

研究报告

大肠杆菌 TdcC、SstT 和 LIV-1 系统缺失对胞外
L-苏氨酸积累的影响杨冬美^{1,2} 李华^{1,2} 李由然^{1,2} 张梁^{1,2} 丁重阳^{1,2} 李赢^{1,2} 顾正华^{1,2} 石贵阳^{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)

摘要:【目的】比较分析苏氨酸吸收系统 TdcC、SstT 和 LIV-1 缺失对大肠杆菌吸收和积累胞外苏氨酸的影响。【方法】从菌株 *E. coli* W3110 出发, 敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因, 构建 TdcC、SstT 和 LIV-1 系统单缺失和多缺失菌株, 将过量表达苏氨酸操纵子基因的重组质粒 pKKthrA^{C1034T}BC 分别转入原始菌和重组菌, 考察各菌株吸收和积累胞外苏氨酸的能力。【结果】敲除 *tdcC* 和 *sstT* 基因的重组菌 T04 的苏氨酸吸收能力比原始菌 W3110 降低了 43.28%, T04 (pKKthrA^{C1034T}BC)胞外苏氨酸积累量最高达到 1.09 g/L, 比对照菌 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)高出 172.5%。敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因的重组菌 T07 的苏氨酸吸收能力比 T04 降低了 12.97%, 然而 T07(pKKthrA^{C1034T}BC)胞外苏氨酸积累量最大为 0.63 g/L, 与 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)相比降低了 42.2%。【结论】阻断 TdcC 和 SstT 系统, 能有效降低大肠杆菌吸收苏氨酸的能力, 提高苏氨酸的胞外积累量。阻断 LIV-1 系统, 虽然能减少大肠杆菌对苏氨酸的吸收, 却不利于菌株积累胞外苏氨酸。

关键词: L-苏氨酸, 大肠杆菌, 吸收系统, 基因敲除

Effects of TdcC、SstT and LIV-1 systems deletion of *Escherichia coli* on extracellular L-threonine accumulationYANG Dong-Mei^{1,2} LI Hua^{1,2} LI You-Ran^{1,2} ZHANG Liang^{1,2} DING Zhong-Yang^{1,2}
LI Ying^{1,2} GU Zheng-Hua^{1,2} SHI Gui-Yang^{1,2*}

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

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] The effects of the threonine absorption system deletion, containing TdcC, SstT and LIV-1, on the extracellular accumulation of threonine were investigated in *Escherichia coli*. [Methods] In this paper, the TdcC, SstT and LIV-1 systems single- and multi-deletion of *E. coli*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31401674); Jiangnan University Independent Key Project (No. JUSRP51503)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: January 27, 2016; Accepted: April 20, 2016; Published online (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31401674); 江南大学自主重点项目(No. JUSRP51503)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-27; 接受日期: 2016-04-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-04

W3110 were constructed by deleting the corresponding genes (*tdcC*, *sstT*, *livJ*). Subsequently, the plasmid harboring the operon gene cluster of threonine, pKKthrA^{C1034T}BC, was transformed into both the wild type and recombinant strains. The ability of absorption and extracellular accumulation of threonine was then detected. **[Results]** Compared with W3110, the threonine absorption ability of T04 with *tdcC* and *sstT* deletion was decreased by 43.28%. Meanwhile, T04 with plasmid pKKthrA^{C1034T}BC accumulated 1.09 g/L threonine *in vitro*, which was 2.7 folds of that of strain W3110 with pKKthrA^{C1034T}BC. Further deletion of *livJ* gene in T04 generated T07, which resulted in 12.97% decrease of threonine absorption. However, the maximum extracellular threonine concentration of strain T07 with pKKthrA^{C1034T}BC was only 0.63 g/L, which was decreased by 42.2% when compared with that of strain T04 with pKKthrA^{C1034T}BC. **[Conclusion]** Deletion of both TdcC and SstT systems of *E. coli* significantly decreased threonine absorption and improved extracellular threonine accumulation. Though inactivation of LIV-1 system reduced threonine absorption, it would impair the accumulation of threonine *in vitro*.

Keywords: L-threonine, *Escherichia coli*, Absorption system, Gene knockout

作为人体和动物必需的 8 种氨基酸之一, L-苏氨酸被广泛应用于食品、饲料和医药等行业^[1]。苏氨酸的生产方法主要有化学合成法、蛋白质水解法和微生物发酵法,工业上大多采用微生物发酵法生产苏氨酸,一般通过传统的随机诱变或代谢工程手段,解除苏氨酸合成代谢中受到的各种反馈调控作用,选育高产菌株^[2-4]。微生物氨基酸合成途径的代谢调控复杂,很难全部解除,氨基酸的进一步合成受到残余调控作用的严重阻碍^[5]。转运系统工程通过及时分泌胞内氨基酸或者减少胞外氨基酸向胞内的运输,使胞内氨基酸浓度维持在较低水平,可以有效减弱合成途径受到的反馈调控,增加氨基酸的产量^[6]。近年来,关于多种氨基酸如色氨酸、赖氨酸和半胱氨酸的转运系统研究表明,转运系统工程是菌种改造的一种有效方法,能显著提高菌体产目的氨基酸的能力^[7-10]。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)苏氨酸转运系统分为吸收系统和分泌系统,吸收载体将苏氨酸运进细胞,减少胞内的合成需要量;输出载体将高浓度的苏氨酸运出细胞,减少高浓度苏氨酸对细胞的危害^[11]。目前报道的大肠杆菌苏氨酸吸收系统有 3 种,分别是由 *tdcC* 基因编码的 TdcC 载体、*sstT* 基因编码的 SstT 载体以及 *livJ* 和 *livHMGF* 基因编码的 LIV-1 系统^[12-13]。其中, SstT 是大肠杆菌苏氨酸和丝氨酸的主要吸收蛋白^[14]。Kruse 等^[15]敲除

E. coli VL334PyN7 的 *sstT* 基因,苏氨酸的吸收速率降低了 50%。梁媛等^[16]敲除苏氨酸生产菌 *E. coli* TRFC 的 *sstT* 基因,摇瓶补料发酵 36 h,苏氨酸的产量提高了 4%。TdcC 在厌氧条件下与苏氨酸的吸收相关^[17],但 Lee 等^[18]通过转录组分析表明,在有氧条件下,苏氨酸生产菌 *E. coli* TH07 (pBRThrABC)与对照菌 *E. coli* W3110(pBR322)相比, *tdcC* 基因的转录水平是上调的,敲除 *tdcC* 基因后苏氨酸的产量提高了 15.6%。LIV-1 系统是大肠杆菌支链氨基酸转运系统,吸收亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸进入细胞,对丙氨酸、苏氨酸和丝氨酸有较低的转运能力^[19]。LIV-1 系统由周质结合蛋白和膜转运蛋白组成, *livJ* 基因编码的周质结合蛋白结合和转运胞外的氨基酸到膜转运蛋白上, *livHMGF* 基因编码的膜转运蛋白再将氨基酸转运到胞内^[20]。虽然 LIV-1 系统能吸收苏氨酸,但却没有相关的报道表明其是否能应用于苏氨酸生产菌的构建。

TdcC、SstT 和 LIV-1 三种载体吸收苏氨酸的能力具有显著的差异,不同载体的缺失对菌体积累苏氨酸的能力会产生不同的影响。目前,3 种载体的研究都是分开进行的,还没有关于比较这 3 种载体的报道。本研究从野生型菌株 *E. coli* W3110 出发,运用 λ red 重组技术构建 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因单敲除和多敲除菌株,比较分析大肠杆菌 TdcC、

SstT 和 LIV-1 吸收系统的缺失对胞外苏氨酸吸收能力和积累能力的影响,为苏氨酸生产菌的构建提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究出发菌株为 *E. coli* W3110。基因敲除所需的抗性打靶片段质粒 pKD13、同源重组协助质粒 pKD46 和抗性基因消除质粒 pCP20 均购于美国耶鲁大学大肠杆菌菌株库(CGSC, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA)^[21]。由本实验室构建和保藏的质粒 pKKthrA^{C1034T}BC 是以大肠杆菌表达质粒 pKK223-3 为载体,由 *tac* 强启动子控制苏氨酸操纵子编码框 *thrA*^{C1034T}BC 的表达,其中 *thrA*^{C1034T}、*thrB* 和 *thrC* 基因分别编码苏氨酸合成路径中的 3 个关键酶天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 双功能酶、高丝氨酸激酶和苏氨酸合酶, *thrA*^{C1034T} 编码的天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 能抗苏氨酸反馈抑制,过量表达 *thrA*^{C1034T}BC,能有效促进苏氨酸的合成。重组菌 *E. coli* T01、*E. coli* T02、*E. coli* T03、*E. coli* T04、*E. coli* T05、*E. coli* T06 和 *E. coli* T07 均为本研究构建,各菌株及质粒的具体特性见表 1。

1.1.2 工具酶及试剂: 实验用的 *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶购于大连宝生物工程有限公司; pMD19-T vector 购自 TaKaRa 公司;试剂卡那霉素、氯霉素、氨苄青霉素和 L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司;质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和 DNA 纯化试剂盒购于北京博大泰克生物有限公司。蛋白胨、酵母粉、琼脂粉购于 OXOID 公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 培养基及培养条件: SOB 液体培养基(g/L): 酵母粉 5.0,蛋白胨 20.0,NaCl 0.5,KCl 0.186,MgCl₂ 0.95,配制固体 SOB 培养基需加入 1.5%的琼脂。

摇瓶发酵培养基(g/L): 酵母粉 2.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, KH₂PO₄ 4.0, (NH₄)₂SO₄ 14.0, 甜菜碱 1.0,葡萄糖 30.0, CaCO₃ 10.0, 0.5% (体积比)金属离子溶液, NaOH 调节 pH 到 7.2,装液量为 60 mL/500 mL。金属离子溶液(g/L): FeSO₄·7H₂O 10.0, CaCl₂ 1.35, ZnSO₄·7H₂O 2.25, MnSO₄·4H₂O 0.5, CuSO₄·5H₂O 1.0, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.106, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.23, 35% HCl 1% (体积比)。

苏氨酸分析培养基(g/L) NaNH₄HPO₄·4H₂O 3.5, K₂HPO₄·3H₂O 12.9, (NH₄)₂SO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, 一水柠檬酸 2.0, 苏氨酸 1.0, pH 7.2。装液量为 50 mL/250 mL。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性 Relevant characteristics	来源 Source
菌株 Strains		
<i>E. coli</i> W3110	Wild type	This Lab
<i>E. coli</i> T01	W3110 ($\Delta tdcC$)	This study
<i>E. coli</i> T02	W3110 ($\Delta sstT$)	This study
<i>E. coli</i> T03	W3110 ($\Delta livJ$)	This study
<i>E. coli</i> T04	W3110 ($\Delta tdcC$, $\Delta sstT$)	This study
<i>E. coli</i> T05	W3110 ($\Delta tdcC$, $\Delta livJ$)	This study
<i>E. coli</i> T06	W3110 ($\Delta sstT$, $\Delta livJ$)	This study
<i>E. coli</i> T07	W3110 ($\Delta tdcC$, $\Delta sstT$, $\Delta livJ$)	This study
质粒 Plasmids		
pKKthrA ^{C1034T} BC	Amp marker, <i>P_{tac}</i> promoter, carrying <i>thrA</i> ^{C1034T} BC	This Lab
pKD46	Amp marker, helper plasmid	[21]
pKD13	Amp and Kan markers	[21]
pCP20	Amp and Chl markers, helper plasmid	[21]

在菌种构建和发酵过程中,培养基中添加的卡那霉素、氯霉素和氨苄青霉素终浓度分别为 36、25 和 100 mg/L。

1.1.4 引物: 根据 GenBank 中 *E. coli* W3110 的 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因序列以及质粒 pKD13 中卡那霉素抗性基因序列信息,设计本实验所用引物。*gene-FW* 和 *gene-RV* 用于扩增目的基因打靶片段。3 对引物 *Ygen-FW* 和 *Ygene-RV*,*Ygene-FW* 和 *k1*,*Ygene-RV* 和 *k2* 用于鉴定目的基因的敲除,其中 *Ygen-FW* 和 *Ygene-RV* 分别是目的基因上下游的某段序列,*k1* 和 *k2* 分别为 *kan* 基因内部序列。本实验所用引物的合成及有关测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成,具体序列见表 2。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌目的基因的敲除: 大肠杆菌基因敲除采用 λ red 同源重组技术^[21]:以质粒 pKD13 为模板,用引物 *gene-FW* 和 *gene-RV* 扩增含有 FRT 位点、同源臂和 *kan* 基因的目的基因打靶片段。将打靶片段电转入含有质粒 pKD46 的目的菌株,同

源替换目的基因,用卡那霉素平板初步筛选阳性转化子,引物 *Ygene-FW*、*Ygene-RV* 和 *k1*、*k2* PCR 验证挑选打靶片段与基因组成功整合的菌株。将辅助质粒 pCP20 电转入目的基因敲除菌株,消除 *kan* 基因,用氯霉素平板初步筛选阳性转化子,引物 *Ygene-FW* 和 *Ygene-RV* PCR 鉴定筛选 *kan* 基因成功消除的菌株,并将 PCR 产物 TA 克隆至 pMD19-T 载体,测序证明目的基因敲除正确。42 °C 培养 *kan* 基因消除菌株,丢失 pCP20 质粒,便于后续实验操作。

1.2.2 菌体生物量的测定: 发酵液的菌体浓度以分光光度计 600 nm 波长下的吸光值 *OD*₆₀₀ 表示,细胞干重根据经验公式获得($1 OD_{600}=0.39 g/L DCW$)。

1.2.3 葡萄糖及苏氨酸浓度的测定: 葡萄糖浓度采用生物传感仪 SBA-40C 测定。苏氨酸浓度采用高效液相色谱测定,取发酵液 1 mL,12 000 r/min 离心 10 min,上清与等体积 10% (质量体积比)三氯乙酸混合,4 °C 放置 3 h 以上,12 000 r/min 离心 20 min,上清用于高效液相色谱分析。高效液相色谱

表 2 本研究所用引物 Table 2 Primers used in this research	
引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
tdcC-FW	<u>ATGAGTACTTCAGATAGCATTGTATCCAGCCAGACAAAACAATCGTCCTGGCGTAAATCAGTAGG</u> CTGGAGCTGCTTCG
tdcC-RV	<u>CCAGTGTAATCGCGAACGTTGTTTTGGTACCGGTCATGGACGCAAAGTGGTTAGCCAGATTCCGG</u> GGATCCGTCG
YtdcC-FW	CCGGGTAATTAACTTACGAA
YtdcC-RV	CCATTTACGGATAAGAATGC
sstT-FW	<u>ATGACTACGCAACGTTACCCGGGGCTATTCCGGCGTCTGGCTCATGGCAGCCTGGTAAAA</u> GTAGG CTGGAGCTGCTTCGA
sstT-RV	<u>TTAATTACGCAGGGCGCTATTTGCCAGACGATCGTCTTCTGCCTGGCAAGCTGCCGCAGTTCCGG</u> GGATCCGTCG
YsstT-FW	GGTGAATTATCGGCATGA
YsstT-RV	GCCAGTGCCATCCTTAATGC
livJ-FW	<u>ATGAACATAAAGGGTAAAGCGTTACTGGCAGGATGTATCGCGCTGGCATTACGCAATATGGTAGG</u> CTGGAGCTGCTTCG
livJ-RV	<u>CGGTGATGCCATCAAAGAACACCACGTTTGCATTGCCTTTCTTCAGGCCGTCCTGCACCGATAGA</u> CTGGATGGAGGCGG
YlivJ-FW	GCATAAACGAAATAAAGT
YlivJ-RV	CGCATCCGGCATGAAGCAA
k1	AGGCTATTCGGCTATGACTG
k2	GGACAGGTCGGTCTTGACAA

注:下划线部分为目的基因同源臂序列。

Note: The underlined part is the homologous sequence of the target knockout gene.

谱分离条件: Waters C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), OPA 柱前衍生, 流动相 A 和流动相 B 梯度洗脱, 柱温 40 °C, 流动相流速 1 mL/min, 紫外检测, 波长 338 nm。流动相 A 的配制: 称取 5 g 无水乙酸钠, 加入 1 L 超纯水和 200 μL 三乙胺, 乙酸调节 pH 至 7.2, 加入 5 mL 四氢呋喃, 用 0.45 μm 有机滤膜抽滤, 超声脱气。流动相 B 的配制: 称取 5 g 无水乙酸钠, 加入 200 mL 超纯水, 乙酸调节 pH 至 7.2, 加入色谱纯甲醇和乙腈各 400 mL, 用 0.45 μm 有机滤膜抽滤, 超声脱气。

1.2.4 大肠杆菌苏氨酸吸收能力分析: 向种子培养基中添加终浓度为 0.5 g/L 的苏氨酸, 诱导菌体表达苏氨酸吸收载体, 向苏氨酸分析培养基中添加终浓度为 1 g/L 的苏氨酸, 代替葡萄糖作为碳源, 检测菌体的生长和苏氨酸的消耗情况, 用苏氨酸对菌体的比消耗速率来表征菌体吸收苏氨酸的能力^[22]。苏氨酸对菌体的比消耗速率定义为单位时间、单位菌体消耗的苏氨酸的量[nmol/(min·mg DCW)]。具体方法是: 将菌种接入 SOB 液体培养基, 31 °C、250 r/min 活化培养 10 h, 按 OD₆₀₀ 为 0.2 的接种量转接至 50 mL 含有 0.5 g/L 苏氨酸的 SOB 培养基,

31 °C、250 r/min 培养 10 h, 菌液冰浴 30 min。4 °C、4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 0.9% 生理盐水重悬菌体, 重复该步骤 3 次。将菌体重悬到 7–8 mL, 按照 OD₆₀₀ 为 2.0 的接种量接种至苏氨酸分析培养基, 31 °C、250 r/min 培养, 每 2 h 取样, 测量培养液的生物量和剩余苏氨酸浓度, 每组 3 个平行实验。

1.2.5 重组菌的摇瓶发酵: 将菌种接入 SOB 液体培养基, 31 °C、250 r/min 活化培养 10 h, 按 OD₆₀₀ 为 0.2 的接种量转接至 50 mL SOB 培养基, 31 °C、250 r/min 培养 12 h, 按 OD₆₀₀ 为 0.5 的接种量接种至发酵培养基, 31 °C、250 r/min 发酵培养 36 h, 每隔一定时间取样, 测量培养液的生物量、葡萄糖浓度和苏氨酸浓度。

2 结果与分析

2.1 突变菌株的构建

以 *E. coli* W3110 为出发菌株, 按照 1.2.1 的方法敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因, 分别如图 1A、B 和 C 所示, 构建 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因单敲除菌株 *E. coli* T01、*E. coli* T02、*E. coli* T03 和多敲除菌株 *E. coli* T04、*E. coli* T05、*E. coli* T06、*E. coli* T07。

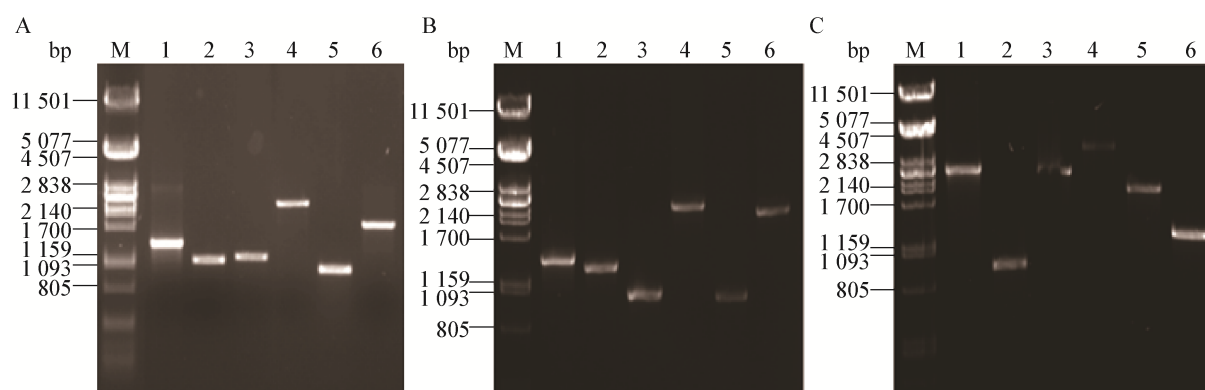


图 1 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因敲除的 PCR 鉴定电泳图

Figure 1 PCR identification of *tdcC*, *sstT* and *livJ* knockout strains

注: M: λ/Pst I DNA marker; A(1), B(1), C(1): *tdcC*、*sstT*、*livJ* 打靶片段, 1 420、1 420、2 479 bp; A(2), B(2), C(2): Ygene-FW 和 k1 PCR 产物, 1 167、1 317、956 bp; A(3), B(3), C(3): k2 和 Ygene-RV PCR 产物, 1 206、1 043、2 283 bp; A(4), B(4), C(4): Ygene-FW 和 Ygene-RV PCR 产物, 2 262、2 249、3 128 bp; A(5), B(5), C(5): *kan* 消除菌 Ygene-FW 和 Ygene-RV PCR 产物, 1 040、1 027、1 906 bp; A(6), B(6), C(6): 原始菌 Ygene-FW 和 Ygene-RV PCR 产物, 1 788、2 074、1 247 bp。

Note: M: λ/Pst I DNA marker; A(1), B(1), C(1): DNA fragments of knocking out *tdcC*, *sstT*, *livJ*, 1 420, 1 420, 2 479 bp; A(2), B(2), C(2): Ygene-FW and k1 PCR products, 1 167, 1 317, 956 bp; A(3), B(3), C(3): k2 and Ygene-RV PCR products, 1 206, 1 043, 2 283 bp; A(4), B(4), C(4): Ygene-FW and Ygene-RV PCR products, 2 262, 2 249, 3 128 bp; A(5), B(5), C(5): Ygene-FW and Ygene-RV PCR products of strains without *kan*, 1 040, 1 027, 1 906 bp; A(6), B(6), C(6): Ygene-FW and Ygene-RV PCR products of comparison strains, 1 788, 2 074, 1 247 bp.

2.2 阻断 TdcC、SstT 和 LivJ 系统对菌株吸收苏氨酸的影响

按照 1.2.4 的方法对菌株 W3110 和重组菌 T01、T02、T03、T04、T05、T06、T07 进行苏氨酸吸收能力的检测。10 h 内菌体的生物量和培养基苏氨酸浓度变化如图 2 所示,苏氨酸对菌体的比消耗速率如图 3 所示。

由图 2 可知,菌体在苏氨酸分析培养基中生长缓慢,重组菌与对照菌生长情况大致相同,但苏氨酸的消耗速率差异显著。由图 3 和表 3 可知, *tdcC*、*sstT*、*livJ* 基因单敲除菌株 T01、T02 和 T03 10 h 内苏氨酸平均比消耗速率分别为 10.25、9.79 和 11.49 nmol/(min·mg DCW), 与对照菌 W3110

[11.83 nmol/(min·mg DCW)] 相比分别降低了 13.36%、17.24%和 2.87%。实验结果表明, *tdcC*、*sstT*、*livJ* 基因的单敲除都能降低菌株吸收胞外苏氨酸的能力,敲除 *sstT* 基因的效果最为显著, *tdcC* 次之,敲除 *livJ* 基因,苏氨酸吸收能力的降低幅度较小。多基因敲除菌株 T04、T05、T06 和 T07 10 h 内苏氨酸平均比消耗速率分别为 6.71、7.59、9.34 和 5.84 nmol/(min·mg DCW), 分别比 W3110 降低了 43.28%、35.84%、21%和 50.63%。双敲除菌株中,敲除 *tdcC* 和 *sstT* 基因的 T04 菌株的苏氨酸比消耗速率最小。敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因的 T07 菌株的苏氨酸比消耗速率比单敲除和双敲除菌株都小,与菌株 T04 相比降低了 12.97%。

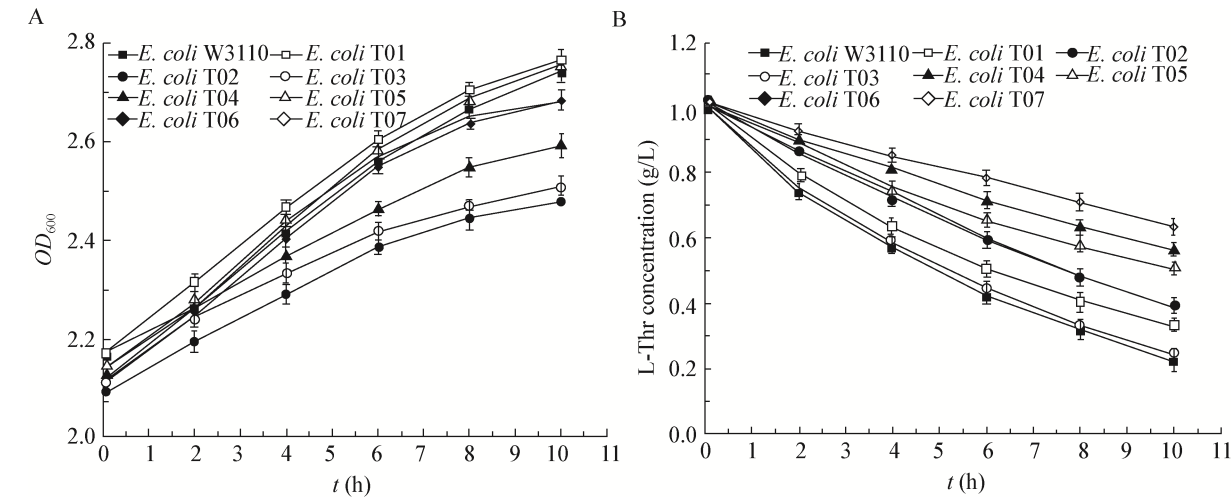


图 2 不同菌株在苏氨酸分析培养基中的生长情况
Figure 2 The growth of different strains in L-threonine assay medium

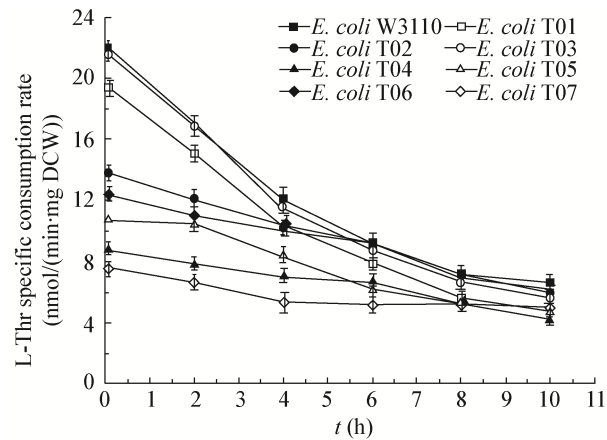


图 3 不同菌株在苏氨酸分析培养基中的苏氨酸比消耗速率
Figure 3 The specific consumption rate of different strains in L-threonine assay medium

表 3 不同菌株的 L-苏氨酸吸收能力检测 Table 3 L-threonine uptake assay of different strains		
菌株 Strains	敲除基因 Knockout genes	10 h L-苏氨酸平均 比消耗速率 L-Thr average specific consumption rate in 10 h [nmol/(min·mg DCW)]
<i>E. coli</i> W3110	—	11.83
<i>E. coli</i> T01	<i>tdcC</i>	10.25
<i>E. coli</i> T02	<i>sstT</i>	9.79
<i>E. coli</i> T03	<i>livJ</i>	11.49
<i>E. coli</i> T04	<i>tdcC</i> , <i>sstT</i>	6.71
<i>E. coli</i> T05	<i>tdcC</i> , <i>livJ</i>	7.59
<i>E. coli</i> T06	<i>sstT</i> , <i>livJ</i>	9.34
<i>E. coli</i> T07	<i>tdcC</i> , <i>sstT</i> , <i>livJ</i>	5.84

2.3 单敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因对菌株生长和积累胞外苏氨酸的影响

为了检测单敲除 *tdcC*、*sstT*、*livJ* 基因对菌株生长和积累胞外苏氨酸的影响, 将质粒 pKKthrA^{C1034T}BC 转入菌株 W3110、T01、T02 和 T03 中, 构建重组菌 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)、T01(pKKthrA^{C1034T}BC)、T02(pKKthrA^{C1034T}BC)和 T03(pKKthrA^{C1034T}BC), 按照 1.2.5 的方法摇瓶发酵, 菌株生长和积累胞外苏氨酸的情况如图 4 和表 4 所示。

由图 4A 及表 4 可知, *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因的单敲除对菌体的生长影响较小, 菌株 W3110 (pKKthrA^{C1034T}BC)及其单敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ*

基因的菌株的最大比生长速率分别为 0.68、0.65、0.59 和 0.61 h⁻¹, 菌体的最终生物量接近, 最大 OD₆₀₀ 值分别为 13.55、13.36、13.08 和 13.25。由图 4B 和表 4 可知, 摇瓶发酵时, T01 (pKKthrA^{C1034T}BC)、T02(pKKthrA^{C1034T}BC)和 T03 (pKKthrA^{C1034T}BC)最大胞外苏氨酸积累量分别为 0.73、0.85 和 0.46 g/L, 分别比对照菌 W3110 (pKKthrA^{C1034T}BC, 0.40 g/L)提高了 82.5%、112.5% 和 15%, 苏氨酸得率分别提高了 75%、100%和 10%。单敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因能提高菌株 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)积累胞外苏氨酸的能力, 敲除 *tdcC* 或 *sstT* 基因的效果较好, 单敲除 *livJ* 基因只能少量增加胞外苏氨酸的积累量。

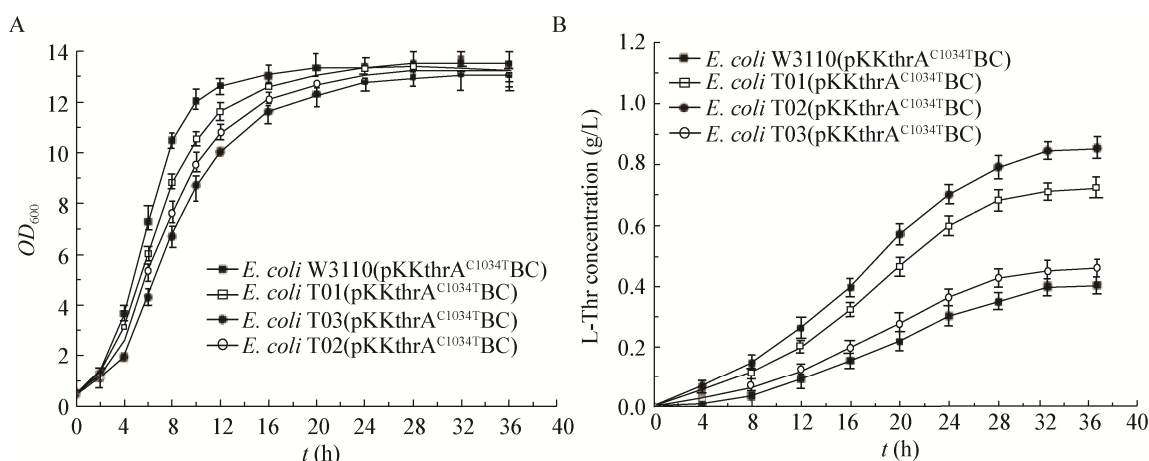


图 4 大肠杆菌 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)的 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因单敲除菌株的摇瓶发酵

Figure 4 Shake-flask fermentations of single gene knockout mutants of *tdcC*, *sstT* and *livJ* of *E. coli* W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)

表 4 不同重组菌的摇瓶发酵参数

Table 4 Shake-flask fermentation parameters of different recombinant strains

菌株 Strains	敲除基因 Knockout genes	最大 OD ₆₀₀ Maximum OD ₆₀₀	最大比生长速率 Maximum specific growth rate (h ⁻¹)	葡萄糖消耗量 Consumption of glucose (g/L)	最大苏氨酸浓度 Maximum threonine titer (g/L)	苏氨酸得率 L-Thr yield on glucose (g _{Thr} /g _{Glu})
W3110(pKKthrA ^{C1034T} BC)	—	13.55	0.68	20.18	0.40	0.020
T01(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>tdcC</i>	13.36	0.65	20.91	0.73	0.035
T02(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>sstT</i>	13.08	0.59	21.05	0.85	0.040
T03(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>livJ</i>	13.25	0.61	20.62	0.46	0.022
T04(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>tdcC</i> , <i>sstT</i>	13.26	0.66	22.24	1.09	0.049
T05(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>tdcC</i> , <i>livJ</i>	12.99	0.64	20.82	0.69	0.033
T06(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>sstT</i> , <i>livJ</i>	13.20	0.60	21.16	0.83	0.039
T07(pKKthrA ^{C1034T} BC)	<i>tdcC</i> , <i>sstT</i> , <i>livJ</i>	12.78	0.59	19.32	0.63	0.033

2.4 多敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因对菌株生长和积累胞外苏氨酸的影响

单敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因都能增加胞外苏氨酸积累量,为了减少菌株对胞外苏氨酸的吸收,增加胞外苏氨酸积累量,将质粒 pKKthrA^{C1034T}BC 分别转入多基因敲除菌 T04、T05、T06 和 T07,构建重组菌 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)、T05(pKKthrA^{C1034T}BC)、T06(pKKthrA^{C1034T}BC)和 T07(pKKthrA^{C1034T}BC),按照 1.2.5 的方法摇瓶发酵,菌株生长和积累胞外苏氨酸的情况如图 5 和表 4 所示。

由图 5A 及表 4 可知, *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因的多敲除对菌体的生长影响较小,菌株 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)、T05(pKKthrA^{C1034T}BC)、T06(pKKthrA^{C1034T}BC)和 T07(pKKthrA^{C1034T}BC)的最大比生长速率分别为 0.66、0.64、0.60 和 0.59 h⁻¹,最大 OD₆₀₀ 值分别为 13.26、12.99、13.20 和 12.78,与 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)接近。由图 5B 及表 4 可知, *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因的双敲除菌株中, T04(pKKthrA^{C1034T}BC)、T05(pKKthrA^{C1034T}BC)和 T06(pKKthrA^{C1034T}BC)最大胞外苏氨酸积累量分

别为 1.09、0.69、0.83 g/L,与对照菌 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)相比分别提高了 172.5%、72.5%和 107.5%,苏氨酸得率分别提高了 145%、65%和 95%,T04(pKKthrA^{C1034T}BC)积累胞外苏氨酸的能力最好。敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因的菌株 T07(pKKthrA^{C1034T}BC)最大胞外苏氨酸积累量为 0.63 g/L,比 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)提高了 57.5%,但与 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)相比却降低了 42.2%,苏氨酸得率与 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)相比降低了 32.7%。由 T05(pKKthrA^{C1034T}BC)与 T01(pKKthrA^{C1034T}BC)、T06(pKKthrA^{C1034T}BC)与 T02(pKKthrA^{C1034T}BC)、T07(pKKthrA^{C1034T}BC)与 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)的胞外苏氨酸积累量比较可知,在多基因敲除菌株中, *livJ* 基因的敲除会降低胞外苏氨酸积累量,这可能是由于 LIV-1 系统吸收的氨基酸种类较多,又是支链氨基酸的主要吸收系统之一^[20],LIV-1 系统缺失,菌株对多种氨基酸的吸收能力降低,代谢平衡发生变化,进而影响苏氨酸的合成,具体原因还需进一步探究。

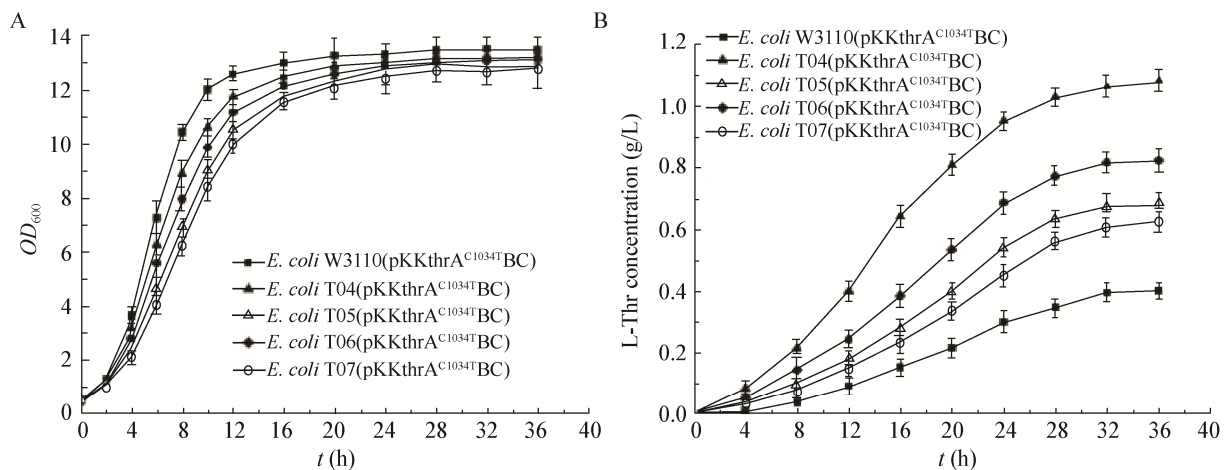


图 5 大肠杆菌 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)的 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 基因多敲除菌株的摇瓶发酵
Figure 5 Shake-flask fermentations of multi-gene knockout mutants of *tdcC*, *sstT* and *livJ* of *E. coli* W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)

3 讨论

转运系统工程作为一种重要的育种手段,对氨基酸生产菌的构建具有重要意义。Okamoto 等^[23]通过多次随机诱变获得苏氨酸高产菌 *E. coli* KY10935,研究表明其苏氨酸吸收系统受损,这可能是苏氨酸高产的原因之一。在苏氨酸发酵过程中,当菌体胞内苏氨酸积累到一定浓度时,会抑制其合成途径中关键酶的活力,减弱苏氨酸的合成能力。改造大肠杆菌苏氨酸吸收系统,降低菌株吸收胞外苏氨酸的能力,可以减弱菌株对胞外苏氨酸的重吸收,减少无效循环和能量浪费,降低胞内苏氨酸浓度,进而减弱合成途径受到的抑制作用,促进苏氨酸的合成^[16]。

本研究从野生型 *E. coli* W3110 出发,阻断已知的大肠杆菌苏氨酸吸收系统 TdcC、SstT 和 LIV-1,并考察不同吸收载体缺失菌株吸收和积累胞外苏氨酸的能力。实验结果表明:双敲除 *tdcC* 和 *sstT* 基因的菌株 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)胞外苏氨酸积累量最高,达到 1.09 g/L,分别比单敲除 *tdcC* 和 *sstT* 基因的菌株提高了 49.3%和 28.2%,比对照菌 W3110(pKKthrA^{C1034T}BC)高出 172.5%,同时阻断 SstT 和 TdcC 系统,能有效降低菌株吸收苏氨酸的能力,提高胞外苏氨酸积累量。敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 的菌株 T07 吸收苏氨酸的能力与菌株 T04 相比降低了 12.97%,但 T07(pKKthrA^{C1034T}BC)的胞外苏氨酸积累量与 T04(pKKthrA^{C1034T}BC)相比却降低了 42.2%,阻断 LIV-1 系统,虽然能降低菌株吸收苏氨酸的能力,却不利于菌株积累更多的胞外苏氨酸。

本实验构建的 T07 菌株同时阻断了已报道的大肠杆菌苏氨酸吸收系统 TdcC、SstT 和 LIV-1,苏氨酸吸收速率只降低了 50.63%,仍具有苏氨酸吸收能力,表明大肠杆菌还存在其它的苏氨酸吸收途径,这与 Kruse 等^[15]报道的大肠杆菌除了已知的苏氨酸吸收途径外,还有未知的苏氨酸吸收途径相一致。本实验出发菌株 *E. coli* W3110 为野生型菌株,其基因型没有经过改造,遗传背景清楚,这有

利于准确反映苏氨酸吸收系统 TdcC、SstT 和 LIV-1 的缺失对菌株吸收和积累胞外苏氨酸的影响,为进一步改良苏氨酸高产菌提供参考依据。

大肠杆菌氨基酸分泌系统和吸收系统是氨基酸转运系统的有机组成部分,两者共同决定胞内氨基酸的浓度,影响目的氨基酸的最终产量^[16]。目前关于氨基酸转运系统的研究,分泌系统和吸收系统研究大都是分开的,将分泌系统和吸收系统在菌种改造中的应用研究有机结合起来,是转运系统工程研究的重要趋势。本文仅对苏氨酸吸收系统进行了改造,后期实验可针对苏氨酸分泌系统进行分析,将两者结合起来,考察转运系统的改造对胞外苏氨酸积累能力的影响。转运系统工程在苏氨酸及其它氨基酸生产菌理性改造过程中发挥的作用日益明显。

参 考 文 献

- [1] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1): 1-8
- [2] Dong XY, Quinn PJ, Wang XY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(1): 11-23
- [3] Park JH, Lee SY, Kim TY, et al. Application of systems biology for bioprocess development[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(8): 404-412
- [4] Park JH, Lee SY. Metabolic pathways and fermentative production of L-aspartate family amino acids[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(6): 560-577
- [5] Ikeda M. Amino acid production processes[A]//Faurie R, Thommel J, Bathe B, et al. Microbial Production of L-Amino Acids[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003: 1-35
- [6] Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(3): 265-274
- [7] Zhao ZJ, Chen S, Wu D, et al. Effect of gene knockouts of L-tryptophan uptake system on the production of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(2): 340-344
- [8] Zhao ZJ, Chen S, Wu D, et al. Effect of multi-gene knockout of L-tryptophan transport system on L-tryptophan production in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(12): 1765-1772 (in Chinese)
赵志军, 陈晟, 吴丹, 等. 大肠杆菌色氨酸转运系统多基因敲除对色氨酸生产的影响[J]. 生物工程学报, 2011, 27(12): 1765-1772
- [9] Steffes C, Ellis J, Wu J, et al. The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(10): 3242-3249
- [10] Daßler T, Maier T, Winterhalter C, et al. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway[J]. Molecular Microbiology, 2005, 58(3): 265-274

- 2000, 36(5): 1101-1112
- [11] Wu YY, Qiu JP. Metabolic engineering strategies of bacterial strains for overproduction of L-threonine and L-lysine[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2012, 34(1): 35-41 (in Chinese)
吴瑶瑶, 裘娟萍. 天冬氨酸家族主要氨基酸高产菌株的选育策略[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(1): 35-41
- [12] Debabov VG. The threonine story[A]//Faurie R, Thommel J, Bathe B, et al. Microbial Production of L-Amino Acids[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003: 113-136
- [13] 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
- [14] Ogawa W, Kim YM, Mizushima T, et al. Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(24): 6749-6752
- [15] Kruse D, Six S, Krämer R, et al. Analysis of threonine uptake in *Escherichia coli* threonine production strains[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(5): 401-404
- [16] 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
- [17] Sumantran VN, Schweizer HP, Datta P. A novel membrane-associated threonine permease encoded by the *tdcC* gene of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(8): 4288-4294
- [18] 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
- [19] Rahmanian M, Claus DR, Oxender DL. Multiplicity of leucine transport systems in *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1973, 116(3): 1258-1266
- [20] Adams MD, Wagner LM, Graddis TJ, et al. Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(20): 11436-11443
- [21] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2(1), doi:10.1038/msb4100050
- [22] Gu PF. The L-tryptophan production by recombinant *Escherichia coli*[D]. Ji'nan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2013 (in Chinese)
古鹏飞. 利用重组大肠杆菌生产 L-色氨酸的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2013
- [23] Okamoto K, Kino K, Ikeda M. Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(11): 1877-1882

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012、2013、2014、2015 年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续 4 年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014 年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助; 2015 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2017 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413