) 降至 20% 以下时逐步提高转速使 DO 维持在 20% 以上, 当培养基中葡萄糖基本耗尽时, 流加 700 g/L 的葡萄糖使培养基中的葡萄糖浓度维持在 10 g/L 以内。

1.2.3 菌体浓度的测定

测定发酵罐发酵培养中的菌体浓度需在定容前加 6 mol/L 的 HCl 溶解发酵液中的酪氨酸, 处理后的发酵液经 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。菌体沉淀用去离子水洗涤 2 次, 离心后得到的湿菌体在 105 °C 下烘干至恒重, 计算出细胞干重 (Dry cell weight, DCW)。发酵液稀释至适当

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
aroP-up-F	CCACTTGCCGAAGTCAATTGGTC	23
aroP-up-R	<u>CGGGTGAGGGCGTAGAGAGAGAAACCTCGTGC</u> GGTGGTTG	40
aroP-down-F	<u>CAACCACCGCACGAGGTTTCTCTCTCTACGCCCTCACCCG</u>	40
aroP-down-R	ACGAACGTGAGTATTTGCGTGAG	23
aroP-sgRNA-F	<u>CCTCCGTAATACAGTCCGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</u>	43
aroP-sgRNA-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAG	24
aroP-sgRNA-v-F	GACCTACACCGAACTGAGATACCTA	25
aroP-sgRNA-v-R	TGCGGACTGTATTACGGAGG	20
tyrP-up-F	GCGAAGGTCTGTATTTTATCGAC	23
tyrP-up-R	<u>AGGAATTTGAGGCTATCTGAGCTTTCTTCTGTCTGACGA</u>	40
tyrP-down-F	<u>TCGTCAGGACAGAAGAAAGCTCAGATAGCCCTCAAATTCCT</u>	40
tyrP-down-R	AAGAGATGACGCGCTTTATG	20
tyrP-sgRNA-F	<u>GGAGGTGTACCAGCATGTTCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG</u>	43
tyrP-sgRNA-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAG	24
tyrP-sgRNA-v-F	GACCTACACCGAACTGAGATACCTA	25
tyrP-sgRNA-v-R	GAACATGCTGGTACACCTCC	20

The underlined part of the aroP-up-R, aroP-down-F, tyrP-up-R and tyrP-down-F primer sequences indicate homology extensions; the underlined part of aroP-sgRNA-F and tyrP-sgRNA-F primer sequences indicate N₂₀ sequences.

的范围后,使用 722s 型分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光度 (OD_{600}),得到 OD_{600} 与 DCW 的关系式。在本研究中, $DCW(g/L)=0.364\times OD_{600}$ 。

1.2.4 葡萄糖浓度的测定

取 1 mL 发酵液经 12 000 r/min 离心 5 min,上清液稀释一定倍数,采用葡萄糖-乳酸生物传感分析仪(深圳西尔曼科技有限公司)测定葡萄糖浓度。

1.2.5 发酵液样品的处理方法

由于酪氨酸在室温和中性 pH 下在水中的溶解度很低,因此在发酵过程中采集的大多数样品具有大量以晶体形式存在的酪氨酸固体。将发酵液样品以 1:1 的比例用 6 mol/L HCl 稀释,涡旋振荡,以确保酪氨酸完全溶解。用去离子水将发酵液样品进一步稀释使最终产物浓度达到分析方法的测量范围。涡旋振荡,12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液并过滤得到处理后的发酵液样品用于高效液相色谱测定。

1.2.6 L-酪氨酸的测定

采用高效液相色谱法检测发酵液中 L-酪氨酸的含量。色谱柱为 Agilent C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),紫外检测器的检测波长为 280 nm,流动相为 0.1 mol/L 乙酸钠(冰乙酸调节 pH 至 4.0)和甲醇,体积百分比为 90%和 10%,流速为 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L^[20]。

2 结果与分析

2.1 *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌的构建

由于酪氨酸合成关键酶的表达质粒 pAP-*aroG^{fbr}-tyrA^{fbr}* 和基因敲除的工具质粒 pCas 都是 Kan 抗性筛选标记,为避免 pAP-*aroG^{fbr}-tyrA^{fbr}* 质粒影响基因敲除菌的筛选,本研究首先在宿主菌 HGX 内进行酪氨酸转运系统的基因敲除,然后通过转化 pAP-*aroG^{fbr}-tyrA^{fbr}* 质粒获得出发菌株 HGXP 的基因敲除菌。利用引物 up-F 和

up-R 扩增得到目的基因上游同源臂,利用引物 down-F 和 down-R 扩增得到目的基因下游同源臂,利用融合 PCR 技术扩增得到目的基因上下游同源臂。利用引物 sgRNA-F 和 sgRNA-R 以 pTarget-*cadA* 质粒为模板通过全质粒 PCR 获得带有目的基因 N₂₀ 序列的 pTarget 质粒,用引物 sgRNA-v-F 和 sgRNA-v-R 对构建的 pTarget 质粒进行菌落 PCR 验证(图 1A)。若能得到大小为 500 bp 左右的条带,则证明 pTarget 质粒构建成功。将 pTarget 质粒和同源臂同时通过电转化到含有 pCas 质粒的感受态细胞中,使用引物 up-F 和 down-R 进行菌落 PCR 验证(图 1B)。若基因敲除成功则应得到大小约 1 000 bp 的同源臂片段。将样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证,核酸序列与同源臂序列一致,结果表明 *aroP* 和 *tyrP* 基因已经成功敲除。将含有酪氨酸合成关键酶基因的质粒 pAP-*aroG^{fbr}-tyrA^{fbr}* 分别转化至 *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌中,获得酪氨酸基因工程菌 HGPP 和 HGEP。

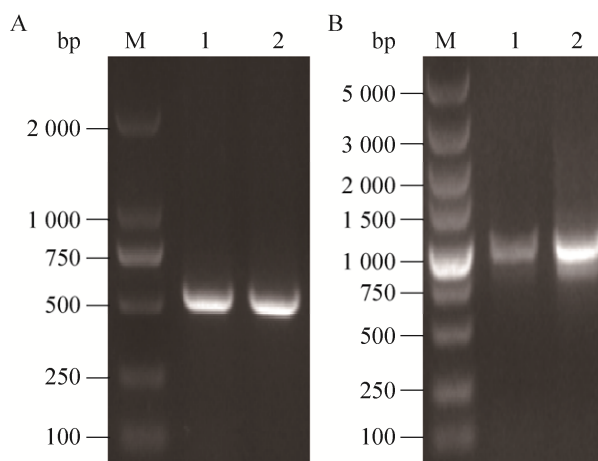


图 1 菌落 PCR 验证琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of colony PCR. (A) Verification of pTarget plasmid. 1: pTarget-*aroP*; 2: pTarget-*tyrP*. (B) Verification of gene deletion. 1: *aroP* gene deletion; 2: *tyrP* gene deletion.

2.2 酪氨酸基因工程菌的摇瓶发酵

为了初步考察大肠杆菌酪氨酸转运蛋白编码基因敲除对菌株生产酪氨酸的影响,对出发菌株 HGXP 及构建的酪氨酸基因工程菌 HGPP 和 HGEP 进行了摇瓶发酵试验。如图 2A 所示,与对照菌株相比,*aroP* 基因敲除菌 HGPP 的最高 OD_{600} 与对照菌株相比降低了 8%; *tyrP* 基因敲除菌 HGEP 的最高 OD_{600} 与对照菌株相比提高了 14%。说明 *aroP* 基因的敲除对菌株生长有一定抑制作用,而 *tyrP* 基因的敲除对菌株的生长有一定促进作用,由于菌株的生长涉及到一系列复杂的调控,其原因有待于进一步探究。在酪氨酸生产方面,*aroP* 基因敲除菌 HGPP 发酵 48 h 的酪氨酸产量为 3.74 g/L,与对照菌株 HGXP 相比提高了 19%; *tyrP* 基因敲除菌 HGEP 发酵 48 h 的酪氨酸产量为 3.45 g/L,与对照菌株相比提高了 10% (图 2B)。结果表明,在 HGXP 菌株中敲除转运蛋白编码基因 *aroP* 和 *tyrP* 均对酪氨酸的生产有积极影响,*aroP* 基因的敲除较 *tyrP* 基因的敲除更有利于酪氨酸的生产。发酵条件的优化有望进一步提高酪氨酸基因工程菌生产酪氨酸的能力。

2.3 酪氨酸基因工程菌的诱导温度优化

由于酪氨酸合成关键酶的表达质粒 pAP-*aroG^{fbr}*-*tyrA^{fbr}* 为热诱导型质粒,诱导温度与酪氨酸生物合成关键酶的表达有着密切的联系,而且在不同的温度下酪氨酸合成过程中的关键酶的酶活和稳定性也会受到影响。因此本实验考察了不同的诱导温度 (36 °C、38 °C、40 °C) 对酪氨酸生产菌株生产酪氨酸的影响。发酵 48 h 的酪氨酸产量如图 3 所示,在 38 °C 的诱导条件下, HGXP、HGPP 和 HGEP 菌株的酪氨酸产量比在 33 °C 的培养条件下分别提高了 96.7%、77.4% 和 92.6%; 比在 36 °C 的诱导条件下分别提高了 17%、19% 和 18%; 比在 40 °C 的诱导条件下分别提高了 8%、9% 和 12%。结果表明采用 38 °C 的诱导温度可以提高酪氨酸基因工程菌生产酪氨酸的能力,因此在 3 L

发酵罐水平上可以采用 38 °C 的诱导条件来进一步探究其生产酪氨酸的能力。

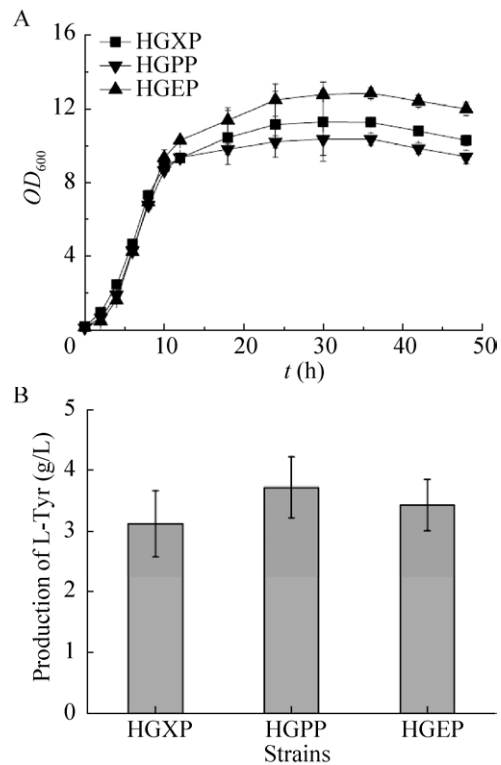


图 2 大肠杆菌酪氨酸转运系统基因敲除菌的摇瓶发酵

Fig. 2 Shake flask fermentation of Tyr transport system gene knockout mutants. The data represent the $\bar{x} \pm s$ of three measurements.

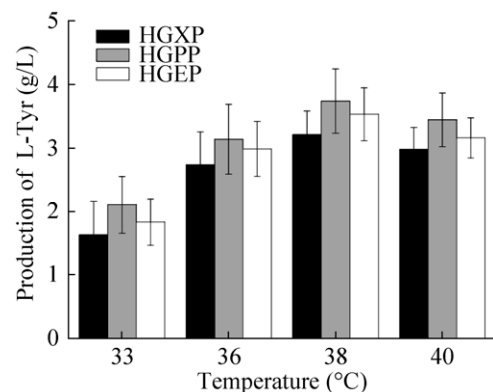


图 3 诱导温度的优化

Fig. 3 Optimization of induced temperature. The data represent the $\bar{x} \pm s$ of three measurements.

2.4 酪氨酸基因工程菌的补料分批发酵

由摇瓶发酵试验得知, *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌的酪氨酸生产能力较出发菌株 HGXP 都有提升。在 3-L 发酵罐上出发菌株 HGXP 的酪氨酸产量最高为 28.3 g/L, 为了进一步考察酪氨酸基因工程菌发酵生产酪氨酸的潜力, 在 3-L 发酵罐上分别对 HGPP 和 HGEP 菌株进行了补料分批发酵的探究。如图 4 所示, 虽然在摇瓶水平上 HGPP 的生长情况不如 HGEP, 但是在发酵罐水平由于溶氧更为充足, 2 个菌株的最大 DCW 相近, 分别为 26.65 g/L 和 25.96 g/L。在酪氨酸生产方面, HGPP 菌株发酵 46 h 的酪氨酸产量达到 44.5 g/L, 与出发菌株相比酪氨酸产量提高了 57%, 底物转化率为 0.179, 生产强度为 0.967 g/(L·h)。HGEP 菌株

发酵 46 h, 可以生产 35.1 g/L 的酪氨酸, 与出发菌株相比酪氨酸产量提高了 24%, 底物转化率为 0.143, 生产强度为 0.763 g/(L·h) (表 3)。结果表明, HGPP 的底物转化率和生产强度都大于 HGEP, 进一步证明了在 HGXP 菌株中 *aroP* 基因敲除相较于 *tyrP* 基因敲除更有利于酪氨酸的生产。因此 *aroP* 基因敲除菌可以作为酪氨酸生产的潜在优势菌株。

3 讨论

L-酪氨酸的生物合成途径已得到广泛的研究^[21], 转运系统的改造为代谢工程育种提供了重要的研究方向^[22]。由于目前仍有许多氨基酸转运系统相关功能基因尚未得到鉴定, 因此只有少数文献考察了转运系统工程对氨基酸生物合成的影响^[23-25]。在最近的一项研究中, Kim 等^[26]构建了一株生产酪氨酸的大肠杆菌菌株, 通过在 *tyrP* 基因敲除菌株中过表达 *aroG^{fbr}*、*aroL* 和 *tyrC*, 可以产生 43.1 g/L 酪氨酸。这是首次报道在大肠杆菌中通过改造酪氨酸转运系统来生产酪氨酸。在本研究中分别构建了 *aroP* 和 *tyrP* 基因敲除菌, 由于同时敲除 *aroP* 和 *tyrP* 基因后, 菌株的生长受到严重影响, 酪氨酸产量与对照菌株相比没有提高, 因此我们着重

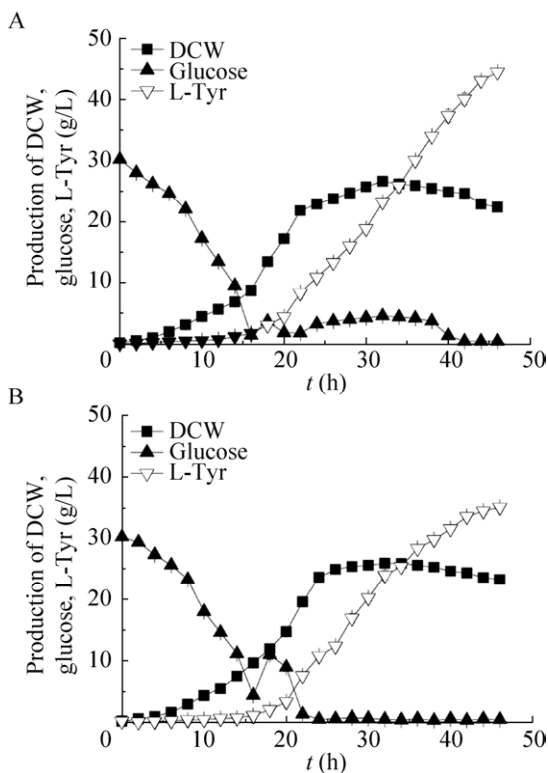


图 4 大肠杆菌 HGPP 和 HGEP 的补料分批发酵
Fig. 4 Fed-batch fermentation of *E. coli* HGPP and HGEP. (A) HGPP. (B) HGEP. The data represent the $\bar{x} \pm s$ of three measurements.

表 3 大肠杆菌 HGPP 和 HGEP 补料分批发酵参数比较

Table 3 Comparison of fermentation parameters of fed-batch fermentation of *E. coli* HGPP and HGEP

Fermentation parameters	HGPP	HGEP
Glucose consumption (g/L)	248.000±4.243	245.000±7.071
Culture time (h)	46.050±1.061	46.050±1.061
Maximum DCW (g/L)	26.650±0.394	25.964±0.180
Maximum L-Tyr concentration (g/L)	44.520±0.438	35.100±0.453
Cell productivity (g/(L·h))	0.579±0.022	0.564±0.017
L-Tyr productivity (g/(L·h))	0.967±0.032	0.763±0.027
Cell yield on glucose (g/g)	0.107±0.001	0.106±0.002
L-Tyr yield on glucose	0.179±0.001	0.143±0.002

The data represent the $\bar{x} \pm s$ of three measurements.

考察了酪氨酸转运系统单基因敲除对菌株生产酪氨酸的影响。结果表明, *aroP* 和 *tyrP* 单基因敲除菌的酪氨酸产量与对照菌 HGXP 相比分别提高了 19% 和 10%。

我们又对酪氨酸生产菌的诱导温度进行了优化, 结果表明在 38 °C 下诱导关键酶的表达最有利于酪氨酸的生产。在进一步的补料分批发酵试验中, 酪氨酸最高产量为 *aroP* 单基因敲除菌的 44.5 g/L, 底物转化率为 0.179, 由于仅敲除了一个基因, 对菌株的生长影响较小, 因此可以进行后续分子改造以进一步提高其生产酪氨酸的能力。

本研究所构建的酪氨酸生产菌株为热诱导型菌株, 相较于其他需要添加价格昂贵的诱导剂的工程菌株具有经济节约且不易染菌的优点, 更适合进行工业上的大规模生产。同时, 对酪氨酸转运系统的研究也为代谢工程育种提供了重要的研究策略。

REFERENCES

- [1] Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, et al. Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inher Metab Dis*, 2007, 30(2): 145–152.
- [2] Seetharam G, Saville BA. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb Tech*, 2002, 31(6): 747–753.
- [3] Katsuyama Y, Funahashi N, Miyahisa I, et al. Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem Biol*, 2007, 14(6): 613–621.
- [4] Lütke-Eversloh T, Santos CNS, Stephanopoulos G. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. *Appl Microbiol Biot*, 2007, 77(4): 751–762.
- [5] Wu JJ, Liu PR, Fan YM, et al. Multivariate modular metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce resveratrol from L-tyrosine. *J Biotechnol*, 2013, 167(4): 404–411.
- [6] Kim DY, Rha E, Choi SL, et al. Development of bioreactor system for L-tyrosine synthesis using thermostable tyrosine phenol-lyase. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(1): 116–122.
- [7] Kim JH, Song JJ, Kim BG, et al. Enhanced stability of tyrosine phenol-lyase from *Symbiobacterium toebii* by DNA shuffling. *J Microbiol Biotechnol*, 2004, 14(1): 153–157.
- [8] Rha E, Kim S, Choi SL, et al. Simultaneous improvement of catalytic activity and thermal stability of tyrosine phenol-lyase by directed evolution. *FEBS J*, 2009, 276(21): 6187–6194.
- [9] Santos CNS, Xiao WH, Stephanopoulos G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): 13538–13543.
- [10] Kim SC, Min BE, Hwang HG, et al. Pathway optimization by re-design of untranslated regions for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13853.
- [11] Patnaik R, Zolanz RR, Green DA, et al. L-tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: fermentation optimization and recovery. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(4): 741–752.
- [12] Olson MM, Templeton LJ, Suh W, et al. Production of tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biot*, 2007, 74(5): 1031–1040.
- [13] Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol*, 1996, 17(1): 47–52.
- [14] Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G. Feedback inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: generation and characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 7224–7228.
- [15] Ikeda M, Katsumata R. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(3):

- 781–785.
- [16] Ikeda M, Katsumata R. Transport of aromatic amino acids and its influence on overproduction of the amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ferment Bioeng*, 1994, 78(6): 420–425.
- [17] Hu CY, Jiang PH, Xu JF, et al. Mutation analysis of the feedback inhibition site of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol*, 2003, 43(5): 399–406.
- [18] Zhou HY, Liao XY, Wang TW, et al. Enhanced L-phenylalanine biosynthesis by co-expression of *pheA^{br}* and *aroF^{wt}*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 4151–4156.
- [19] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2506–2514.
- [20] Ji CX. Determination of tryptophan and tyrosine of fermentation liquid by HPLC. *Anhui Chem Ind*, 2014, 40(1): 68–69, 74 (in Chinese).
纪传侠. 高效液相色谱法测定发酵液中色氨酸和酪氨酸含量的研究. *安徽化工*, 2014, 40(1): 68–69, 74.
- [21] Juminaga D, Baidoo EEK, Redding-Johanson AM, et al. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(1): 89–98.
- [22] Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(3): 265–274.
- [23] Ikeda M, Katsumata R. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(8): 1600–1602.
- [24] Vrljic M, Sahm H, Eggeling L. A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol*, 1996, 22(5): 815–826.
- [25] Okamoto K, Kino K, Ikeda M. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(11): 1877–1882.
- [26] Kim B, Binkley R, Kim HU, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(10): 2554–2564.

(本文责编 陈宏宇)