

# 大肠杆菌转运蛋白 SstT 和 RhtC 的改造对 L-苏氨酸产量的影响

梁媛<sup>1</sup>, 杨书尧<sup>1</sup>, 刘宏亮<sup>1</sup>, 郝小明<sup>2</sup>, 林海龙<sup>2</sup>, 谢希贤<sup>1</sup>, 陈宁<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室, 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津 300457) (2. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 100020)

**摘要:** L-苏氨酸是一种必需氨基酸, 广泛应用于食品、医药和饲料等领域。有报道表明降低胞内 L-苏氨酸浓度, 解除其对合成途径酶的反馈作用, 有利于提高 L-苏氨酸产量, 因此, 本实验利用 Red 重组技术和基因过表达技术, 以 L-苏氨酸生产菌 *Escherichia coli* TRFC 为出发菌株, 成功构建了 TRFC $\Delta$ ssT 和 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC。摇瓶发酵结果显示, 与原菌相比, TRFC $\Delta$ ssT 的 L-苏氨酸产量较原菌提高了 4.00%, TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的 L-苏氨酸产量较 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28 提高了 18.16%。此外, 经检测发现重组菌株胞内 L-苏氨酸浓度均低于原菌。最后进行了 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的 5 L 分批补料发酵实验, 其 L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别较原菌提高了 15.33% 和 16.14%。综上所述, 通过改造 L-苏氨酸转运系统的 SstT 和 RhtC 蛋白, 能有效地增强细胞内 L-苏氨酸外排能力, 降低细胞内 L-苏氨酸的浓度, 进而有利于 L-苏氨酸产量的提高。

**关键词:** 大肠杆菌; L-苏氨酸; 吸收转运蛋白; 输出转运蛋白

文章编号: 1673-9078(2014)4-99-103

## Effect of Transport Proteins SstT and RhtC Modification on L-threonine Production in *Escherichia coli*

LIANG Yuan<sup>1</sup>, YANG Shu-yao<sup>1</sup>, LIU Hong-liang<sup>1</sup>, HAO Xiao-ming<sup>2</sup>, LIN Hai-long<sup>2</sup>, XIE Xi-xian<sup>1</sup>, CHEN Ning<sup>1</sup>

(1. College of Biotechnology of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin 300457, China) (2. COFCO Nutrition and Health Research Institute Co., Ltd., Beijing 100020, China)

**Abstract:** L-threonine is an essential amino acid and has wide application in food, pharmaceutical and feed fields. It has been reported that the reduction of the intracellular L-threonine concentration could remove the feedbacks on the enzymes in L-threonine synthetic pathway, which was benefit for L-threonine production. Hence, in this work, gene *ssT* was deleted in *E. coli* TRFC, an L-threonine producer, by Red recombination technology and gene *rhtC* was over expressed in TRFC $\Delta$ ssT. Compared to the control strain TRFC, TRFC $\Delta$ ssT was found to produce 4% more L-threonine. And compared to TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28, TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC produced 18.16% more L-threonine in shake flask fed-batch fermentation. Besides, the intracellular L-threonine concentrations of all mutants were lower than the control strains. Finally, in the 5 L fed-batch fermentation, L-threonine production and yield on glucose of TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC were 15.33% and 16.14% higher than those of TRFC, respectively. The results suggested that modification of transport system could effectively decrease the intracellular L-threonine concentration and enhance the excretion of internal synthesized L-threonine, and could be benefit for L-threonine production.

**Key words:** *Escherichia coli*; L-threonine; uptake carrier; export carrier

L-苏氨酸是一种必需氨基酸, 广泛应用于医药、

收稿日期: 2013-11-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2012AA022102、2012AA02A703); 国家重点基础研究发展计划 (2013CB733901)

作者简介: 梁媛(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 主要从事氨基酸生产菌的定向改造及发酵过程优化的研究

通讯作者: 陈宁(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 主要从事代谢控制发酵的研究

食品和饲料等领域, 并且其需求量日益增加<sup>[1]</sup>。目前, L-苏氨酸生产方法主要包括蛋白质水解法、化学合成法和微生物发酵法, 其中微生物发酵法是常用方法, 该方法所用生产菌株主要为大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌<sup>[2]</sup>。

在 L-苏氨酸发酵过程中, 当胞内 L-苏氨酸的浓度积累到一定程度时, 会对其合成途径中的关键酶(如高丝氨酸脱氢酶、苏氨酸合成酶等)产生反馈作用,

进而抑制 L-苏氨酸的合成<sup>[3]</sup>。Reinscheid<sup>[4]</sup>等在谷氨酸棒杆菌中过表达 L-苏氨酸合成途径关键酶高丝氨酸脱氢酶和高丝氨酸激酶的编码基因 *hom* 和 *thrB*，经检测发现，随着基因转录量的增加，胞内 L-苏氨酸浓度显著增加，但其胞外 L-苏氨酸浓度变化却不明显，推测 L-苏氨酸的输出是限制谷氨酸棒杆菌生产 L-苏氨酸的限制性因素。随后，Kruse<sup>[5]</sup>和 Simic<sup>[6]</sup>等也提出 L-苏氨酸的分泌是其发酵过程的瓶颈，改造 L-苏氨酸转运系统以减少胞内 L-苏氨酸浓度从而增加其合成。也有报道称改造氨基酸转运系统有益于 L-色氨酸<sup>[7]</sup>和 L-异亮氨酸<sup>[8-9]</sup>的积累。

L-苏氨酸的胞内浓度由其分泌及摄取的速率共同决定。目前，在大肠杆菌中已发现 3 种与苏氨酸分泌有关的透性酶<sup>[10]</sup>，即 RhtA、RhtB 和 RhtC（分别由基因 *rhtA*、*rhtB* 和 *rhtC* 编码）。有报道表明，分别过表达上述三种基因均能增加 L-苏氨酸的合成，但以过表达 *rhtC* 基因效果最好<sup>[5, 11]</sup>。目前已报道的 L-苏氨酸吸收蛋白主要包括 SstT 蛋白、TdcC 蛋白（分别由 *sstT*、*tdcC* 基因编码）以及 LIV1 系统等，其中 SstT 起主要

作用，TdcC 蛋白在无氧条件下才被激活而 LIV1 系统对 L-苏氨酸专一性识别能力较差，对其摄取效果不明显<sup>[12]</sup>。Kruse 等<sup>[12]</sup>敲除大肠杆菌 VL334PyN7 中 *sstT* 基因，发现 L-苏氨酸吸收速率大幅降低，L-苏氨酸生成量显著增加。综上，对 L-苏氨酸转运系统进行改造能够增加其分泌并减少胞内积累，从而达到增加其产量的目的。因此，本文利用基因工程技术对 L-苏氨酸生产菌 *Escherichia coli* TRFC 转运系统 SstT 和 RhtC 进行改造，敲除其 *sstT* 基因并过表达 *rhtC* 基因，较为全面地考察了该转运系统的改造对 L-苏氨酸发酵的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

L-苏氨酸生产菌 *E. coli* TRFC 于天津科技大学微生物种保藏管理中心保存，保藏号为 TCCC17001。实验涉及的菌株及质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株	特性	特性
<i>E. coli</i> DH5a	Efficiency competent cell	Lab stock
<i>E. coli</i> TRFC	ILE <sup>L</sup> , AHV <sup>r</sup> , hrABC+Str <sup>R</sup>	Lab stock
<i>E. coli</i> TRFCΔsstT	ILE <sup>L</sup> , AHV <sup>r</sup> , thrABC+Str <sup>R</sup> , ΔsstT	This study
<i>E. coli</i> TRFCΔsstT+pSTV28	ILE <sup>L</sup> , AHV <sup>r</sup> , thrABC+Str <sup>R</sup> , ΔsstT, Cm <sup>R</sup>	This study
<i>E. coli</i> TRFCΔsstT+pSTV28-rhtC	ILE <sup>L</sup> , AHV <sup>r</sup> , thrABC+Str <sup>R</sup> , ΔsstT, rhtC+Cm <sup>R</sup>	This study
pSTV28	Cm <sup>R</sup> , cloning vector	Lab stock
pSTV28-rhtC	pSTV28 carrying rhtC gene	This study
pKD3	Cm <sup>R</sup> , Template vector	Lab stock
pKD46	Amp <sup>R</sup> , λ Red-expressing vector	Lab stock
pCP20	Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , FLP-expressing vector	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。

种子培养基：Glucose 40 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, Yeast Extract 1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, L-ILE 0.001 g/L, pH 7.0~7.2。

发酵培养基：Glucose 40 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L, Yeast Extract 1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, L-ILE 0.001 g/L, pH 7.0~7.2。

#### 1.1.3 主要试剂

限制内切酶、T4 连接酶，购自 Fermentas 公司。

基因组提取、质粒提取试剂盒，均购自博迈德公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

采用 Primer 5.0 根据 GenBank 中 *E. coli* MG1655 基因 *sstT* 序列信息、*rhtC* 序列信息、pSTV28 多克隆位点序列设计引物，由华大基因公司合成（表 2）。

#### 1.2.2 含 pKD46 电转感受态的制备与电转

挑取含 pKD46 的 *E. coli* TRFC 单菌落于 5 mL 2-YT 液体培养基中，30 °C 培养过夜。1% 接种量转接至 100 mL 2-YT 培养基中，震荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.1~0.2 时，加入 L-阿拉伯糖（终浓度 1 mM），继续培养至 OD<sub>600</sub>=0.6~0.7，冰上预冷，7000 r/min 离心 10 min，

用 10%甘油洗 4 次, 重悬于 600  $\mu\text{L}$  10%甘油中, 每管 50  $\mu\text{L}$ ,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。

表 2 引物

Table 2 Primers

引物	序列 (5'-3')
sstT-up	5'-ATGACTACGCAACGTTACCCGGGG
	CTATTCCGGCGTCTGGCTCATGGCAGCCT
sstT-down	GGTGCCATACCAAACGACGAGC-3'
	5'-CGGCAGCTTGCCAGGCAGAAGAC
sstT-jd-up	GATCGTCTGGCAAATAGCGCCCTGCGTAAT
	TAAAGCGATTGTGTAGGCTGGAG-3'
sstT-jd-down	5'-ACAGAACGCACCAGGGAT-3'
	5'-TCCGCCGTAGACGAAAG-3'
rhtC-up	5'-GACGGGATCCGATGGCGATG
	ACGAAGAGTAG-3' BamH I
rhtC-down	5'-CGCCAAGCTTCGCCATTATCCGA
	CTTACTCTG-3' HindIII

将同源臂引物扩增的氯霉素抗性基因片段于感受态细胞混合, 于 2500 V, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$  条件下电击, 电击后迅速加入 1 mL SOC 培养基中, 200 r/min,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 2 h 之后涂布于含有氯霉素 (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性平板上, 筛选阳性转化子。

### 1.2.3 抗性基因及 pCP20 质粒的消除

将 pCP20 转化入含氯霉素抗性的重组子,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  复苏 1 h, 涂布于氨苄青霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性平板上。使用鉴定引物对转化子进行菌落 PCR, 将筛选得到的阳性转化子接种于 LB 培养基中,  $42\text{ }^\circ\text{C}$  培养过夜, 稀释涂布于无抗平板上, 对单菌落进行氨苄青霉素抗性检测, 挑选对氨苄青霉素敏感的菌株, 即为消除质粒的重组菌株。

### 1.2.4 含质粒 pSTV28-rhtC 生产菌的构建

将 rhtC 基因 PCR 产物切胶回收后连接至 pMD18-T 载体, PCR 筛选出阳性转化子。提取质粒, 用 Hind III 和 BamH I 酶切质粒 pMD18-T-RhtC 和 pSTV28, 连接转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。筛选转化子、提取质粒及酶切验证, 得到重组质粒 pSTV28-rhtC。

### 1.2.5 L-苏氨酸发酵

摇瓶: 将 *E. coli* TRFC、TRFC $\Delta$ SstT、TRFC $\Delta$ sstT+pSTV28、TRFC $\Delta$ sstT+pSTV28-rhtC 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 12 h 后以 10%接种量接种于 30 mL 发酵培养基中 (500 mL 摇瓶), 每组 3 个平行。根据显色剂颜色, 调节 pH 维持在 6.7~7.0。发酵周期为 36 h, 期间补葡萄糖。

5 L 发酵罐: 吸取适量灭菌的去离子水于 3 支新

鲜的活化斜面, 将所有菌悬液接入 5 L 发酵罐 (装液量为 2 L) 中。种子培养初始通气量 1 L/min, 搅拌转速为 200 r/min, 通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0 左右, 培养温度  $36.5\text{ }^\circ\text{C}$ , 培养至  $\text{OD}_{600}=12\sim 14$  时, 按按 13%接种量弃掉多余的种子培养基, 接入新的发酵培养基, 开始发酵。发酵过程通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0 左右, 培养温度  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 。当培养基中葡萄糖浓度将至一定值时, 将 80%葡萄糖溶液以一定脉冲速度流加至培养基中以维持发酵液中葡萄糖浓度在菌体所需浓度范围内。

### 1.2.6 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 次后置真空干燥箱中  $80\text{ }^\circ\text{C}$  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  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), 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  $33\text{ }^\circ\text{C}$ , 流动相流速 1 mL/min, 检测波长 360 nm。

### 1.2.7 胞内 L-苏氨酸测定

胞内 L-苏氨酸萃取方法见参考文献<sup>[13]</sup>。在 M9 培养基  $37\text{ }^\circ\text{C}$  下 200 r/min 过夜培养, 5500 r/min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  离心 10 min 收集菌体 0.9%生理盐水洗菌两次, 重悬于预热的 M9 基本培养基中, 随后每 4 h 取样收集菌体。用 0.9%生理盐水洗菌两次, 加入 20%高氯酸, 超声混匀后加 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  中和, 13000 r/min 离心 2 min, 上清液用 HCl (终浓 0.02 M) 稀释后过滤, 滤液即可用于胞内苏氨酸测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因 sstT 的敲除对 *E. coli* TRFC 发酵 L-苏氨酸的影响

为了研究 sstT 的缺失对 L-苏氨酸发酵的影响, 进行了摇瓶分批补料发酵, 发酵过程中定时取样测定菌体生物量、L-苏氨酸产量。结果如图 1 和表 3 所示。

由图 1 和表 3 可知, TRFC 和 TRFC $\Delta$ sstT 生长趋势一致, 即基因 sstT 的敲除不会对 *E. coli* TRFC 生长造成影响。而在整个发酵过程中, TRFC $\Delta$ sstT 的 L-苏氨酸产量略高于原菌 TRFC。发酵结束时, 其 L-苏氨酸产量及糖酸转化率分别为  $40.02\pm 1.39\text{ g/L}$  和  $28.22\text{ g/g}$ , 较 TRFC ( $38.48\pm 1.59\text{ g/L}$  和  $27.35\text{ g/g}$ ) 分别提高

4.00%和 3.18%。而 Ikeda 和 Katsumata<sup>[14]</sup>也发现, 在具有芳香族氨基酸合成能力的突变菌中, 破坏芳香族氨基酸的吸收蛋白有利于芳香族氨基酸产量的提高。随后, 他们在另一株色氨酸合成量略高的菌株中发现, 降低 50%的色氨酸吸收蛋白活性, 色氨酸产量提高了 10~20%<sup>[15]</sup>, 证明了阻止胞外氨基酸的吸收有利于菌株氨基酸合成能力的提高。这可能是由于阻止胞外氨基酸的重吸收可降低胞内氨基酸浓度, 有益于减弱高浓度氨基酸对合成途径中酶的反馈作用, 从而有利于氨基酸合成。

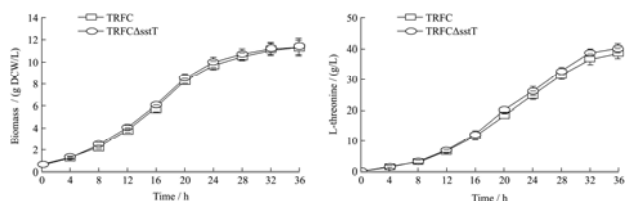


图 1 基因 sstT 的敲除对 L-苏氨酸发酵的影响

Fig.1 Effects of sstT deletion on L-threonine fermentation

## 2.2 基因 rhtC 的过表达对 E. coli TRFC 发酵 L-苏氨酸的影响

将构建好的重组菌株 TRFCΔsstT+pSTV28-rhtC 和对照菌 TRFCΔsstT+pSTV28 进行摇瓶分批补料发酵, 考察 rhtC 的过表达对 L-苏氨酸发酵的影响, 结果如图 2 和表 3 所示。

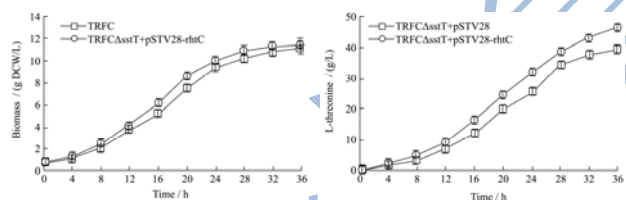


图 2 基因 rhtC 的过表达对 L-苏氨酸发酵的影响

Fig.2 Effects of rhtC overexpress on L-threonine fermentation

由图 2 和表 3 可知, TRFCΔsstT+pSTV28 生长略慢于 TRFCΔsstT+pSTV28-rhtC, 其原因可能是基因的复制和表达需要额外消耗能量和营养物质, 从而对菌体的生长产生一定的负担。在整个发酵过程中, 从 4 h 开始两个菌株的 L-苏氨酸产量有明显差异。发酵结束时, 与 TRFCΔsstT+pSTV28 相比, TRFCΔsstT+pSTV28-rhtC 的 L-苏氨酸产量和糖酸转化率分别提高了 18.16%和 19.76%。这与之前 Diesveld<sup>[11]</sup>在谷氨酸棒杆菌中分别过表达 L-苏氨酸分泌有关基因时, 胞内 L-苏氨酸输出速率及 L-苏氨酸产量均有大幅度提高的报道是一致的。这可能是由于加强输出蛋白的表达, 有利于促进菌体以更快的速率分泌 L-苏氨酸, 解除了胞内 L-苏氨酸对合成途径的反馈作用, 从而有利于碳

代谢流向 L-苏氨酸合成。

表 3 各菌株摇瓶分批补料发酵

Table 3 The fed-batch fermentation with all strains

菌株	生物量 (g DCW/g)	L-苏氨酸 (g/L)	糖酸转化率 (g/g)
TRFC	11.27±0.68	38.48±1.59	27.35
TRFCΔsstT	11.30±0.72	40.02±1.39	28.22
TRFCΔsstT+pSTV28	11.18±0.59	39.43±1.52	28.08
TRFCΔsstT+pSTV28-rhtC	11.23±0.65	46.59±1.27	33.63

## 2.3 转运系统的改造对胞内外 L-苏氨酸积累的影响

通常情况下, 改变氨基酸的转运系统会使胞内外氨基酸的浓度发生变化<sup>[6]</sup>, 进而影响氨基酸产量。而由 2.1 和 2.2 结果可知, 在 E. coli TRFC 中, sstT 基因的敲除以及 rhtC 基因的过表达均能有效地增加 L-苏氨酸产量。因此对原始菌株 TRFC 及各重组菌株胞内外 L-苏氨酸浓度进行测定, 以分析转运系统的改造对胞内外 L-苏氨酸浓度的影响, 其测定结果如图 3 所示。

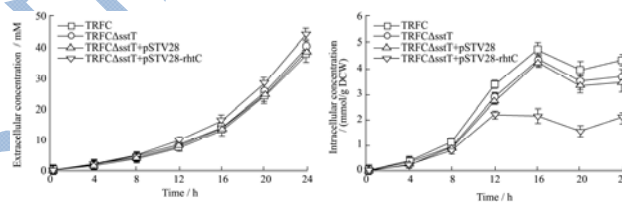


图 3 M9 基本培养基中(左)和细胞质内(右)的 L-苏氨酸浓度

Fig.3 The concentration of L-threonine in M9 minimal medium (left) and cytoplasm (right)

如图 3 左图所示, 各重组菌株胞外 L-苏氨酸产量均有所提高, 与 2.1 和 2.2 结果一致, 表明 sstT 的敲除与 rhtC 的过表达有益于 L-苏氨酸的生成。由图 3 右图可知, 各重组菌株胞内 L-苏氨酸浓度较原菌均有所降低, 其中 TRFCΔsstT 胞内 L-苏氨酸浓度降低程度较其它重组菌小, 这也与之前有关报道结论<sup>[12,16]</sup>, 可能是由于在大肠杆菌中还存在着其它未报道的 L-苏氨酸吸收蛋白, 单独敲除编码 SstT 吸收蛋白的基因 sstT 后, 对胞内 L-苏氨酸浓度影响不大。而在 sstT 缺失株的基础上增强输出蛋白 RhtC 的表达, 加强胞内 L-苏氨酸的外排能力, 胞内 L-苏氨酸积累量明显降低。综上所述, 改造 L-苏氨酸转运系统, 加强胞内 L-苏氨酸外排作用, 降低胞外 L-苏氨酸重吸收能力, 能够有效地增加 L-苏氨酸产量。

## 2.4 *E. coli* TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的 5 L 发酵罐产酸验证

由于在摇瓶实验阶段 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 表现出相对较高的产酸能力和糖酸转化率,因此,将重组菌株 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 在 5 L 自动控制发酵罐上进行分批补料发酵实验,定时测定生物量和 L-苏氨酸产量,发酵过程曲线如图 4 所示。

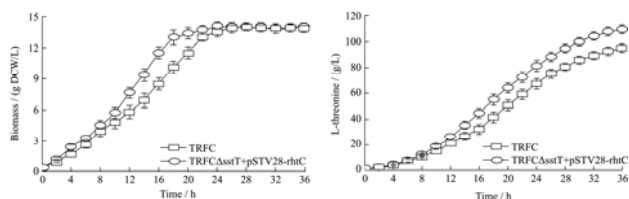


图4 大肠杆菌 TRFC和大肠杆菌 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 分批发酵过程曲线

### Fig.4 Glucose-controlled L-threonine fed-batch fermentations of *E. coli* TRFC and *E. coli* TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC

比较 *E. coli* TRFC 和 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的生长情况发现,在对数生长期中期(12 h~18 h),TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的生物量比 TRFC 稍高,且增长较快,随后增长缓慢。而在 18 h~24 h, *E. coli* TRFC 生物量继续增长,发酵稳定期两菌株生物量几乎一致,最终生物量约为 13.88 g DCW/L。发酵 14 h 后,TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC L-苏氨酸的生成速率明显高于原菌 TRFC,发酵结束时, *E. coli* TRFC 和 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的 L-苏氨酸产量分别为 94.79 g/L 和 109.32 g/L ( $P<0.05$ ),糖酸转化率分别为 35.14%和 40.81%,重组菌株的 L-苏氨酸产量和糖酸转化率分别较出发菌株提高了 15.33%和 16.14%。表明改造 *E. coli* TRFC 的 L-苏氨酸转运系统有利于增加菌株单位发酵时间内 L-苏氨酸的产量。

## 3 结论

3.1 本研究主要是对 L-苏氨酸转运系统的 SstT 和 RhtC 蛋白进行改造,降低胞内 L-苏氨酸浓度,以解除其对合成过程关键酶的反馈作用,从而达到提高 L-苏氨酸产量的目的。因此,本实验以 L-苏氨酸生产菌 TRFC 为出发菌株,敲除 sstT 基因,并过表达 rhtC 基因,实验证明重组菌株 TRFC $\Delta$ ssT+pSTV28-rhtC 的 L-苏氨酸产量得到明显提高。由此可见,改造 L-苏氨酸转运系统,增加胞内 L-苏氨酸外排能力和减弱胞外 L-苏氨酸重吸收作用,对 L-苏氨酸的产量的提高有一定的作用。

3.2 本文仅对 L-苏氨酸转运系统的 sstT 和 rhtC 基因

进行了改造,后期实验可针对 L-苏氨酸转运系统的其它基因如 rhtA、rhtB、thrE、thdC 等进行基因操作,以进一步考察转运系统的修饰对 L-苏氨酸产量的影响。另外,可对发酵培养基及培养条件进行进一步优化,以期能够提高 L-苏氨酸产量。本实验为今后进一步提高工业生产 L-苏氨酸提供了有效的依据。

## 参考文献

- [1] Rieping M, Hermann T. L-Threonine [M]. Springer Berlin Heidelberg, New York, 2006
- [2] Debabov VG. The threonine story [J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2003, 79: 113-136
- [3] Dong X, Quinn PJ, Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine [J]. Biotechnol. Adv., 2011, 29(1): 11-23
- [4] Reinscheid DJ, Kronmeyer W, Eggeling L, et al. Stable Expression of hom-1-thrB in *Corynebacterium glutamicum* and Its Effect on the Carbon Flux to Threonine and Related Amino Acids [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(1): 126-132
- [5] Kruse D, Krämer R, Eggeling L, et al. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 59(2-3): 205-210
- [6] Simic P, Sahn H, Eggeling L. L-Threonine Export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum* [J]. J. Bacteriol., 2001, 183(18): 5317-5324
- [7] Liu Q, Cheng YS, Xie X, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli* [J]. Bioresour. Technol., 2012, 114: 549-554
- [8] Morbach S, Sahn H, Eggeling L. L-Isoleucine Production with *Corynebacterium glutamicum* Further Flux Increase and limitation of export [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(12): 4345-4351
- [9] Xie X, Xu L, Shi J, et al. Effect of transport proteins on L-isoleucine production with the L-isoleucine-producing strain *Corynebacterium glutamicum* YILW [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012, 39(10): 1549-1556
- [10] Eggeling L, Sahn H. New ubiquitous translocators: amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* [J]. Arch. Microbiol., 2003, 180(3): 155-160
- [11] Diesveld R, Tietze N, Fürst O, et al. Activity of exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and their use to increase L-threonine production [J]. J. Mol. Microbiol.

- Biotechnol., 2009, 16(3-4): 198-207
- [12] Kruse D, Six S, Krämer R, et al. Analysis of threonine uptake in *Escherichia coli* threonine production [J]. Biotechnol. Lett., 2001, 23(5): 401-404
- [13] Livshits VA, Zakataeva NP, Aleshin VV, et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli* [J]. Res. Microbiol., 2003, 154(2): 123-135
- [14] Ikeda M, Katsumata R. Transport of aromatic amino acids and its influence on overproduction of the amino acids in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 78(6): 420-425
- [15] Ikeda M, Katsumata R. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1995, 59(8): 1600-1602
- [16] Okamoto K, Kino K, Ikeda M. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61 (11): 1877-1882