

## 温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵

邱并生

(《微生物学通报》编委会 北京 100101)

微生物作为细胞工厂,已被应用于许多同源及异源代谢产物的生产,包括发酵型产物(氨基酸、有机酸、有机醇)以及众多次级代谢产物的生产<sup>[1-4]</sup>。然而,其中多数代谢产物的过量合成会对细胞造成伤害,抑制细胞的生长或者使代谢流失衡<sup>[5-6]</sup>。近年来,利用基因工程手段,将外源丙氨酸脱氢酶基因引入 *Escherichia coli* 菌株,在 *E. coli* 中实现了 L-丙氨酸的合成,进一步通过代谢工程策略改造竞争代谢途径,显著提高了 L-丙氨酸发酵合成水平和光学纯度<sup>[7-9]</sup>。

本期刊登了周丽、周哲敏等的文章“温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 L-丙氨酸”<sup>[10]</sup>。作者以野生型 *E. coli* CICIM B0016 为出发菌株,敲除副产物乙酸、甲酸、乙醇、琥珀酸、乳酸合成途径编码基因 *ackA-pta*、*pflB*、*adhE*、*frdA*、*ldhA*,敲除丙氨酸消旋酶编码基因 *dadX*,并将来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)的 L-丙氨酸脱氢酶编码基因 *alaD* 克隆在  $P_L$  和  $P_R$  启动子下游,构建出可通过温度开关控制 L-丙氨酸合成的新型 *E. coli* 重组菌株。28 °C 下菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 几乎不合成 L-丙氨酸,可保证菌体快速生长,而在 42 °C 下可高效合成 L-丙氨酸。5 L 罐发酵试验结果证实可合成 67.2 g/L L-丙氨酸,体积生产强度达到 2.06 g/(L·h)。通过发酵培养温度的简单切换,分阶段实现了细胞的快速增量和 L-丙氨酸的高强度合成。

该文选用  $P_L$ - $P_R$  启动子对 ALD 的表达进行开关调控,该启动子为严谨型启动子,在低温下无本底表达,且仅通过调节温度就可以实现有效调控,不需要添加一些昂贵的化合物进行诱导。通过控制温度,可在菌体生长阶段严格关闭菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* L-丙氨酸的合成水平,避免产物对菌体生长的抑制和竞争作用。同时,在产物合成阶段可开启 L-丙氨酸的快速合成,显示出较好的生产潜力。然而重组菌在没有选择压力下培养,很难确保质粒稳定性,建议以多拷贝的形式将  $P_L$ -*alaD* 基因整合于染色体上进行高效表达;并对重组菌株的发酵条件进行优化,提高其 L-丙氨酸生产性能,进行放大试验,尽早实现产业化。

关键词: L-丙氨酸, 基因开关, 大肠杆菌, 发酵, 代谢工程

### 参考文献

- [1] Kern A, Tilley E, Hunter IS, et al. Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129(1): 6-29
- [2] Krärner R. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 45(1): 1-21
- [3] Mijts BN, Schmidt-Dannert C. Engineering of secondary metabolite pathways[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(6): 597-602
- [4] Jones BB, Chan H, Rothstein S, et al. RNA polymerase binding sites in  $\lambda$ plac5 DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(11): 4914-4918
- [5] Bunch PK, Mat-Jan F, Lee N, et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 1997, 143(1): 187-195
- [6] Zhou L, Niu DD, Tian KM, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 560-568
- [7] Lee M, Smith G, Eiteman M, et al. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli aceF ldhA* mutants expressing the *Bacillus sphaericus alaD* gene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(1): 56-60
- [8] Smith GM, Lee SA, Reilly KC, et al. Fed-batch two-phase production of alanine by a metabolically engineered *Escherichia coli*[J].

Biotechnology Letters, 2006, 28(20): 1695-1700

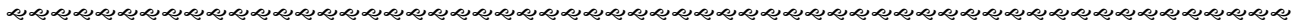
- [9] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, et al. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 355-366
- [10] Zhou L, Deng C, Cui WJ, et al. L-alanine production in recombinant *Escherichia coli* with thermo-regulated genetic switch[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2272-2281 (in Chinese)
- 周丽, 邓璨, 崔文璟, 等. 温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 L-丙氨酸[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2272-2281

## Fermentation in recombinant *Escherichia coli* with thermo-regulated genetic switch

QIU Bing-Sheng

(The Editorial Board of Microbiology China, Beijing 100101, China)

**Keywords:** L-alanine, Genetic switch, *Escherichia coli*, Fermentation, Metabolic engineering



**编辑部公告**

### 《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。