

增强乙醛酸循环对大肠杆菌合成 L-苏氨酸的影响

周茜, 郑会明, 刘辉, 谢希贤, 徐庆阳, 张成林, 陈宁

(天津科技大学生物工程学院, 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室, 天津 300457)

摘要: L-苏氨酸是人类必需氨基酸, 在医药、食品、饲料领域有广泛的应用。在 L-苏氨酸发酵生产过程中, 乙醛酸循环起到部分回补途径的功能。本实验利用 Red 重组技术, 以 L-苏氨酸生产菌 *Escherichia coli* THRD 为出发菌株, 构建了 *iclR* 基因缺失菌株 THRD $\Delta iclR$ 以及不同强度启动子替换 *aceBAK* 启动子的菌株 THRD P1 和 THRD P2。通过实时荧光定量 PCR 检测表明, 苹果酸合酶基因 (*aceB*) 的表达量分别是原菌的 1.89 倍、2.11 倍以及 2.96 倍。摇瓶发酵结果显示, THRD $\Delta iclR$ 的 L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别为 42.60 ± 1.23 g/L 和 32.77 g/g, 较原菌 THRD (35.32 ± 1.07 g/L 和 27.17 g/g) 分别提高 20.61% 和 20.70%。THRD P1 L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别为 36.50 ± 1.42 g/L 和 28.08 g/g, 较原菌 THRD (35.32 ± 1.07 g/L 和 27.17 g/g) 分别提高 3.34% 和 3.39%。而 THRD P2 8 h 后菌体生长停滞, L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别为 8.31 ± 1.31 g/L 和 20.78 g/g, 较原菌 THRD (35.32 ± 1.07 g/L 和 27.17 g/g) 分别降低了 76.47% 和 23.52%。综上所述, 适当增强乙醛酸循环有利于 L-苏氨酸的积累, 而过强的乙醛酸循环影响菌体的正常代谢。

关键词: 大肠杆菌; L-苏氨酸; 回补; 乙醛酸循环; 启动子替换

文章编号: 1673-9078(2015)10-109-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.019

Effect of Enhancing Glyoxylate Cycle on L-threonine Production in

Escherichia coli

ZHOU Qian, ZHENG Hui-ming, LIU Hui, XIE Xi-xian, XU Qing-yang, ZHANG Cheng-lin, CHEN Ning

(College of Biotechnology, National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: L-threonine, an essential amino acid, is widely used in the agricultural, pharmaceutical, and cosmetic industries. In the L-threonine fermentation process, the glyoxylate cycle functions as part of the feedback pathway. In this work, *Escherichia coli* THRD that can produce L-threonine were used as original strains. Red reconstruction technology was used to construct a strain lacking *iclR* (*Escherichia coli* THRD $\Delta iclR$) and THRD P1 and THRD P2, in which *aceBAK* promoter in *E. coli* THRD was replaced by promoters of various strength. Fluorescent quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of the *aceB* gene in the different strains was upregulated by 1.89-, 2.11-, and 2.96-fold, respectively, compared with the original strain. The results from fermentation in shaken flasks showed that the L-threonine and sugar-acid conversion rate of *E. coli* THRD $\Delta iclR$ were 42.60 ± 1.23 g/L and 32.77 g/g, respectively, which were 20.61% and 20.7% higher than those of the control strain THRD (35.32 ± 1.07 g/L and 27.17 g/g). The L-threonine and sugar-acid conversion rate of *E. coli* THRD P1 were 36.50 ± 1.42 g/L and 28.08 g/g, which increased by 3.34% and 3.39% from those obtained from the control strain, respectively. However, *E. coli* THRD P2 stopped growing after 8 h and resulted in L-threonine production of 8.31 ± 1.31 g/L and a sugar-acid conversion rate of 20.78 g/g, which were 76.47% and 23.52%, respectively, lower than those of the control strain THRD. In conclusion, moderate enhancement of the glyoxylate cycle benefited L-threonine accumulation, while excessive enhancement of glyoxylate cycle had a negative effect on the normal cell metabolism.

Key words: *Escherichia coli*; L-threonine; feedback; glyoxylate cycle; promoter replacement

L-苏氨酸是人类必需氨基酸, 在医药、食品、饲

收稿日期: 2014-12-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2012AA022102, 2012AA02A703)

作者简介: 周茜 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为氨基酸生产菌株的定向改造及发酵过程优化

通讯作者: 陈宁 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为代谢工程

料领域有广泛的应用^[1]。全球苏氨酸的年需求量约为 70 万 t, 2013 年中国苏氨酸产量约占全球市场的 60%, 成为全球最大的苏氨酸生产国。目前, 利用大肠杆菌直接发酵是 L-苏氨酸一种主要的工业化生产方式^[2]。

草酰乙酸作为前体物参与 L-苏氨酸的合成, 生物体中草酰乙酸的来源有三种方式: 二氧化碳的固定、

三羧酸循环以及乙醛酸循环。与谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 不同, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的草酰乙酸主要来源于三羧酸循环。据报道, 在以大肠杆菌为生产菌株的 L-苏氨酸发酵生产过程中, 乙醛酸循环可以起到部分回补途径的功能。大肠杆菌中 *aceBAK* 组成一个操纵子, 分别编码异柠檬酸裂合酶、苹果酸合成酶和异柠檬酸脱氢酶/磷酸化酶^[3-5], 其转录受蛋白 IclR (由 *iclR* 编码) 阻遏。只有当乙酸存在时, *aceBAK* 基因的转录才被激活。通过敲除 IclR 抑制物, 可以解除关键酶的反馈抑制, 增强乙醛酸循环^[6-8]。刘子鹤等^[9]考查了 *iclR* 基因敲除对琥珀酸生产菌株 TUQ8 的影响, 结果表明敲除菌株的生物量明显提高而副产物乙醇产率明显下降。Lee^[10]等敲除大肠杆菌 *iclR* 后发现其胞内草酰乙酸含量显著提高。由于草酰乙酸为 L-苏氨酸的合成前体, 因此增

强乙醛酸循环可能增加 L-苏氨酸的合成。

本文采用基因敲除和 *aceBAK* 启动子替换策略研究了不同程度增加乙醛酸循环代谢通量对 *Escherichia coli* THRD L-苏氨酸产量的影响, 相关研究未见报道。本文可为 L-苏氨酸及其他天冬氨酸族氨基酸生产菌株的改造提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 THRD 是 L-苏氨酸生产菌, 保藏在天津科技大学菌种保藏中心, 实验所涉及菌株和质粒见表 1, 主要的引物及序列见表 2。

表 1 本实验所用菌种与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and Plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	Efficiency competent cell	Lab stock
<i>E. coli</i> THRD	L-threonine producer (ILE ^L , AHV ^L)	Lab stock
<i>E. coli</i> THRD Δ iclR	ILE ^L , AHV ^L , <i>iclR</i>	This study
<i>E. coli</i> THRD P1	ILE ^L , AHV ^L , replacement <i>aceBAK</i> natural promoter with P _{trc-cgta}	This study
<i>E. coli</i> THRD P2	ILE ^L , AHV ^L , replacement <i>aceBAK</i> natural promoter with P _{trc-tata}	This study
pKD3	Cm ^R , Template vector	Lab stock
pKD46	Amp ^R , λ Red-expressing vector	Lab stock
pCP20	Amp ^R , Cm ^R , FLP-expressing vector	Lab stock
P _{trc-cgta} -T	Amp ^R , T-vector with P _{trc-cgta}	Lab stock
P _{trc-tata} -T	Amp ^R , T-vector with P _{trc-tata}	Lab stock

1.1.2 培养基

LB 培养基, 2-YT 培养基、SOC 培养基、M9 基本培养基参见分子克隆实验指南^[11]。

种子培养基: 葡萄糖 40 g/L, (NH₄)₂SO₄ 20 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, 酵母提取物 1 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L, MnSO₄ · H₂O 0.01 g/L, L-异亮氨酸 0.001 g/L, pH 7.0~7.2。

发酵培养基: 葡萄糖 40 g/L, (NH₄)₂SO₄ 18 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g/L, 酵母提取物 1 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L, MnSO₄ · H₂O 0.01 g/L, L-异亮氨酸 0.001 g/L, pH 7.0~7.2。

1.2 实验方法

1.2.1 *iclR* 基因的敲除

根据 GenBank 中 *E. coli* MG1655 的 *iclR* 基因序列, 采用 Primer Premier 5 设计引物分别扩增 *iclR* 基因的上、下游片段, 以质粒 pKD3 为模板扩增含有氯霉

素抗性基因片段。首先以 *E. coli* THRD 基因组和 pKD3 为模板, 分别扩增 *iclR* 上下游片段及氯霉素抗性基因。经琼脂糖凝胶电泳、切胶回收后按照等摩尔比混合作为 PCR 模板, 以 iclR-1 和 iclR-4 为引物进行重叠 PCR, 获得用于 *iclR* 基因敲除的片段 Δ iclR。

将纯化后的 Δ iclR 片段电转入含有 pKD46 的 *E. coli* THRD 的电转感受态中, 37 °C 复苏 1 h, 8,000 r/min, 离心 2 min 后涂布于氯霉素抗性 LB 平板 (30 μ g/mL)。待菌落长出后, 使用引物 iclR-1 和 iclR-4 进行菌落 PCR。

将质粒 pCP20 转入上述阳性转化子感受态中, 37 °C 复苏 1 h, 涂布于氨苄青霉素 LB 平板 (100 μ g/mL)。待菌落长出后, 使用鉴定引物 iclR-1 和 iclR-4 进行菌落 PCR, 将 PCR 验证抗性基因消除的阳性转化子接于 LB 培养基中, 42 °C 过夜培养, 划线分纯, 将每个单菌落同时转接 LB 平板和氨苄青霉素抗性平板, 挑选在氨苄青霉素抗性平板不长而在 LB 平板上

长的单菌落,再次 PCR 验证得到的敲除菌株,即为消除了氯霉素抗性基因并丢失 pCP20 的突变株^[12]。

表 2 本实验中用到的主要引物

Table 2 Main primers used in this study

Main oligonucleotides	Sequences (5'-3')	Purpose
pKD3-up	GGTTTCGTGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primers for amplifying chloromycetin resistance fragment
pKD3-down	GCAAGGCAACGCCATGGTCCATATGAATATCCT	
iclR-1	AACAAACCATACTGGCATAAACG	Primers for the knockout of <i>iclR</i>
iclR-2	CAGCCTACACAGCACGAAACCCTGCTGTTG	
iclR-3	GGACCATGGCGTTGCCTTGACGCGTGTATTT	
iclR-4	TCGCTCAATCTCATAATGCAGC	
aceB-cgta-1	GAATTTTTCCGCGATGTGGA	Primers for the construction of semi-constitutive promoter overlapping fragment
aceB-cgta-2	CAGCAGAAAGATCCGAAAACCTTCCCCACTGT	
aceB-cgta-3	GTTTTCCGGATCTTTCTGCTGTAGGCTGGAGC	
aceB-cgta-4	G TTCAGTCATGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	
aceB-cgta-5	GAAACAGACCATGACTGAACAGGCAACAACAAC	
aceB-cgta-6	ATTTTGCCTGCTTCATTGGTG	
aceB-tata-1	GAATTTTTCCGCGATGTGGA	Primers for the construction of constitutive promoter overlapping fragment
aceB-tata-2	CAGCAGAAAGATCCGAAAACCTTCCCCACTGT	
aceB-tata-3	GTTTTCCGGATCTTTCTGCTGTAGGCTGGAGC	
aceB-tata-4	G TTCAGTCATGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	
aceB-tata-5	GAAACAGACCATGACTGAACAGGCAACAACAAC	
aceB-tata-6	ATTTTGCCTGCTTCATTGGTG	
RT-aceB-1	CAACGACATTCTCGGCTCC	Primers for RT-PCR
RT-aceB-2	TTCGATGTA CTGCACAGCCAC	

1.2.2 *aceBAK* 基因启动子的替换

P_{trc} 是大肠杆菌常用的启动子,将其启动子中 *lacO*₁ 操纵子部分碱基进行定点突变,使原本的 GAGCGGATA 序列突变为 CAGCGGTTA 和 TAACGGTTA,突变后的启动子分别命名为 $P_{trc-cgta}$ 和 $P_{trc-tata}$ 。前者为组成型强启动子,后者为半组成型的启动子,转录强度低于 $P_{trc-tata}$ ^[13]。

根据 GenBank 中 *E. coli* MG1655 的 *aceBAK* 启动子序列,采用 Primer Premier 5 设计引物分别扩增上、下游片段,以质粒 $P_{trc-cgta}$ -T 为模板扩增含有氯霉素抗性+半组成型启动子片段,以质粒 $P_{trc-tata}$ -T 为模板扩增含有卡那霉素抗性+组成型启动子片段。以半组成型启动子替换为例,其中引物 aceB-cgta-2 和 aceB-cgta-3, aceB-cgta-4 和 aceB-cgta-5 拥有重叠区域。首先以 *E. coli* THRD 基因组为模板,分别扩增上游片段和下游片段;以 $P_{trc-cgta}$ -T 质粒为模板扩增中间片段。随后,回收各片段,上游,下游,中间抗性按照 1:1:1 的摩尔比混合后作为 PCR 模板,以 aceB-cgta-1 和 aceB-cgta-6 为引物,利用引物间的重叠片段,通过重叠 PCR 反应获得中间为抗性基因加启动子的同源线性片段。将纯化后的片段电转入含有 pKD46 的 *E. coli*

THRD 的电转感受中。采用方法 1.2.1 进行菌株筛选,采用鉴定引物 aceB-cgta-1 和 aceB-cgta-6 进行鉴定。

1.2.3 L-苏氨酸发酵

摇瓶发酵:将 *E. coli* THRD、THRD $\Delta iclR$ 、THRD P1、THRD P2 菌株经斜面活化后接种于装液量为 30 mL 的种子培养基中(500 mL 摇瓶),培养到 OD₆₀₀ 为 4~6 时,以 10% 接种量接种于 30 mL 发酵培养基中(500 mL 摇瓶)。用氨水调节 pH 维持在 6.7~7.0。发酵周期为 28 h,期间补加浓度为 60% 的葡萄糖。

1.2.4 分析方法

菌体生物量以菌体干重表示,取 10 mL 发酵液,13000 r/min 离心 20 min,菌体用蒸馏水洗涤 3 次后置于真空干燥箱中 80 °C 干燥至恒重,用分析天平称重。

葡萄糖浓度采用 SBA-40C(山东科学院生物研究所)生物传感仪测定。

L-苏氨酸测定采用高效液相分析系统。色谱分离条件:Agilent C₁₈(15 mm×4.6 mm, 1213.5 μm),2,4-二硝基氟苯柱前衍生测定,乙腈和乙酸钠溶液梯度洗脱,柱温 33 °C,流动相流速 1 mL/min,检测波长 360 nm,采用二元梯度分析。

1.2.5 总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR

根据 *aceB* 及 *E. coli* W3110 16S rDNA (*rnb*, 内参) 基因序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计用于实时定量 RT-PCR 引物 RT-*aceB*-1 和 RT-*aceB*-2 (表 2)。参照 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取总 RNA, 参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行反转录。RT-PCR 体系及方法参照 SYBR Premix EX-Taq™ II 试剂盒。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火和延伸共 34 s, 40 个循环。采用 $\Delta\Delta CT$ 相对定量法对 *aceB* 转录量进行分析。

1.2.6 数据分析

所有实验每组均设 3 个平行, 重复 3 次, 数据均以平均值 \pm 标准偏差表示, 采用统计软件 SPSS 12.0 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。图表中采用不同小写字母表示差异显著, 采用相同字母表示差异不显著。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株的鉴定

THRD $\Delta iclR$ 突变株的鉴定, 分别以 pKD3、THRD 基因组为模板, 以引物 pKD3-up、pKD3-down、*iclR*-1、*iclR*-2、*iclR*-3、*iclR*-4 进行 PCR, *iclR* 上游、下游、抗性片段 PCR 扩增大小分别为 378 bp、388 bp 和 1024 bp, 重叠 PCR 获得大小为 1790 bp 的 $\Delta iclR$ 片段。将 $\Delta iclR$ 片段电转化至 THRD 电感受态, 复苏 90 min 后涂布于氨苄青霉素培养基上, 挑取单菌落进行 PCR 验证, *iclR* 敲除阳性菌 PCR 产物大小为 1790 bp, 原菌 PCR 产物大小为 1207 bp, 结果如图 1a 所示。将 *E. coli* THRD $\Delta iclR$ 以鉴定引物 *iclR*-1 和 *iclR*-4 扩增出的 DNA 片段进行测序。测序结果显示, *iclR* 基因已被敲除, 并且没有发生碱基突变, 即基因敲除成功。

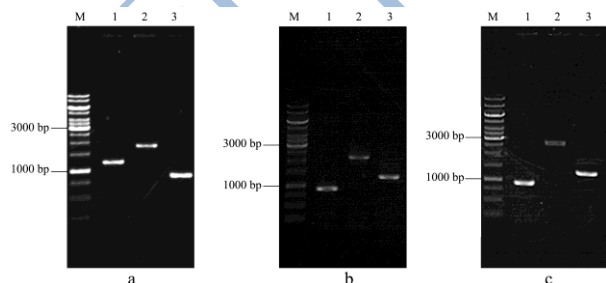


图 1 重组菌株的鉴定

Fig.1 Identification of recombinant strains

注: a: M: marker, 1: *E. coli* THRD, 2: $\Delta iclR$ 替换 *iclR*, 3: 删除抗性基因 *cat*; b: M: marker, 1: *E. coli* THRD, 2: $P_{trc-cgta}$ 替换 P_{aceBAK} , 3: 删除抗性基因 *cat*; c: M: marker, 1: *E. coli* THRD, 2: $P_{trc-tata}$ 替换 P_{aceBAK} , 3: 删除抗性基因 *cat*。

将 *aceB* 基因启动子替换为组成型启动子突变株的鉴定, 分别以 $P_{trc-cgta}$ -T、THRD 基因组为模板, 以 *aceB*-*cgta*-1、*aceB*-*cgta*-2、*aceB*-*cgta*-3、*aceB*-*cgta*-4、*aceB*-*cgta*-5、*aceB*-*cgta*-6 为引物进行 PCR, 上游、下游、抗性+ $P_{trc-cgta}$ 片段 PCR 扩增大小分别为 443 bp、458 bp 和 1328 bp, 重叠 PCR 获得大小为 2229 bp 的片段。将半组成型启动子替换片段电转化至 THRD 电感受态, 复苏 90 min 后涂布于氨苄青霉素培养基上, 挑取单菌落进行 PCR 验证, 阳性菌 PCR 产物大小为 2229 bp, 原菌 PCR 产物大小为 941 bp, 结果如图 1b 所示。将 THRD P1 以鉴定引物 *aceB*-*cgta*-1 和 *aceB*-*cgta*-6 扩增出的 DNA 片段, 进行测序。测序结果显示, 启动子已被成功替换。

将 *aceB* 基因启动子替换为组成型启动子突变株的鉴定方法与半组成型一致, 结果如图 1c 所示。将 THRD P2 以鉴定引物 *aceB*-*tata*-1 和 *aceB*-*tata*-6 扩增出的 DNA 片段, 进行测序, 测序结果显示, 启动子已被成功替换。

2.2 实时定量 PCR 分析

在大肠杆菌中, *aceBAK* 为一个操纵子, 通过实时定量 PCR 测定苹果酸合酶基因(*aceB*)的表达水平, 即能反映出整个操纵子的转录水平。在摇瓶发酵过程中取样, 提取菌体总 RNA 经反转录后进行实时定量 PCR 的测定。结果如图 2 所示, 在摇瓶发酵过程中, *aceB* 的表达水平在重组菌 THRD $\Delta iclR$ 、THRD P1、THRD P2 中较原菌 THRD 均有所提高, 表达量分别是原菌的 1.89 倍、2.11 倍和 2.96 倍。

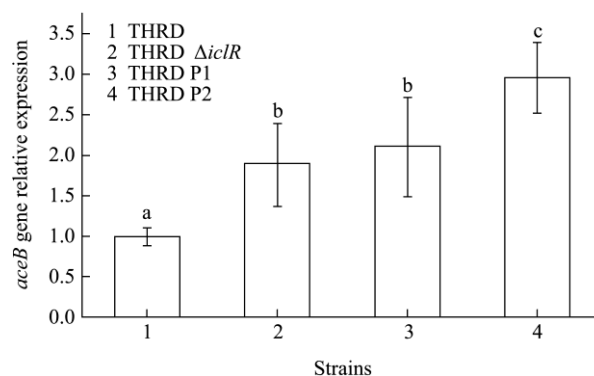


图 2 重组菌中 *aceB* 基因的相对转录量

Fig.2 Relative gene transcription quantitation of the *aceB* gene in the recombinant strains

2.3 *iclR* 的敲除及 *aceBAK* 启动子的替换对 L-苏氨酸发酵的影响

为了研究基因 *iclR* 的敲除对 *E. coli* THRD 发酵

L-苏氨酸的影响,进行了摇瓶分批补料发酵实验,发酵过程中定时取样测定菌体生物量、L-苏氨酸产量,实验结果如图3所示。由图可知,THRD、THRD $\Delta iclR$ 、THRD P1 生长趋势一致,即基因 $iclR$ 的敲除及半组成型启动子的替换不会对 *E. coli* THRD 生长造成影响。而 THRD P2 的生长明显受到抑制,发酵 8 h 后菌体生长基本处于停滞状态。由实时定量 PCR 的结果可知,组成型启动子的替换确实可使 *aceBAK* 基因的表达量提高,但菌体生长出现明显抑制。由此可见,适当的增强确实能起到部分回补的功能,但过度增强乙醛酸循环会造成代谢紊乱,致使菌体生长停滞的状态。造成菌株生长停滞的原因可能是:(1)乙醛酸循环的过度增强削弱了三羧酸循环强度,使得其重要中间代谢产物 α -酮戊二酸生成量减少。而 α -酮戊二酸是连接细胞碳-氮代谢的关键节点,其供应量不足势必会影响菌体的生长;(2)三羧酸循环是菌体利用糖或其他物质获得能量的最有效方式,三羧酸循环被削弱后不能为菌体生命活动提供足够能量,导致其生长停滞。

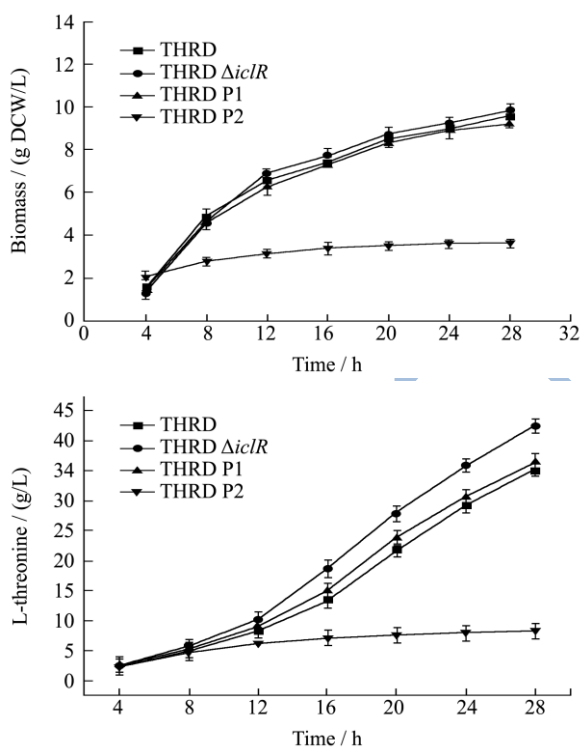


图3 基因改造对L-苏氨酸发酵的影响

Fig.3 Effects of gene modification on L-threonine fermentation

如图3和表3可知,在整个发酵过程中,THRD $\Delta iclR$ 的L-苏氨酸产量高于原菌THRD;THRD P1 L-苏氨酸产量较原菌THRD也略有提高,而THRD P2由于菌体生长受到明显抑制,L-苏氨酸产量较原菌THRD大幅下降。发酵28 h结束后,THRD $\Delta iclR$ 的L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别为 42.60 ± 1.23 g/L 和 32.77 g/g,较THRD (35.32 ± 1.07 g/L 和 27.17 g/g)分

别提高20.61%和20.70%。THRD P1 L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别为 36.50 ± 1.42 g/L 和 28.08 g/g,较THRD (35.32 ± 1.07 g/L 和 27.17 g/g)分别提高3.34%和3.39%。分批补料发酵结果, $iclR$ 的敲除有益于L-苏氨酸的生成,将*aceBAK*基因启动子替换为半组成型启动子后,L-苏氨酸的产量及转化率都略有提高但较THRD $\Delta iclR$ 低,而将*aceBAK*基因启动子替换为组成型启动子后,L-苏氨酸的产量明显下降,其原因可能是过度增强乙醛酸循环影响了菌株正常生长和代谢,进而降低了L-苏氨酸的积累。

表3 四菌株摇瓶分批补料发酵参数

Table 3 Parameters of fed-batch fermentation of the four strains

菌株	生物量 (g DCW/L)	L-苏氨酸 (g/L)	耗糖 (g/L)	糖酸转 化率/%
THRD	9.59 ± 0.40	35.32 ± 1.07	130	27.17
THRD $\Delta iclR$	9.84 ± 0.32	$42.60 \pm 1.23^*$	130	32.77^*
THRD P1	9.27 ± 0.21	36.50 ± 1.42	130	28.08
THRD P2	$3.65 \pm 0.21^*$	$8.31 \pm 1.31^*$	40*	20.78*

注: *表示与对照组原菌 THRD 相比,有显著性差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

本文采用敲除*aceBAK*阻遏蛋白编码基因*iclR*及替换其启动子的手段研究了不同程度地增强乙醛酸循环对*E. coli* THRD合成L-苏氨酸的影响。结果表明,THRD $\Delta iclR$ 和THRD P1 L-苏氨酸产量得到不同程度地提高,THRD P2 L-苏氨酸产量大幅下降,菌体生长出现停滞。说明适当增加乙醛酸循环代谢通量能够有效提高L-苏氨酸产量。

参考文献

- [1] Rieping M, Hermann T. L-Threonine [M]. Springer Berlin Heidelberg, New York, 2006
- [2] Debabov V G The threonine story [J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2003, 79: 113-136
- [3] Komberg H L, Krebs H A. Synthesis of cell constituents from C₂-units by modified tricarboxylic acid cycle [J]. Nature, 1957, 179: 988-991
- [4] Wang Z X, Christian O B, Steinbuchel A. The glyoxylate bypass of *Ralstonia eutropha* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 11240: 1-9
- [5] Yamamoto K, Ishihama A. Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR [J]. Molecular Microbiology, 2003, 47:183-194
- [6] Antonio J, Krell T, Guazzaroni M E, et al. Members of the

- iclR* family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30: 157-186
- [7] Sunnarborg A, Klumpp D, Chung T, et al. Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR* [J]. Journal of Bacteriology, 1990: 2642-2649
- [8] Cortay J C, Negre D, Galinier A, et al. Regulation of the acetate operon in *Escherichia coli*: purification and functional characterization of the IcIR repressor [J]. The EMBO Journal, 1991, 10: 675-679
- [9] 刘子鹤,王庆昭.*iclR* 基因敲除对大肠杆菌产琥珀酸的影响 [EB/OL]. 中国科技论文在线 [2011-01-03].<http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/20110103>
LIU Zi-he, WANG Qing-zhao. The effect of *iclR* knock out on succinic acid production of *Escherichia coli* [EB/OL]. Sciencepaper Online [2011-01-03]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/20110103>
- [10] Lee K H, Park J H, Lee S Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production [J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3:149
- [11] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W 主编,黄培堂,等,译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,2002
Sambrook J, Russell D W, eds. Huang P T, et al ,trans. Guide to Molecular Cloning Experiments [M]. Beijing: Science Press, 2002
- [12] 张雪,温廷益.Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展[J].中国生物工程杂志,2008, 28(12):89-93
ZHANG Xue, WEN Ting-yi. Advances in genetically modified of *Escherichia coli* Red recombination system [J]. Chinese Journal of Biological Engineering, 2008, 28(12): 89-93
- [13] Tuhin S M, Ramesh K J, Charlie E M, et al. Exploring the sequence-function relationship in transcriptional regulation by the *lacO*₁ operator [J]. The FEBS Journal, 2012, 279: 2534-2543