

研究报告



产 L-苏氨酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能

魏佳 王壮壮 于海波 冯丽妍 徐建中* 张伟国*

1 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

2 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】大肠杆菌由于生长性能优良、遗传背景清晰,常被用作苏氨酸生产菌。【目的】敲除大肠杆菌 *Escherichia coli* THR 苏氨酸合成途径的非必需基因,并异源表达苏氨酸合成必需的关键酶,构建一株苏氨酸高产菌株。【方法】利用 FLP/FRT 重组酶系统,敲除 *E. coli* THR 中 *lysC*、*pfkB* 和 *sstT*,同时进行谷氨酸棒杆菌中 *lysC^{fbr}*、*thrE* 和丙酮丁醇梭菌中 *gapC* 的重组质粒构建并转化到宿主菌中。【结果】以 *E. coli* THR 为出发菌株,敲除其苏氨酸合成途径中表达天冬氨酸激酶 III (AKIII) 的基因 *lysC*、磷酸果糖激酶 II 基因 *pfkB* 及苏氨酸吸收蛋白表达基因 *sstT*,使菌株积累苏氨酸的产量达到 75.64 ± 0.35 g/L,比出发菌株增加 9.9%。随后异源表达谷氨酸棒杆菌中解除了反馈抑制的天冬氨酸激酶(*lysC^{fbr}*)、苏氨酸分泌转运蛋白(*thrE*)及丙酮丁醇梭菌中由 *gapC* 编码的 NADP⁺ 依赖型甘油醛-3-磷酸脱氢酶,获得重组菌株 *E. coli* THR6 菌株。该菌株积累苏氨酸的产量提高到 105.3 ± 0.5 g/L,糖酸转化率提高了 43.20%,单位产酸能力提高到 5.76 g/g DCW,最大生物量为 18.26 g DCW/L。【结论】单独敲除某个基因或改造某个途径不能使苏氨酸大量合成和积累,对多个代谢途径共同改造是构建苏氨酸工程菌的最有效方法。

关键词: L-苏氨酸, 大肠杆菌, 基因敲除, 异源表达, 转运途径

Construction and fermentation of L-threonine-producing recombinant *Escherichia coli*

WEI Jia WANG Zhuang-Zhuang YU Hai-Bo FENG Li-Yan XU Jian-Zhong* ZHANG Wei-Guo*

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

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] *Escherichia coli* is often used to produce threonine because of its excellent growth performance and clear genetic background. [Objective] In order to construct a high-yield strain of threonine, the nonessential genes of the *E. coli* THR in threonine biosynthetic pathway were knocked out while the key enzymes essential for threonine synthesis were heterologously expressed. [Methods] The *lysC*, *pfkB* and *sstT* of *E. coli* THR were deleted by using the FLP/FRT recombinant enzyme system. In

Foundation item: Natural Science Foundation Youth Fund of Jiangsu Province (BK20150149)

*Corresponding authors: E-mail: XU Jian-Zhong: xujianzhong@jiangnan.edu.cn; ZHANG Wei-Guo: zhangwg186@163.com

Received: 14-05-2018; Accepted: 05-07-2018; Published online: 31-07-2018

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金(BK20150149)

*通信作者: E-mail: 徐建中: xujianzhong@jiangnan.edu.cn; 张伟国: zhangwg186@163.com

收稿日期: 2018-05-14; 接受日期: 2018-07-05; 网络首发日期: 2018-07-31

addition, the recombinant plasmid with the genes *lysC^{fbr}* and *thrE* from *Corynebacterium glutamicum* and the gene *gapC* from *Clostridium acetobutylicum* was constructed. Then this plasmid was introduced into different host strains. **[Results]** The target strain *E. coli* THR3 as obtained from the parental strain *E. coli* THR by deleting its threonine synthesis pathway: aspartate kinase III-coding gene *lysC* and phospho fructose kinase II-coding gene *pfkB* as well as the threonine absorption protein-coding gene *sstT*. The threonine production of strain *E. coli* THR3 as up to 75.64±0.35 g/L, was 9.9% higher than that of the parental strain *E. coli* THR (68.7 g/L). In addition, heterogenous expression of threonine secretory transporter-coding gene *thrE* and aspartic kinase-coding *lysC^{fbr}* from *C. glutamicum* as well as heterologous expression of NADP⁺ dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase coding *gapC* from *Clostridium acetobutylicum* were beneficial to increase the threonine production. The recombinant strain *E. coli* THR6 could produce 105.3±0.5 g/L of threonine with a biomass of 18.26 g DCW/L and the threonine yield (g/g) from glucose increased by 43.20% and the acid production capacity per unit increased to 5.76 g/g DCW in fed-batch culture accumulation. **[Conclusion]** Knocking out a gene alone or modifying a pathway does not allow large amounts of threonine to be synthesized and accumulated. Co-transformation of multiple metabolic pathways is the most effective way to construct threonine engineered strains.

Keywords: L-Threonine, *Escherichia coli*, Gene knockout, Heterologous expression, Transport pathway

α -氨基- β -羟基丁酸因具有与蔗糖类似的结构而被命名为苏氨酸。L-苏氨酸属于 8 种必需氨基酸之一,但人和动物自身无法合成,必须依靠外部供应。1935 年, L-苏氨酸被首次从纤维蛋白水解物中分离并鉴定^[1]。苏氨酸是一种重要的营养强化剂,可以增加谷类和乳制品等的营养,缓解人体疲劳,促进生长发育。在医学上,由于苏氨酸结构中具有羟基,所以它具有亲水和保水作用并能保持人体皮肤水分;其制剂具有促进人体内抗脂肪肝发展的药效,是复方氨基酸输液的组成部分;同时,苏氨酸是生产最有效和低过敏性的抗生素——单环菌素的最重要原料^[2]。因此,苏氨酸主要用于食品保健品、制药、化学试剂和畜牧饲料添加剂等^[3]。

苏氨酸的生产方法主要包括蛋白质水解、化学合成和微生物发酵。目前微生物发酵法已成为苏氨酸生产的主流方法^[4]。长期以来,由于畜牧业、食品、医药、保健品和化妆品等领域的发展,国内外市场对苏氨酸的需求量持续快速增长,成为除赖氨酸、蛋氨酸以外发展最快的第三大氨基酸。结合上述特点,国内外对 L-苏氨酸的需求促进了 L-苏氨酸的大规模生产。但国内微生物发酵法生产 L-苏氨酸的研

究起步较晚,最早的报道见于 20 世纪 80 年代。在菌种选育、基因工程菌构建及发酵条件优化等方面与日本等发达国家相比整体水平尚有一定的差距。因此,培育 L-苏氨酸高产菌株以降低生产成本来提高国际市场竞争力是十分必要的。

由于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌遗传背景研究得较为透彻,具有操作简便、易于控制、培养基简单且生长快速的优点,近年来成为改造高产苏氨酸的热门菌株。随着技术的日趋成熟,系统代谢工程成为改造菌株生产氨基酸的理想方法。例如,沈琼通过增强 L-苏氨酸合成途径关键酶基因 *thrABC* 和 L-苏氨酸分泌有关基因 *rhtC* 的表达,使苏氨酸产量达到 52.7 g/L^[5]。另外,王焕章等通过敲除苏氨酸脱氢酶基因的同时过表达苏氨酸操纵子使苏氨酸产量达到 75 g/L^[6]。周茜修饰大肠杆菌 *Escherichia coli* THRD 的乙醛酸循环,敲除 *iclR* 并用不同强度的启动子替换 *aceBAK* 启动子,苏氨酸产量达到 117.5 g/L^[7]。除上述方法外,还可以通过定点突变解除调控底物对关键性酶的抑制或阻遏作用;通过基因过表达或基因定点突变,增加丙酮酸、天冬氨酸和高丝氨酸等前体物质的代谢通路;通过基因敲除或基因定点突变阻断或弱化

副产物合成途径,达到提高 L-苏氨酸产量的目的。在国外, Lee 等通过系统代谢工程改造大肠杆菌苏氨酸合成及代谢通路,构建的工程菌株产量达到 82.4 g/L^[8]。本研究以大肠杆菌 *E. coli* THR 为起始菌株,运用代谢工程方法、基因敲除、基因异源过表达等技术手段,修饰苏氨酸代谢途径和苏氨酸转运途径,提高 NADPH 生成量,获得了一株高产苏氨酸的大肠杆菌。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株与质粒

本研究中使用的菌种和质粒见表 1。

1.1.2 培养基

低盐 LB 培养基:参照文献[9],其中 NaCl 5.0 g/L。

LB 固体培养基:参照文献[9],另加琼脂 20.0 g/L。抗性筛选时加入终浓度为 70 mg/L 的氨苄青霉素或 25 mg/L 的卡那霉素(LBK₂₅)。

基本培养基(g/L): 葡萄糖 2.0, NH₄NO₃ 1.0, NaCl 1.0, KH₂PO₄ 0.5, Na₂HPO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.1。

摇瓶种子培养基(g/L): 蛋白胨 12.0, 酵母膏 8.0, NaCl 5.0, 用 30% NaOH 调节 pH 7.1, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

二级种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, H₃PO₄ 0.6 mL, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.6, FeSO₄·7H₂O 0.01, MnSO₄·4H₂O 0.01, CSL (TN) 0.6, 消泡剂 0.5 mL, 甜菜糖蜜(BM) 12.0 mL, 用氨水调节 pH 5.6, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min (葡萄糖和磷酸一起灭菌, 其余一起灭菌, 然后两者混合)。

发酵罐培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, H₃PO₄ 0.5 mL, MgSO₄·7H₂O 0.4, KCl 0.6, FeSO₄·7H₂O 0.01, MnSO₄·4H₂O 0.01, CSL (TN) 0.3, 消泡剂 0.5 mL, 甜菜糖蜜(BM) 18.0 mL, 甜菜碱(Betaine) 1.0, 用氨水调节 pH 5.0, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min (葡萄糖和磷酸一起灭菌, 其余一起灭菌, 然后二者合并)。

表 1 本研究中使用的菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特性 Characteristics	来源 Sources
菌株 Strains		
<i>E. coli</i> JM109	el4-(McrA-) RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F/traD36 proAB+lacq lacZ ΔM15]	Stratagene
<i>E. coli</i> THR	L-threonine producing strain (ILE ^r , AHV ^r)	Laboratory stock
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Wild type strain	Laboratory stock
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Wild type strain	Laboratory stock
<i>E. coli</i> THR/pEC-XK99E	<i>E. coli</i> THR strain carrying pEC-XK99E	This study
<i>E. coli</i> THR1	<i>E. coli</i> THRΔlysC	This study
<i>E. coli</i> THR2	<i>E. coli</i> THRΔlysCΔpfbk	This study
<i>E. coli</i> THR3	<i>E. coli</i> THRΔlysCΔpfbkΔsstT	This study
<i>E. coli</i> THR4	<i>E. coli</i> THR1 strain carrying pEC-XK99E-lysC ^{ibr}	This study
<i>E. coli</i> THR5	<i>E. coli</i> THR2 strain carrying pEC-XK99E-lysC ^{ibr} thrE	This study
<i>E. coli</i> THR6	<i>E. coli</i> THR3 strain carrying pEC-XK99E-lysC ^{ibr} thrEgapC	This study
质粒 Plasmids		
pEC-XK99E	Expression shuttle plasmid, kanamycin resistance	Laboratory stock
pEC-XK99E-lysC ^{ibr}	pEC-XK99E carrying lysC ^{ibr}	This study
pEC-XK99E-lysC ^{ibr} thrE	pEC-XK99E carrying lysC ^{ibr} and thrE	This study
pEC-XK99E-lysC ^{ibr} thrEgapC	pEC-XK99E carrying lysC ^{ibr} , thrE and gapC	This study

1.1.3 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶, 诺唯赞(南京)生物科技有限公司; 各种限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒以及核苷酸片段纯化试剂盒, 康润生物(北京)生物科技有限公司; 氨苄青霉素和卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂, 国药集团(上海)有限公司。

可见紫外分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 凝胶水平电泳仪, 北京六一仪器厂; 生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; 冷冻离心机, Beckman Coulter 公司; 高速离心机, Sigma 公司; 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 高效液相色谱(HPLC)系统, 安捷伦科技有限公司。

1.1.4 PCR 引物

基于 NCBI 数据库中 *E. coli* THR 基因组序列,

用 DNAMAN 软件设计用于各基因、敲除框的扩增和验证引物, 如表 2 所示。

1.2 方法

1.2.1 敲除 *lysC*、*pfkB*、*sstT* 基因

E. coli THR 菌株 *lysC* 基因的敲除过程如图 1 所示。第一步用 *kan* 基因置换待敲除靶基因: 以 pKD13 作为 PCR 模板, 使用引物 $\Delta lysC$ -F 和 $\Delta lysC$ -R 扩增获得 DNA 片段(包括 *lysC* 的上游和下游同源臂序列、*kan* 基因和 2 个 FRT 位点), 用 1 mm 电击杯在 1 800 V 电压下转化 *E. coli* THR/pKD46 感受态细胞中^[8]。电击后, 将细胞在 37 °C 孵育 2 h 后涂布在 LBK₂₅ 平板上。pKD46 在阿拉伯糖的诱导下表达重组蛋白, 介导敲除框同源臂基因和大肠杆菌基因组发生重组。培养 12 h 后挑取单个菌落, 使用两对检测引物进行 PCR 扩增, 确定敲除盒上、下游片段大小正确, 判定 *lysC* 敲除成功。第二步

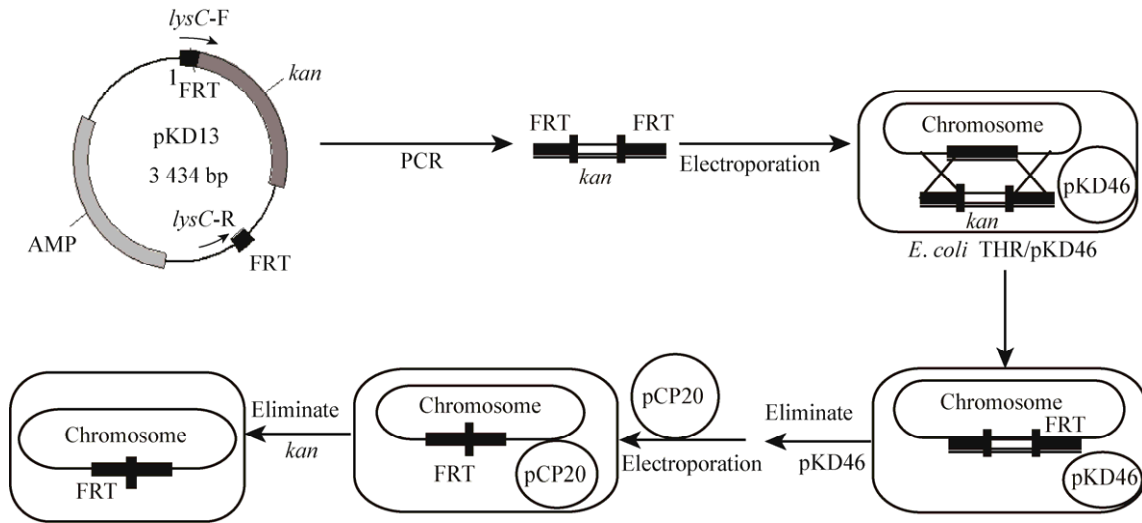
表 2 PCR 扩增引物

Table 2 Primers used for PCR

引物名称 Primers name	序列 Primers sequence (5'→3')	限制性酶切位点 Restriction sites
$\Delta lysC$ -F	<u>TAGTGACAAGAAAATCAATACGGCCCCGAAATATAGCTTCCAGGCCATACAGTAT</u> CGTCTTGAGCGATTGTG	-
$\Delta lysC$ -R	<u>CTCTTCCCTTGTGCCAAGGCTGAAAATGGATCCCCTGACACGAGGTAGTTGATAA</u> GCTGTCAAACATGAGA	-
<i>lysC</i> -F	TTACTCAAACAAATTAATGCA	-
<i>lysC</i> -R	ATGTCTGAAATTGTTGTCTCC	-
$\Delta pfkB$ -F	<u>TTCTTCACTTTCGGCTGATTCGGTGCCAGACTGAAATCAGCCTATAGGAGGAAAT</u> <u>CGTCTTGAGCGATTGTG</u>	-
$\Delta pfkB$ -R	<u>AACGCGTTGCCGACAGGTTGGTGATGATTCCCCAATGCTGGGGGAATGTTTTTGG</u> ATAAGCTGTCAAACATGAGA	-
Y $\Delta pfkB$ -F	GCTCCAATAAATCATATTG	-
Y $\Delta pfkB$ -R	CATGACTTTTGAGCATAGTC	-
$\Delta sstT$ -F	<u>AGATGCGTCGACAGAACGCACCAGGGATGTGCGACAACACAATGAAAGGATCGAA</u> <u>AACGTCTTGAGCGATTGTG</u>	-
$\Delta sstT$ -R	<u>ATTGATCCGTTTAAAGTTGAGAAAACCCCTTCCGCCGTAGACGAAAGGGGTAAAC</u> <u>AAGATAAGCTGTCAAACATGAGA</u>	-
Y $\Delta sstT$ -F	ATGACTACGCAACGTTTAC	-
Y $\Delta sstT$ -R	TTAATTACGCAGGGCG	-
<i>lysC</i> ^{br} -F	GGAATTCGTGGCCCTGGTTCGTACAG	<i>EcoR</i> I
<i>lysC</i> ^{br} -R	GGGGTACCTTAGCGTCCGGTGCCTG	<i>Kpn</i> I
<i>thrE</i> -F	GGGGTACCAAGGAGATATAATGTTGAGTTTTGCGACC	<i>Kpn</i> I
<i>thrE</i> -R	ACGCGTCGACTTACCTTTTATTACCGAATCTCTG	<i>Sal</i> I
<i>gapC</i> -F	ACGCGTCGACAAGGAGATATAATGGCAAAGATAGCTATTAATG	<i>Sal</i> I
<i>gapC</i> -R	ACGCGTCGACTTAACTATTTTGCTATTTTTCG	<i>Sal</i> I

注: 下划线是同源扩展的序列; 斜体为酶切位点序列; -: 无酶切位点。

Note: Underlined sequences are homologous extensions; Italics are sequences of restriction sites; -: No restriction sites.

图 1 敲除 *lysC* 基因流程Figure 1 Flow chart of making *lysC* knock-out

消除 *kan* 基因和 pCP20 质粒: 为了达到消除 *kan* 的目的,需要温敏型质粒 pCP20 携带并编码的 FLP 重组酶,该酶可以介导 2 个 FRT 位点之间的切除。电转 pCP20 质粒进入 *E. coli* $\text{THR}\Delta\text{lysC}::\text{kan}$ 菌株中,在 42 °C 培养 12 h 后稀释并涂布在 LB 固体培养基上。挑取单个菌落,分别点种在 LBK₂₅ 平板和 LB 平板,37 °C 培养 12 h,挑取仅能在 LB 平板上生长的单菌落用于 PCR 验证,片段大小正确即为 *E. coli* $\text{THR}\Delta\text{lysC}$ 。用同样的方法敲除 *pfkB*、*sstT*。

1.2.2 表达 *lysC^{fbr}*、*thrE*、*gapC* 质粒的构建与电转化

(1) 目的片段的扩增

依据 GenBank 中公布的大肠杆菌 *E. coli* MG1655、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 及丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 整个基因组序列设计扩增各个基因的引物(表 2),并使用上述 3 种基因组作为 PCR 模板来扩增目的基因。PCR 体系按说明书操作,PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,相应退火温度 30 s,72 °C 相应时间,35 个循环;72 °C 10 min;12 °C 保温。根据引物退火温度和目标片段长度设定实验中的退火温度和延伸时间见

表 3。引物合成和靶基因测序由安徽通用生物工程有限公司完成。

(2) 质粒的构建与转化

通过 PCR 扩增 *lysC^{fbr}*、*thrE* 和 *gapC* 基因以获得目标片段,以引物中设计的酶切位点进行酶切、片段纯化,获得酶切后的 *lysC^{fbr}*、*thrE* 和 *gapC* 基因片段。用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切 pEC-XK99E,纯化回收,与相同酶切后的 *lysC^{fbr}* 基因片段过夜酶连、转化,培养后挑取单个菌落进行菌落 PCR 及质粒酶切验证。选择构建正确的质粒(pEC-XK99E-*lysC^{fbr}*)用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切,经纯化后与 *thrE* 基因过夜酶连,经转化、验证获得 pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* 质粒。用 *Sal* I 单酶切,纯化、回收后与 *gapC* 基因连接、转化、菌落 PCR 酶切验证。最终构建质粒 pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC*,将成功连接并测序正确的重组质粒分别电转化宿主菌大肠杆菌,依次构建基因工程菌 *E. coli* $\text{THR}\Delta\text{lysC}/\text{pEC-XK99E-lysC}^{\text{fbr}}$ (即 *E. coli* THR4)、*E. coli* $\text{THR}\Delta\text{lysC}\Delta\text{sstT}/\text{pEC-XK99E-lysC}^{\text{fbr}}\text{thrE}$ (即 *E. coli* THR5)和 *E. coli* $\text{THR}\Delta\text{lysC}\Delta\text{sstT}\Delta\text{pfkB}/\text{pEC-XK99E-lysC}^{\text{fbr}}\text{thrEgapC}$ (即 *E. coli* THR6)。

表 3 PCR 反应相关信息

Table 3 The related information of PCR experiments

反应目的 Reaction purpose	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	退火温度 Annealing temperature (°C)	延伸时间 Extension time (s)	产物长度 Product length (bp)
扩增 <i>lysC</i> 敲除片段 Amplification of <i>lysC</i> knockout fragment	$\Delta lysC$ -F	$\Delta lysC$ -R	50	90	1 447
扩增 <i>pfkB</i> 敲除片段 Amplification of <i>pfkB</i> knockout fragment	$\Delta pfkB$ -F	$\Delta pfkB$ -R	53	60	1 039
扩增 <i>sstT</i> 敲除片段 Amplification of <i>sstT</i> knockout fragment	$\Delta sstT$ -F	$\Delta sstT$ -R	50	80	1 344
<i>lysC</i> 敲除验证 <i>lysC</i> knockout verification	<i>lysC</i> -F	<i>lysC</i> -R	57	—	—
<i>pfkB</i> 敲除验证 <i>pfkB</i> knockout verification	Y $\Delta pfkB$ -F	Y $\Delta pfkB$ -R	60	—	—
<i>sstT</i> 敲除验证 <i>sstT</i> knockout verification	Y $\Delta sstT$ -F	Y $\Delta sstT$ -R	55	—	—
扩增 <i>lysC^{fbr}</i> 片段 Amplification of <i>lysC^{fbr}</i> fragment	<i>lysC^{fbr}</i> -F	<i>lysC^{fbr}</i> -R	56	75	1 266
扩增 <i>thrE</i> 片段 Amplification of <i>thrE</i> fragment	<i>thrE</i> -F	<i>thrE</i> -R	60	90	1 485
扩增 <i>gapC</i> 片段 Amplification of <i>gapC</i> fragment	<i>gapC</i> -F	<i>gapC</i> -R	53	60	1 005

Note: —: No data.

1.2.3 目的基因的表达

将菌体在 37 °C、100 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8, 在 37 °C 以 1.0 mmol/L 的终浓度添加 IPTG, 诱导 4 h 后收集并处理菌体。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析蛋白表达情况。

1.2.4 5 L 发酵罐发酵苏氨酸

上罐操作实验流程: 菌种超低温冰箱 -80 °C 保存 → 平板活化 → 摇瓶培养 → 5 L 发酵罐培养菌种活化平板: 每个平板用 1 mL 移液器吸取 0.12 mL 菌液涂布平板, 于 37 °C 恒温培养 24 h; 摇瓶培养 (培养体积 100 mL/500 mL 三角瓶): 温度 37 °C, 转速 90 r/min, pH 6.8–7.2, 培养时间 5–7 h, 每 2 h 中间过程取样, 测定 pH 和 OD_{600} 值; 5 L 发酵罐培养 (培养体积 2 L): 底糖 30 g/L, 流加糖浓度 800 g/L、流加 10% 聚醚消泡剂、浓氨水控制 pH 7.00±0.05; 温度 37.0±0.1 °C, DO (Dissolved oxygen) >25%, 发酵罐培养 36 h。

1.2.5 测定方法

菌体浓度测定: 每 2 h 取一次样品, 吸出 0.2 mL

发酵液, 用稀盐酸稀释 25 倍, 用分光光度计测定 600 nm 处的吸光度。

酶活性测定: 天冬氨酸激酶(AK)活性测定参照文献[10]。3-磷酸甘油醛脱氢酶和苏氨酸转运蛋白活性测定参照文献[11]。

葡萄糖浓度测定: 采用 SBA-40C 型生物传感器测量。

苏氨酸浓度测定: 取 1 mL 发酵液, 10 000 r/min 离心 5 min 去除菌体, 经孔径 0.22 μ m 的滤膜过滤所得滤液, 用高效液相色谱法(HPLC)测定其中苏氨酸浓度^[12]。Agilent 1200 色谱仪, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse AAA, 流动相为乙腈-乙酸钠缓冲液, 流速 1 mL/min, 检测器为 DAD 二极管阵列检测器, 检测波长 360 nm, 色谱柱温度为 33 °C。

2 结果与分析

2.1 苏氨酸代谢途径中 *lysC*、*pfkB*、*sstT* 基因的敲除

大肠杆菌中含有 3 种天冬氨酸激酶: AKI、

AKII、AKIII, 分别由 *lysC*、*metL*、*thrA* 编码, 使天冬氨酸磷酸化后分别进入 L-Lys、L-Met、L-Thr 的合成途径。其中, 由 *lysC* 编码的 AKIII 其基因表达和酶活性都被 L-赖氨酸阻遏和抑制。敲除大肠杆菌的 *lysC* 基因并用谷氨酸棒状杆菌的天冬氨酸激酶 *lysC^{fbr}* 代替。大肠杆菌每生成 1 分子苏氨酸需要消耗 3 分子 NADPH, 因此通过删除磷酸果糖激酶 II 基因 *pfkB*, 增加进入磷酸戊糖途径(PPP)的碳通量以提供更多 NADPH。大肠杆菌苏氨酸吸收蛋白主要有 TdcC 和 SstT, 其中 SstT 发挥主要作用, 将 SstT 敲除将有效降低苏氨酸吸收速率, 减少胞内积累, 从而提高大肠杆菌苏氨酸生成量。

用 PCR 鉴定发现 *lysC* 被 *kan* 成功替换, 结果如图 2A 所示。在 42 °C 培养敲除成功的转化子, 消除温敏型辅助质粒 pCP20 及 *kan* 基因。用同样的方法敲除 *pfkB*、*sstT* 基因。

2.2 重组表达质粒的构建与表达

2.2.1 重组表达质粒的构建

相比大肠杆菌, 在谷氨酸棒杆菌中仅有一种天冬氨酸激酶, 它由 *lysC* 基因编码, 本实验试着敲除大肠杆菌自身天冬氨酸激酶(AKIII), 并异源表达谷氨酸棒杆菌中解除了反馈抑制的天冬氨酸激酶 *lysC^{fbr}*; 由于生产苏氨酸菌体需要大量 NADPH, 异源表达丙酮丁醇梭菌中由 *gapC* 编码的 NADP⁺

依赖型甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 增加代谢途径中 NADPH 的供应^[13]; 谷氨酸棒杆菌的 *thrE* 编码转运蛋白, 有效地将苏氨酸转运出细胞。这 3 种基因的有效转录促进苏氨酸合成和细胞外积累。因此本研究构建了质粒 pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC*, 用于这 3 个基因的过量表达, 见图 3。

构建质粒 pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC* 的验证如图 4 所示, pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* 用 *EcoR* I 单酶切得到 8 284 bp 片段, pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切得到 7 018 bp 和 1 266 bp 两个片段; pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* 用 *Kpn* I 单酶切得到 9 769 bp 的单片段, pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* 用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切得到 8 284 bp 和 1 485 bp 两个片段; pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC* 用 *Sal* I 单酶切得到 9 769 bp 和 1 005 bp 两个片段。3 个质粒单、双酶切后, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 条带大小均与预测结果一致。

2.2.2 目的基因的诱导表达

重组菌于 37 °C 培养, 至 *OD*₆₀₀ 为 0.6–0.8 时加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白表达, 4 h 后收集菌体, 对菌体进行超声破碎, 并通过 SDS-PAGE 电泳分析。以出发菌株 *E. coli* THR/pEC-XK99E 为空白对照, 检验目的基因在受体菌中的表达情况, 结果如图 5 所示, 与对照组相比, *E. coli* THR/pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* 在 47 kD 处出

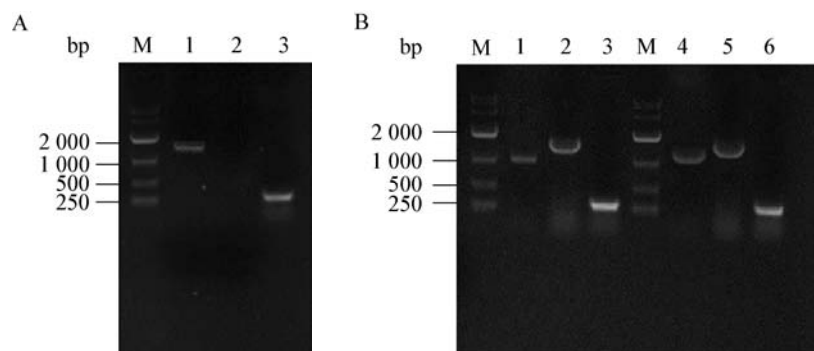


图 2 PCR 验证 *lysC* 基因的敲除(A)以及验证 *pfkB* 和 *sstT* 基因的敲除(B)

Figure 2 Confirmation of *lysC*, *pfkB* and *sstT* deletion in *E. coli* THR

Note: M: DL10000 DNA marker. A: 1: *E. coli* THR genomic DNA (1 350 bp); 2: *E. coli* THRΔ*lysC*::*kan* (No band); 3: *E. coli* THRΔ*lysC* (254 bp). B: 1: *E. coli* THR1 genomic DNA (1 090 bp); 2: *E. coli* THRΔ*lysC*Δ*pfkB*::*kan* (1 503 bp); 3: *E. coli* THRΔ*lysC*Δ*pfkB* (260 bp); 4: *E. coli* THR2 genomic DNA (1 415 bp); 5: *E. coli* THRΔ*lysC*Δ*pfkB*Δ*sstT*::*kan* (1 513 bp); 6: *E. coli* THRΔ*lysC*Δ*pfkB*Δ*sstT* (255 bp).

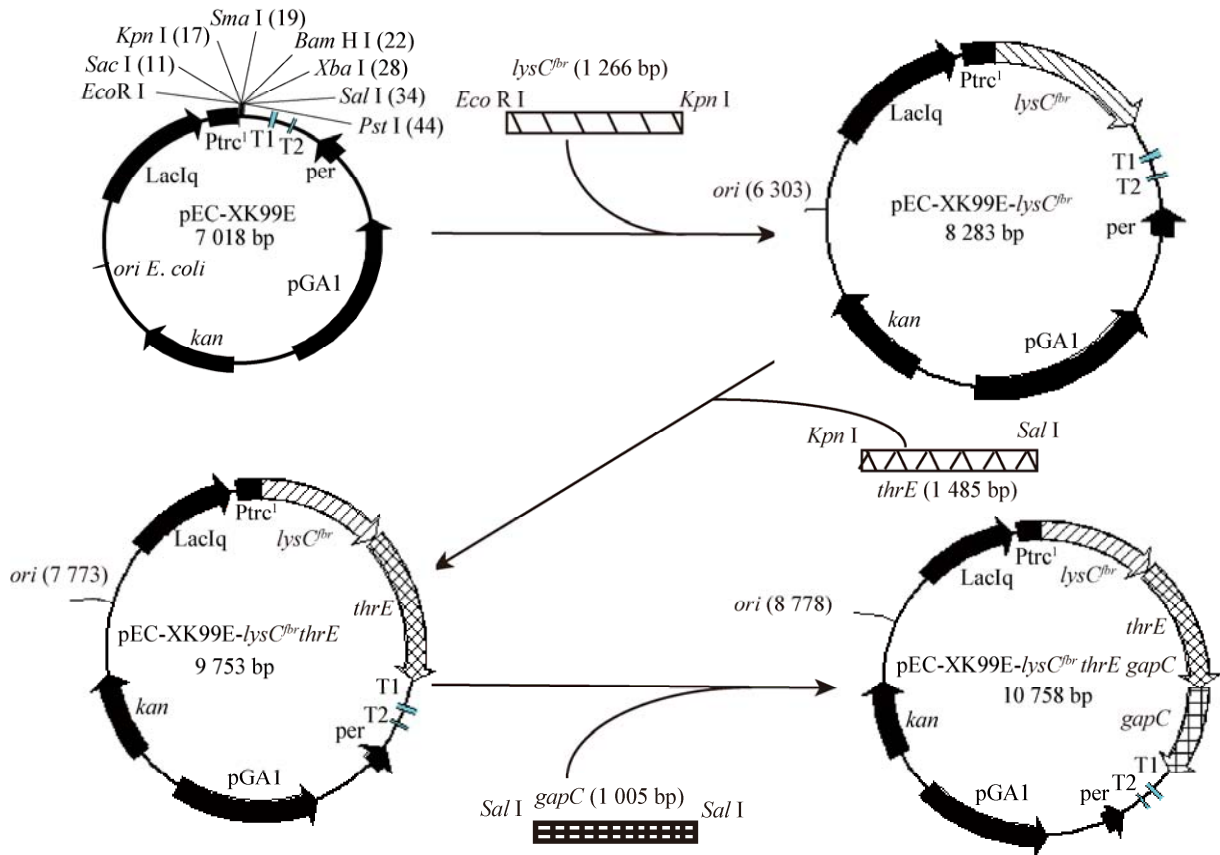


图3 pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC* 质粒构建图

Figure 3 Construction of pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC*

现特异性蛋白条带，与文献[14]报道一致。重组菌 *E. coli* THR/pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* 出现 2 条特异性条带，分别在 47 kD 和 52 kD 附近处，这与 *lysC^{fbr}*、*thrE* 基因编码的蛋白理论分子质量相一致。而重组菌 *E. coli* THR/pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC* 表达时，分别在 47、52 和 36 kD^[15-16] 处有明显的加粗变深的条带，说明靶基因在重组细菌中成功表达。

2.2.3 异源表达蛋白的酶活性测定

通过对粗酶液的蛋白定量和酶活性测定，获得相应酶的比酶活见表 4。从表 4 可以看出，与原始菌相比，异源表达 *lysC^{fbr}* 时 AK 的活性提高了 45.6 倍，而对另外两种酶的活性几乎无影响。多个基因串联表达时，ThrE、GADPH 的酶活均实现了从无到有的质变且活性提高明显。值得注意的是，

随着串联基因数量的增加，酶活会随之略有减弱，但均高于原始菌株。酶活性测定结果表明，来自谷氨酸棒杆菌和丙酮丁醇梭菌的基因均能在大肠杆菌中表达且活性良好。

2.3 多重基因修饰对 L-苏氨酸发酵产量的影响

将出发菌株 *E. coli* THR 和重组菌株 *E. coli* THR4、*E. coli* THR5、*E. coli* THR6 分别接入液体 LB 培养基，于 37 °C、90 r/min 条件下培养 30 h，每 2 h 取样，稀释适当倍数后测定 600 nm 处的吸光度，并对培养时间作图绘制生长曲线，对照为原始菌株 *E. coli* THR。如图 6 所示，3 株重组菌株在生长过程中的延迟期均比原始菌株 *E. coli* THR 有延长，原因可能在于较大的外源质粒对菌体生长造成压力，而且在工程菌对数期加入 IPTG 对菌体生长有抑制作用。值得注意的是，随着携带质粒大小的

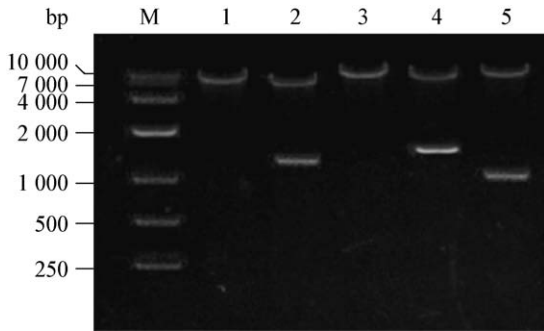


图 4 重组质粒的酶切验证电泳图

Figure 4 Enzymatic digestion of recombinant plasmid

注: M: DL10000 DNA marker; 1: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* 单酶切; 2: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* 双酶切产物 *lysC^{fbr}*; 3: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* 单酶切; 4: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* 双酶切产物 *thrE*; 5: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC* 单酶切产物 *gapC*.

Note: M: DL10000 DNA marker; 1: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* single digestion; 2: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}* double digestion product *lysC^{fbr}*; 3: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* single digestion; 4: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE* double digestion product *thrE*; 5: pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC* single digestion product *gapC*.

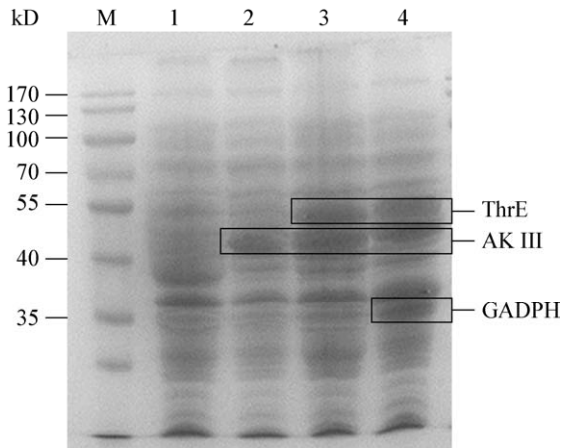


图 5 *E. coli* THR 中表达 *lysC^{fbr}*、*thrE* 和 *gapC* 的 SDS-PAGE 电泳检测图

Figure 5 Analysis of *lysC^{fbr}*, *thrE* and *gapC* expression in *E. coli* THR by SDS-PAGE gel electrophoresis

Note: M: Protein ladder; 1: *E. coli* THR/pEC-XK99E; 2: *E. coli* THR/pEC-XK99E-*lysC^{fbr}*; 3: *E. coli* THR/pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrE*; 4: *E. coli* THR/pEC-XK99E-*lysC^{fbr}thrEgapC*.

增加, 质粒对菌株延迟期延长的效果越不明显。这可能是由于少数几个非持家基因的缺失不会对菌体致死, 且质粒携带基因表达了相关蛋白。异源表达 *thrE* 可以促进苏氨酸分泌, 降低胞内苏氨酸浓度, 从而促使细胞吸收更多的碳源用于菌体生长和

表 4 异源表达蛋白的酶活性测定

Table 4 Determination of enzyme activity of heterologously expressed proteins (U/mg)

菌株 Strains	AK III	ThrE	GADPH
<i>E. coli</i> THR/pEC-XK99E	0.003	0.002	0.002
<i>E. coli</i> THR/pEC-XK99E- <i>lysC^{fbr}</i>	0.143	0.001	0.002
<i>E. coli</i> THR/pEC-XK99E- <i>lysC^{fbr}thrE</i>	0.125	0.478	0.001
<i>E. coli</i> THR/pEC-XK99E- <i>lysC^{fbr}thrEgapC</i>	0.116	0.298	0.254

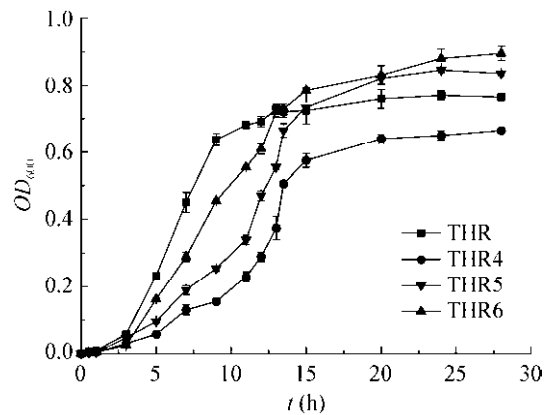


图 6 *E. coli* THR 及其重组菌株的生长曲线

Figure 6 The growth curve of *E. coli* THR and its recombinant strains

产物合成。另外, *gapC* 的过表达可以增加胞内 NADPH 的浓度, 作为多种反应的供氢体, 促进体内糖酵解、TCA 循环等关键代谢反应, 从而促进菌体生长。除 *E. coli* THR4 最终菌体长势弱于出发菌株外, *E. coli* THR5 和 *E. coli* THR6 最终的细胞密度均高于原始菌株。

经过 5 L 发酵罐发酵比较起始菌株与基因工程菌的生长和产酸情况。结果如图 6 所示, 改造后的菌株对数期均有延长, 比原始菌株晚 2-4 h 进入平稳期。由图 7 可知, 发酵 36 h 后, 相比 *E. coli* THR1、*E. coli* THR2、*E. coli* THR3 的最大生物量, *E. coli* THR4、*E. coli* THR5、*E. coli* THR6 均有所提高, 说明 *lysC^{fbr}*、*thrE*、*gapC* 均成功在宿主菌中表达, 并弥补了 *lysC*、*pfkB*、*sstT* 基因敲除带来的

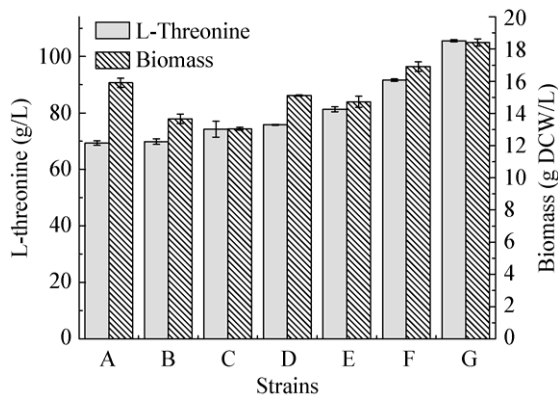


图7 基因改造对苏氨酸发酵的影响

Figure 7 Effect of genetic modification on threonine fermentation

Note: A: *E. coli* THR; B: *E. coli* THR1; C: *E. coli* THR2; D: *E. coli* THR3; E: *E. coli* THR4; F: *E. coli* THR5; G: *E. coli* THR6.

不利影响。发酵结束时, *E. coli* THR6 的苏氨酸产量显著高于对照组 *E. coli* THR, 其苏氨酸产量、糖酸转化率及单位产酸能力分别为 105.30 ± 0.50 g/L、43.20% 和 5.76 g/g DCW, 较对照组 (68.78 ± 1.18 g/L、30.25% 和 4.38 g/g DCW) 分别提高 54.4%、42.8% 和 31.5%。

原始菌株和工程菌株发酵液中 L-苏氨酸的含量由高效液相色谱测定, 结果如表 5 所示, 可知在原始菌株 *E. coli* THR 发酵液中 L-苏氨酸产量为 68.78 ± 1.18 g/L, 基因工程菌 *E. coli* THR4 和 *E. coli*

THR5 发酵液中 L-苏氨酸的产量分别为 80.68 ± 1.23 g/L 和 91.27 ± 0.67 g/L, 而工程菌 *E. coli* THR6 发酵液中 L-苏氨酸的产量达到 105.30 ± 0.50 g/L。这可能是由于 L-苏氨酸属于天冬氨酸家族氨基酸, 自 L-天冬氨酸起, 天冬氨酸激酶(AK)参与第一步催化反应。敲除 *E. coli* THR 的天冬氨酸激酶(AK III), 有利于增加苏氨酸合成通路的碳通量, 同时异源表达谷氨酸棒杆菌中解除了反馈抑制的天冬氨酸激酶 *lysC^{fbr}*, 达到增加 L-苏氨酸前体高丝氨酸的目的。在此基础上缺失大肠杆菌苏氨酸吸收蛋白 SstT, 同时异源表达谷氨酸棒杆菌中的苏氨酸分泌蛋白 ThrE, 从大肠杆菌苏氨酸转运系统出发, 有效减弱吸收系统的同时强化分泌系统, 更多地积累胞外 L-苏氨酸。由于大肠杆菌合成 1 分子 L-苏氨酸需要消耗 3 分子 NADPH, 所以, 从增加胞内 NADPH 的角度出发, 敲除磷酸果糖激酶 II 基因 *pfkB*, 增加进入磷酸戊糖途径的碳通量, 同时异源表达丙酮丁醇梭菌中由 *gapC* 编码的 NADP⁺ 依赖型甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 增加代谢途径中 NADPH 的供应。由于合成 L-苏氨酸的代谢途径较长, 影响因素较多, 单独对某个基因的改造对苏氨酸代谢通量影响不大, 从多个方面进行多基因改造才能获得一定的效果。

表5 菌株摇瓶分批补料发酵参数

Table 5 The parameters of fed-batch fermentation with strains

菌株 Strains	最大生物量 Maximum biomass (g DCW/L)	L-苏氨酸产量 L-Threonine (g/L)	糖酸转化率 Sugar and acid conversion rate (%)	单位产酸能力 Unit acid production capacity (g/g DCW)
<i>E. coli</i> THR	15.70±5.31	68.78±8.78	30.25	4.38
<i>E. coli</i> THR1	13.46±3.46	69.16±9.16	25.78	5.14
<i>E. coli</i> THR2	12.98±2.98	72.25±2.25	29.24	5.57
<i>E. coli</i> THR3	15.09±5.09	75.64±5.64	33.29	5.04
<i>E. coli</i> THR4	14.48±4.48	80.68±0.68	39.21	5.57
<i>E. coli</i> THR5	16.70±6.26	91.27±0.67	37.75	5.47
<i>E. coli</i> THR6	18.26±8.26	105.30±0.50	43.20	5.76

3 讨论与结论

大肠杆菌中含有 3 种天冬氨酸激酶 AKI、AKII、AKIII, 分别由 *lysC*、*metL*、*thrA* 编码, 使天冬氨酸磷酸化后分别进入 L-Lys、L-Met、L-Thr 的合成途径, 而谷氨酸棒杆菌中只有一种天冬氨酸激酶 *LysC*^[17]。苏氨酸转运系统中, 大肠杆菌具有 3 种分泌蛋白 RhtA、RhtB、RhtC 和 3 种吸收蛋白 TdcC、SstT 和 LIV-1, 而谷氨酸棒杆菌中只有 1 种苏氨酸摄入蛋白 *ThrE*^[18]。大肠杆菌中主要存在 NAD⁺依赖型 GADPH (NAD⁺-GADPH)^[18], 因此通过异源表达丙酮丁醇梭菌的 NADP⁺-GADPH (*gapC*)编码, 增加 NADPH 生成。基于代谢工程手段构建大肠杆菌用于苏氨酸的工业化生产已引起研究者的高度关注。梁媛等^[19]运用 Red 重组技术和基因过表达技术, 在过表达 *rhtC* 的同时敲除了 *sstT* 基因, 结果表明细胞中 L-苏氨酸流出能力得到有效增强, L-苏氨酸在细胞中浓度降低, 与原始菌株相比, L-苏氨酸的产量增加了 15.33%。杨冬美等^[20]从菌株 *E. coli* W3110 出发, 构建了 TdcC、SstT 和 LIV-1 系统单缺失和多缺失菌株, 并将重组质粒 pKKthrAC1034TBC 分别转入原始菌和重组菌, 重组菌苏氨酸吸收能力比 T04 降低了 12.97%, 胞外苏氨酸积累量比对照菌 W3110(pKKthrAC1034TBC)高出 172.5%。Siedler 等^[21]通过单敲除 *pfkA*、*pfkB*、*pgi* 及双敲除 *pfkA* 和 *pfkB*, 增加进入 PPP 途径的碳通量, 从而增加代谢过程中 NADPH 的生成。张雪等^[22]通过用高拷贝质粒载体 pMD19-T 表达 *thrA*^{345BC} 操纵子, 使野生型菌株 *E. coli* W3110 中 L-苏氨酸胞外积累量达到 9.2 g/L。Lee 等^[8]在一株 *E. coli* L-苏氨酸生产菌中, 通过对编码苏氨酸脱水酶(TD)的 *ilvA* 进行点突变 C290T, 降低了其催化活性, 并通过敲除染色体上的 *tdh* 基因达到减少 L-苏氨酸胞内消耗的目的。周茜^[7]修饰大肠杆菌 *E. coli* THRD 的乙醛酸循环, 敲除 *iclR* 并用不同强度的启动子取代 *aceBAK* 启动子, 苏氨酸产量和糖酸转化率分别增加了

20.61% 和 20.70%。

本研究通过敲除苏氨酸代谢途径中 *lysC*、*pfkB*、*sstT* 基因, 达到增加通往苏氨酸合成的碳通量、增加代谢过程中 NADPH 的产生和加快苏氨酸合成后向胞外转运的目的; 同时, 构建了表达质粒 pEC-XK99E-*lysC*^{thr}*thrEgapC*, 通过在 *E. coli* THR 菌株中过量表达 *lysC*^{thr}、*thrE* 和 *gapC* 等基因, 促进了苏氨酸前体物质的合成, 增加代谢途径中 NADPH 的供应和苏氨酸的胞外转运, 将大肠杆菌中苏氨酸的产量提高到 105 g/L, 获得了一株高产苏氨酸的大肠杆菌。

REFERENCES

- [1] Jia DS. Market status quo and the development foreground of threonine[J]. Feed China, 2006(1): 28-30 (in Chinese)
贾冬舒. 苏氨酸市场现状及发展前景[J]. 饲料广角, 2006(1): 28-30
- [2] Huang J, Xu QY, Chen N. The methods and study evolution of L-threonine production[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2007, 28(5): 88-92 (in Chinese)
黄金, 徐庆阳, 陈宁. L-苏氨酸的生产方法及研究进展[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2007, 28(5): 88-92
- [3] Sprenger GA. Aromatic amino acids[A]/Wendisch VF. Amino Acid Biosynthesis — Pathways, Regulation and Metabolic Engineering[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006: 93-127
- [4] Feng MQ, Zhai CJ. Deliberation on the preparation of L-threonine[J]. Hebei Journal of Industrial Science & Technology, 1999, 16(4): 15-18 (in Chinese)
冯美卿, 翟超进. L-苏氨酸制备方法评述[J]. 河北工业科技, 1999, 16(4): 15-18
- [5] Shen Q. Construction of threonine genetic engineering bacteria[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2002 (in Chinese)
沈琼. 苏氨酸基因工程菌的构建[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2002
- [6] Wang HZ, Wu X, Peng RH, et al. Method for producing L-threonine by *Escherichia coli*: CN, CN03151020[P]. 2005-03-23 (in Chinese)
王焕章, 吴新, 彭日荷, 等. 大肠杆菌生产 L-苏氨酸: 中国, CN03151020.5[P]. 2005-03-23
- [7] Zhou X. Construction of L-threonine-producing strains and optimization of fermentation process[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2016 (in Chinese)
周茜. L-苏氨酸生产菌的构建及发酵优化[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2016
- [8] Lee KH, Park JH, Kim TY, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3: 149

- [9] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT, trans. 3rd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2008 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2008
- [10] Shen Q, Huang XF, Wu HZ, et al. Cloning and expression of the *thr* operon and the detection of aspartokinase I activity[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2003, 10(3): 133-136 (in Chinese)
沈琼, 黄雪峰, 吴海珍, 等. 苏氨酸操纵子的克隆表达及天冬氨酸激酶的测活[J]. 药物生物技术, 2003, 10(3): 133-136
- [11] Bisswanger H. Practical Enzymology[J]. Translated by Liu XQ. Beijing: Chemical Industry Press, 2009 (in Chinese)
比斯瓦根 H. 酶学实验手册[J]. 刘晓晴, 译. 北京: 化学工业出版社, 2009
- [12] Zhou HY. Strain construction, metabolic regulation and process optimization for L-phenylalanine production[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2011: 53-55 (in Chinese)
周海岩. L-苯丙氨酸生产菌株的构建、代谢调控和发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2011: 53-55
- [13] Xu JZ. Breeding L-lysine hyper producer by *Corynebacterium glutamicum* based on metabolic engineering[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
徐建中. 基于代谢工程选育谷氨酸棒杆菌 L-赖氨酸高产菌[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2014
- [14] Mo XC, Pei JX, Guo Y, et al. Genome sequence of *Clostridium acetobutylicum* GXAS18-1, a novel biobutanol production strain[J]. Genome Announcements, 2015, 3(2): e00033-15
- [15] Yang JJ, Yang S. Comparative analysis of *Corynebacterium glutamicum* genomes: a new perspective for the industrial production of amino acids[J]. BMC Genomics, 2017, 18(S1): 940
- [16] Rieping M, Thierbach G, Van Der RME, et al. Process for the fermentative preparation of L-threonine: US, 6630332[S]. 2003-10-07
- [17] Dong XY, Wang XY. Advances in microbial metabolic engineering to increase L-threonine production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(12): 1233-1240 (in Chinese)
董迅衍, 王小元. 微生物生产 L-苏氨酸的代谢工程研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(12): 1233-1240
- [18] Yuzbashev TV, Vybornaya TV, Larina AS, et al. Directed modification of *Escherichia coli* metabolism for the design of threonine-producing strains[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2013, 49(9): 723-742
- [19] Liang Y, Yang SY, Liu HL, et al. Effect of transport proteins SstT and RhtC modification on L-threonine production in *Escherichia coli*[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(4): 99-103 (in Chinese)
梁媛, 杨书尧, 刘宏亮, 等. 大肠杆菌转运蛋白 SstT 和 RhtC 的改造对 L-苏氨酸产量的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(4): 99-103
- [20] Yang DM, Li H, Li YR, et al. Effects of TdcC, SstT and LIV-1 systems deletion of *Escherichia coli* on extracellular L-threonine accumulation[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 20-29 (in Chinese)
杨冬美, 李华, 李由然, 等. 大肠杆菌 TdcC、SstT 和 LIV-1 系统缺失对胞外 L-苏氨酸积累的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 20-29
- [21] Siedler S, Bringer S, Bott M. Increased NADPH availability in *Escherichia coli*: improvement of the product per glucose ratio in reductive whole-cell biotransformation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(5): 929-937
- [22] Zhang X, Yan JA, Yu L, et al. Construction of recombinant plasmids containing threonine operon and their effects on L-threonine accumulation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(5): 591-596 (in Chinese)
张雪, 闫继爱, 于雷, 等. 含苏氨酸操纵子重组质粒的构建及其对大肠杆菌 L-苏氨酸积累的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(5): 591-596