

## 代谢工程改造甘油代谢途径提高 $\beta$ -胡萝卜素产量

董悦<sup>1,2\*</sup>, 胡坤乐<sup>3\*</sup>, 李兴林<sup>1</sup>, 李清艳<sup>2</sup>, 张学礼<sup>2</sup>

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

3 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023

董悦, 胡坤乐, 李兴林, 等. 代谢工程改造甘油代谢途径提高 $\beta$ -胡萝卜素产量. 生物工程学报, 2017, 33(2): 247-260.

Dong Y, Hu KL, Li XL, et al. Improving  $\beta$ -carotene production in *Escherichia coli* by metabolic engineering of glycerol utilization pathway. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 247-260.

**摘要:** 甘油是生物柴油的副产物, 因其价格低廉和高还原性, 成为生物发酵的重要碳源。为了进一步提高工程菌对甘油的利用能力, 从而提高萜类化合物的合成能力, 本研究从 $\beta$ -胡萝卜素高产菌 CAR015 出发, 对其甘油代谢途径的多个基因进行了调控。首先敲除了编码 3-磷酸甘油抑制子的 *glpR* 基因, 然后分别用 M1-37、M1-46 和 M1-93 三个不同强度的人工调控元件对 *glpFK*、*glpD* 和 *tpiA* 三组基因进行单基因调控和多基因组合调控。研究发现用 M1-46 调控 *glpD* 基因后 $\beta$ -胡萝卜素产量达到了 64.82 mg/L, 是 CAR015 的 4.86 倍, 甘油消耗速率也提高了 100%; 调控 *tpiA* 基因后 $\beta$ -胡萝卜素产量略有提高; 调控 *glpFK* 基因后 $\beta$ -胡萝卜素产量略有降低。说明 GlpD 是甘油代谢途径中的关键限速步骤。Q-PCR 结果表明, 降低甘油代谢途径的 *glpD* 和 *glpFK* 基因转录水平, 增加 *tpiA* 基因转录水平, 可以增加细胞生长速度、提高 $\beta$ -胡萝卜素产量, 可能是因为减少了丙酮醛毒性所致。组合调控 *glpD* 和 *tpiA* 基因, 获得 $\beta$ -胡萝卜素产量最高菌株 Gly003, 其 $\beta$ -胡萝卜素产量达 72.45 mg/L、产率达 18.65 mg/g 每克干细胞, 分别是出发菌株 CAR015 的 5.23 倍和 1.99 倍。总之, GlpD 是甘油代谢途径中的关键限速步骤, 适当强度调控 *glpD*, 可以有效提高重组大肠杆菌的 $\beta$ -胡萝卜素产量。

**关键词:**  $\beta$ -胡萝卜素, 萜类化合物, 甘油代谢, 大肠杆菌

**Received:** July 22, 2016; **Accepted:** December 6, 2016

**Supported by:** Natural Science Foundation of Tianjin (No. 15JCYBJC49400), Tianjin Key Technology R&D Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 12ZCZDSY14700).

**Corresponding authors:** Xinglin Li. Tel/Fax: 86-22-60601329; Email: lxlszf@tust.edu.cn

Qingyan Li. Tel/Fax: 86-22-84861946; Email: li\_qy@tib.cas.cn

\*These authors contributed equally to this work.

天津市自然科学基金 (No. 15JCYBJC49400), 天津市科技支撑计划重点项目 (No. 12ZCZDSY14700) 资助。

网络出版时间: 2016-12-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20161227.1416.001.html>

# Improving $\beta$ -carotene production in *Escherichia coli* by metabolic engineering of glycerol utilization pathway

Yue Dong<sup>1,2\*</sup>, Kunle Hu<sup>3\*</sup>, Xinglin Li<sup>1</sup>, Qingyan Li<sup>2</sup>, and Xueli Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

<sup>3</sup> College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

**Abstract:** Glycerol is a byproduct during biodiesel production. It is an important feedstock for fermentation due to its low price and high reduced status. Multiple genes of the glycerol utilization pathway were modulated in a previously engineered high  $\beta$ -carotene producing *Escherichia coli* strain CAR015 to enhance glycerol utilization capability for improving isoprenoids production. The *glpR* gene, encoding glycerol 3-phosphate repressor, was firstly deleted. The *glpFK*, *glpD* and *tpiA* genes were then modulated by three artificial regulatory parts, M1-37, M1-46 and M1-93, respectively.  $\beta$ -carotene titer reached 64.82 mg/L after modulating *glpD* with M1-46, which was 4.86 times higher than that of CAR015, and glycerol consumption rate also increased 100%. Modulating *tpiA* led to a little increase of  $\beta$ -carotene titer, whereas modulating *glpFK* led to a little decrease of  $\beta$ -carotene titer. This demonstrated that GlpD was a rate-limiting step in glycerol utilization pathway. Q-PCR of *glpF*, *glpK*, *glpD* and *tpiA* results showed that decrease the transcription level of *glpF*, *glpK*, *glpD*, or decrease the transcription level of *tpiA* could increase the cell growth and  $\beta$ -carotene production, probably for the decrease of methylglyoxal toxicity. Modulating *glpD* and *tpiA* genes in combination resulted in the best strain Gly003, which produced 72.45 mg/L  $\beta$ -carotene with a yield of 18.65 mg/g dry cell weight. The titer was 5.23 and yield 1.99 times of that of the parent strain CAR015. Our work suggested that appropriate activation of *glpD* and *tpiA* genes in glycerol utilization pathway could effectively improve  $\beta$ -carotene production. This strategy can be used for production of other terpenoids in *E. coli*.

**Keywords:**  $\beta$ -carotene, terpenoids, glycerol metabolism, *Escherichia coli*

$\beta$ -胡萝卜素是类胡萝卜素家族中的典型代表,也是生物体内合成维生素 A 的前体物质,具有较高的营养价值和药用价值,广泛应用于化工、化妆品、饲料、食品、保健品以及医药等行业<sup>[1-2]</sup>。目前市场上销售的 $\beta$ -胡萝卜素有化学合成和天然提取,化学合成法合成的产品存在有害物质残留问题,与化学合成的产品相比,天然 $\beta$ -胡萝卜素具有更好的生物活性且无毒副作用,随着人们生活品质的不断提高以及对绿色天然产品的倡导,天然 $\beta$ -胡萝卜素的市场需求将会越来越大<sup>[3]</sup>。微生物发酵生产天然 $\beta$ -胡萝卜素不受光照、气候、产地等条件的限制,且产品具有

经济、安全等优势,因此该技术受到国内外市场的广泛青睐<sup>[4-5]</sup>。以大肠杆菌作为出发菌株,运用代谢工程手段构建产类胡萝卜素基因工程高产菌株,成为包括 $\beta$ -胡萝卜素在内的多种类胡萝卜素产品生产开发的新模式<sup>[4-7]</sup>。

对产 $\beta$ -胡萝卜素大肠杆菌的遗传改造主要集中在过表达大肠杆菌自身的 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径) 中的关键基因和过表达外源的甲羟戊酸途径 (MVA 途径)<sup>[4-5]</sup>。另外,近年来部分研究组通过代谢流分析等,研究了非代谢途径基因表达水平对萜类化合物产量的影响。Alper 利用代谢流分析,验证了敲除

*gdhA*、*aceE*、*talB*、*gdhA*、*aceE* 和 *fdhF* 基因对番茄红素产量的影响，发现同时敲除 *gdhA*、*aceE* 和 *fdhF*，产量提高 37%<sup>[8]</sup>。Farmer 等通过高表达 *pps*，平衡 PEP 和 P3G 供应提高番茄红素产量<sup>[9]</sup>。Choi 等发现高表达 *pfkA*、*pgi*、*fbaA*、*tpiA*、*icdA* 和 *mdh* 可以提高番茄红素产量，*fbaA*、*tpiA* 和 *mdh* 效果最明显。*gdhA* 和 *gpmB* 双敲除效果最好，同时高表达 *mdh* 和 *pps*，番茄红素产量达到 283 mg/L<sup>[10]</sup>。Zhao 等系统研究了中央代谢途径和 ATP 合成途径各基因的转录水平对 β-胡萝卜素产量的影响，发现高表达 *sucAB*、*sdhAB* 和 *talB* 基因可以有效提高 β-胡萝卜素产量，产量比出发菌株高 64%<sup>[11]</sup>。因此改造大肠杆菌内非 MEP 途径基因表达水平成为提高萜烯类化合物合成的重要手段。

甘油是脂肪酸工业和生物柴油制造工业不可避免的副产物，曾是我国比较紧缺的化工产品。近年来，随着国内外对生物柴油制造进行的研究和应用，作为生物柴油的副产物，甘油产量大大增加，价格也大幅度下降<sup>[12]</sup>。因此，利用甘油作为发酵原料制造大宗化学品具有丰富、廉价的优势，同时还可降低生物柴油制造业处理副产废物的压力<sup>[13]</sup>。此外，与葡萄糖、木糖等糖类底物相比，甘油代谢产生更高的还原力，是发酵合成还原性化合物的理想碳源<sup>[14]</sup>。Kim 等比较了葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、甘油、半乳糖和乳糖等 6 种碳源对类胡萝卜素合成和重组大肠杆菌生长的影响，发现使用甘油效果最好，葡萄糖效果最差<sup>[15]</sup>。Lee 等也发现在 LB、2×YT、TB 和 MR 培养基中加入葡萄糖会对类胡萝卜素的产量产生显著抑制，而在这些培养基中加入甘油则会提高类胡萝卜素的产量<sup>[16]</sup>。目前报道的甘油转化产品主要有乙醇、丁醇、1,3-丙二醇和丙酸

等。许多微生物都可以利用甘油生产有价值的产品。大肠杆菌遗传背景清晰、基因工程改造手段丰富、营养需求简单和生长迅速，这些特性使其成为工业化规模下利用甘油发酵生产大宗化学品的理想选择<sup>[12]</sup>。通过遗传改良对甘油代谢途径和产物合成途径进行必要的修饰和改造，有助于实现在工业化规模下高效转化甘油为其他产物<sup>[17]</sup>。

大肠杆菌中存在两条甘油代谢途径<sup>[18]</sup>。好氧条件下，环境中的甘油主要通过被动运输进入到大肠杆菌细胞中，首先通过细胞外膜上的孔道蛋白运输到细胞周质中，然后再通过细胞内膜上孔道蛋白 GlpF (*glpF* 编码) 转运到细胞胞浆 (图 1)<sup>[19]</sup>。进入胞浆后的甘油首先在甘油激酶 GlpK 作用下以 ATP 作为磷酸化供体进行

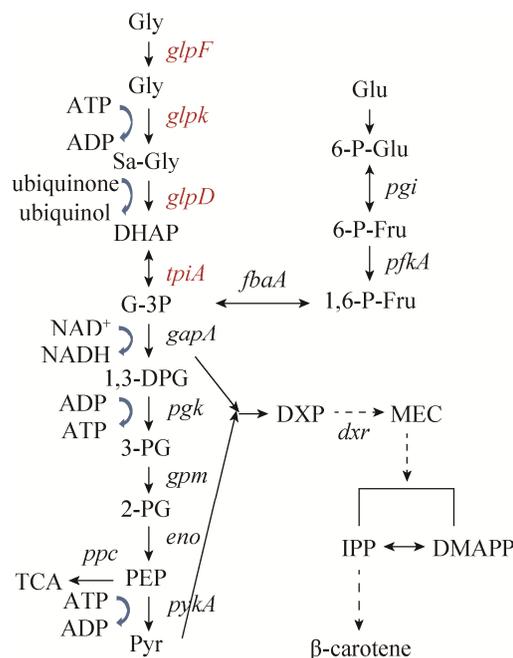


图 1 大肠杆菌中经甘油到萜烯类化合物的代谢途径...表示包含多步催化反应

Fig. 1 Construction of terpenoid synthetic pathway in *E. coli* by integrating heterologous gene.

磷酸化, 然后磷酸化的甘油在 3-磷酸甘油脱氢酶 GlpD (*glpD* 编码) 的作用下氧化获得磷酸二羟丙酮 (DHAP), 在此过程中醛类物质作为电子受体; DHAP 在磷酸丙糖异构酶 TpiA (*tpiA* 编码) 作用下发生异构化形成 3-磷酸甘油醛并用于后续代谢过程<sup>[18]</sup>。3-磷酸甘油醛和丙酮酸是合成萜烯类化合物的直接前体, 因此甘油到 3-磷酸甘油醛途径各基因协调表达, 是合成  $\beta$ -胡萝卜素的重要保证。可以通过改造大肠杆菌好氧条件下甘油代谢途径的相关基因来提高其对甘油的利用, 促进目的产物的合成。

有氧条件下, 甘油经 GlpF、GlpK、GlpD 和 TpiA 催化合成 3-磷酸甘油醛, 这几个蛋白分别由 *glpF*、*glpK*、*glpD* 和 *tpiA* 编码而成, *glpF* 和 *glpK* 在同一操纵子下, 更换基因组上 *glpF* 启动子, 就可以同时对这两个基因进行调控。本研究从实验室构建的产  $\beta$ -胡萝卜素工程菌株 CAR015 出发<sup>[20]</sup>, 敲除了编码 3-磷酸甘油抑制物的 *glpR* 基因, 并用实验室构建的 3 个不同强度的调控元件 M1-37、M1-46 和 M1-93<sup>[21]</sup> 对甘油代谢途径中的 *glpFK*、*glpD* 和 *tpiA* 进行单基因调控和多基因组合调控, 提高重组大肠杆菌合成  $\beta$ -胡萝卜素能力, 同时为利用甘油为碳源合成其他萜烯类化合物及其他目标产物提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

氨苄青霉素、氯霉素, 购自上海生工生物工程有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自生工生物工程 (上海) 有限公司; Trans 2K Plus DNA Marker、EasyTaq PCR

SuperMix DNA 聚合酶购自北京全式金物工程公司; RNA 提取试剂盒 (RNeasy mini kit, Cat, No 74104) 购自 Qiagen 公司; PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶和 DNase I (Recombinant DNase I, RNase-free, Cat, No 2270 A) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Gold View I 型核酸染色剂购自北京索莱宝科技有限公司; Phusion<sup>TM</sup> 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司; RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Scientific; 胡萝卜素标品购自美国 Sigma 公司 (Cat. No. C4582); 其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计, Shimadzu UV-2550 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan); PCR 扩增仪, Eppendorf Mastercycler gradient; 全自动凝胶成像系统, AlphaImager HP; 电转仪 MicroPulser; 台式高速离心机, Eppendorf 5415D; 高速冷冻离心机, Thermo Sorvall Evolution RC; 高效液相色谱, Agilent Technologies Series 1200。实时定量 PCR 仪, CFX connect<sup>TM</sup> Real-Time system (Bio-Rad, Hercules, USA)。

#### 1.1.3 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基及培养方法

LB 培养基: 1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物和 5 g 氯化钠; 氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素终浓度分别为 100、34、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。LB 固体培养基含 1.5% 的琼脂。

LB+2% 甘油培养基: 1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、5 g 氯化钠和 20 mL 甘油。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain names	Relative characteristics	Sources
M1-37	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-37::lacZ	[21]
M1-46	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-46::lacZ	[21]
M1-93	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-93::lacZ	[21]
CAR015	ATCC 8739, <i>ldhA</i> ::M1-93::crtEXYIB, M1-37::dxs, M1-46::idi, M1-46::sucAB, M1-46::sdhABCD, M1-46::talB, mRSL-4::ispG, mRSL-14::ispH	[20]
Gly001	CAR015, $\Delta$ <i>glpR</i>	This work
glpD-M1-37	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-37::glpD	This work
glpD-M1-46	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-46::glpD	This work
glpD-M1-93	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-93::glpD	This work
glpF-M1-37	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-37::glpFK	This work
glpF-M1-46	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-46::glpFK	This work
glpF-M1-93	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-93::glpFK	This work
tpiA-M1-37	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-37::tpiA	This work
tpiA-M1-46	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-46::tpiA	This work
tpiA-M1-93	Gly001, FRT-Km-FRT::M1-93::tpiA	This work
Gly002	Gly001, M1-46::glpD	This work
Gly002, glpF-M1-37	Gly002, M1-37::glpFK	This work
Gly002, glpF-M1-46	Gly002, M1-46::glpFK	This work
Gly002, glpF-M1-93	Gly002, M1-93::glpFK	This work
Gly002, tpiA-M1-37	Gly002, M1-37::tpiA	This work
Gly002, tpiA-M1-46	Gly002, M1-46::tpiA	This work
Gly002, tpiA-M1-93	Gly002, M1-93::tpiA	This work
Gly003	Gly002, M1-46::tpiA	This work
Plasmids		
pXZ-CS	<i>bla</i> ; <i>cat-sacB</i> cassette	[22]
pKD46	<i>bla</i> $\gamma$ <i>exo</i> (Red recombinase), temperature-conditional	[23]

无盐蔗糖培养基 :1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胍、5 g 酵母提取物和 10 g 蔗糖。无盐蔗糖固体培养基含 1.5% 的琼脂。

### 1.2.2 $\beta$ -胡萝卜素产量和甘油残留量的检测方法

保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  的菌种在 LB 平板上划线活化,挑取单菌落接种到 15 mm $\times$ 100 mm 试管 (含 4 mL LB 培养基) 中,  $37^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 24 h, 1% 的接种量转接到 100 mL 三角瓶 (含 10 mL LB+2% 甘油培养基) 中,  $30^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培

养 24 h。收集菌液用于测定  $\beta$ -胡萝卜素含量。

测定  $\beta$ -胡萝卜素产量时,先取 500  $\mu\text{L}$  待测菌液, 13 000 r/min 离心 5 min, 无菌水清洗后, 用 1 mL 丙酮悬浮沉淀, 在  $55^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下萃取 15 min, 然后将样品在 14 000 r/min 下离心 10 min, 含有  $\beta$ -胡萝卜素的上清过滤后用于测定  $\beta$ -胡萝卜素产量。用高效液相色谱测定  $\beta$ -胡萝卜素的浓度<sup>[24]</sup>。检测条件: VWD 检测器, Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),

流动相为甲醇 乙腈 二氯甲烷(21 21 8), 流速 1.0 mL/min, 时间 25 min, 柱温 30 , 检测波长 450 nm。每个待测样品分别有 3 个平行样, 实验结果取自 3 个平行的平均值。用购自 Sigma 公司的  $\beta$ -胡萝卜素标准品构建 HPLC 标准曲线。

对于甘油残留量的测定, 取 1 mL 稀释 10 倍的菌液, 13 000 r/min 离心 5 min, 上清液经滤膜过滤后用于测定甘油残留量。用高效液相色谱测定甘油的浓度<sup>[24]</sup>。检测条件: VWD 检测器, HPX-87H 色谱柱, 流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速 0.5 mL/min, 时间 30 min, 柱温 35 <sup>[25]</sup>。每个待测样品分别有 3 个平行样, 实验结果取自 3 个平行的平均值。

### 1.2.3 一步同源重组调控基因

目前往往通过质粒高表达外源或内源基因, 质粒表达基因可以引起质粒不稳定、代谢负荷等弊端<sup>[26-27]</sup>; 同时大肠杆菌具有多个基因在同一个操纵子下调控的现象, 要高表达同一操纵子下多个基因, 必然需要构建较大质粒, 构建质粒难度更大、质粒稳定性更低。染色体上直接用高强度启动子调控基因, 避免克隆大片段基因, 提高改造效率<sup>[11]</sup>。另外菌株改造时, 有时候需要降低某些基因的转录水平。本研究在染色体上可以通过一步同源重组和两步同源重组的方法对基因进行调控。一步同源重组调控可以快速找出多个基因中的限速步骤<sup>[28]</sup>。两步同源重组方法在染色体上直接对基因进行调控, 可以进行无痕操作, 减少残留条带对后续操作的影响<sup>[11-22]</sup>; 采用一步同源重组的方法, 用 3 个不同强度的启动子 M1-37、M1-46、M1-93 对甘油代谢途径的 3 个基因 *glpD*、*glpFK*、*tpiA* 分别进行单基因调控。相对于大肠杆菌中诱导

后 *lacZ* 启动子, 调控元件 M1-46、M1-37 和 M1-93 的强度分别是它的 1.7、2.5 和 5 倍<sup>[11-21]</sup>。用一对引物 gene-FRT-up/gene-RBS-down 来扩增产用于转化的条带。对于 *glpD* 基因, 使用 *glpD*-FRT-up/*glpD*-RBS-down 引物 (表 2), 分别以 M1-37、M1-46 和 M1-93 的基因组 DNA 为模板扩增 DNA 片段, 将片段电转入含有 pKD46 的菌株 Gly001 的感受态细胞中, 在含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板中过夜培养, 挑选单克隆, 用引物 Kan-F/*glpD*-373-I-r 进行 PCR 验证(表 2)<sup>[21-28]</sup>。验证正确的克隆。采用同样的方法调控 *glpFK* 和 *tpiA* 基因, 所用引物序列在表 2 中列出。

### 1.2.4 两步同源重组调控或敲除基因

两步同源重组敲除或调控基因, 在改造位点不留任何不必要的序列, 有利于进行后续工程改造。用两步同源重组的方法调控或敲除基因包括以下步骤, 第一步同源重组, 在将要敲除或调控基因位点插入一个 *catsacB* 基因片段; 第二步同源重组中, 将带有敲除位点两端同源臂的片段替换 *catsacB* 基因片段, 完成敲除或调控。两步同源重组敲除基因流程如图 2 所示。首先, 用电转到已经转化了 pKD46 的 CAR015 感受态细胞中, 用 *glpR*-*catsacB* 基因片段替换 *glpR* 基因, 用引物 cat-up/*glpR*-300-O-R 来验证成功转化的菌, *glpR*-*catsacB* 基因片段是以 pXZ-CZ 质粒为模板<sup>[22]</sup>, 用引物 *glpR*-cat-up/*glpR*-cat-down (表 2) 扩增得到 (图 2A)。第二步同源重组, *glpR*-*catsacB* 基因片段被 *glpR*-Deletion DNA 片段取代 *glpR*-Deletion 是以大肠杆菌 ATCC 8739 的基因组为模板, 用引物 *glpR*-D-up/*glpR*-300-O-R 扩增得到, 其中 *glpR*-D-up 引物包含 *glpR* 基因 ATG 前 50 bp 同源臂序列和 20 bp 与 *glpR* 基因 TAA 后 20 bp 同源序列, *glpR*-300-O-R 为位于

*glpR* 基因后 300 bp 位置的一段反向互补序列, PCR 扩增得到的第二步同源重组片段分别含 *glpR* 上游 50 bp 同源臂和下游 300 bp 同源臂序列。经第二步同源重组,可敲除掉 *glpR* 基因(图 2B)。第二步重组正确菌株在含有蔗糖的无盐 LB 培养基富集。在蔗糖存在的情况下,表达 *sacB* 基因的菌株因为在培养过程中积累果聚糖对细胞产生毒性而被杀死。*cat-sacB* 基因簇被替换掉

的细胞被初步富集<sup>[11,28-29]</sup>。随后,挑单菌落分别在 LB 和氯霉素平板上进行抗性筛选,挑选 LB 上生长而氯霉素上不生长的菌,用引物 *glpR*-400-O-F/*glpR*-300-O-R 进行 PCR 验证。将敲除 *glpR* 的菌命名为 Gly001。

用参考文献[11]所述方法两步同源重组调控基因 *glpF*、*glpD* 和 *tpiA*。所用引物见表 2, 构建菌株及所用质粒见表 1。

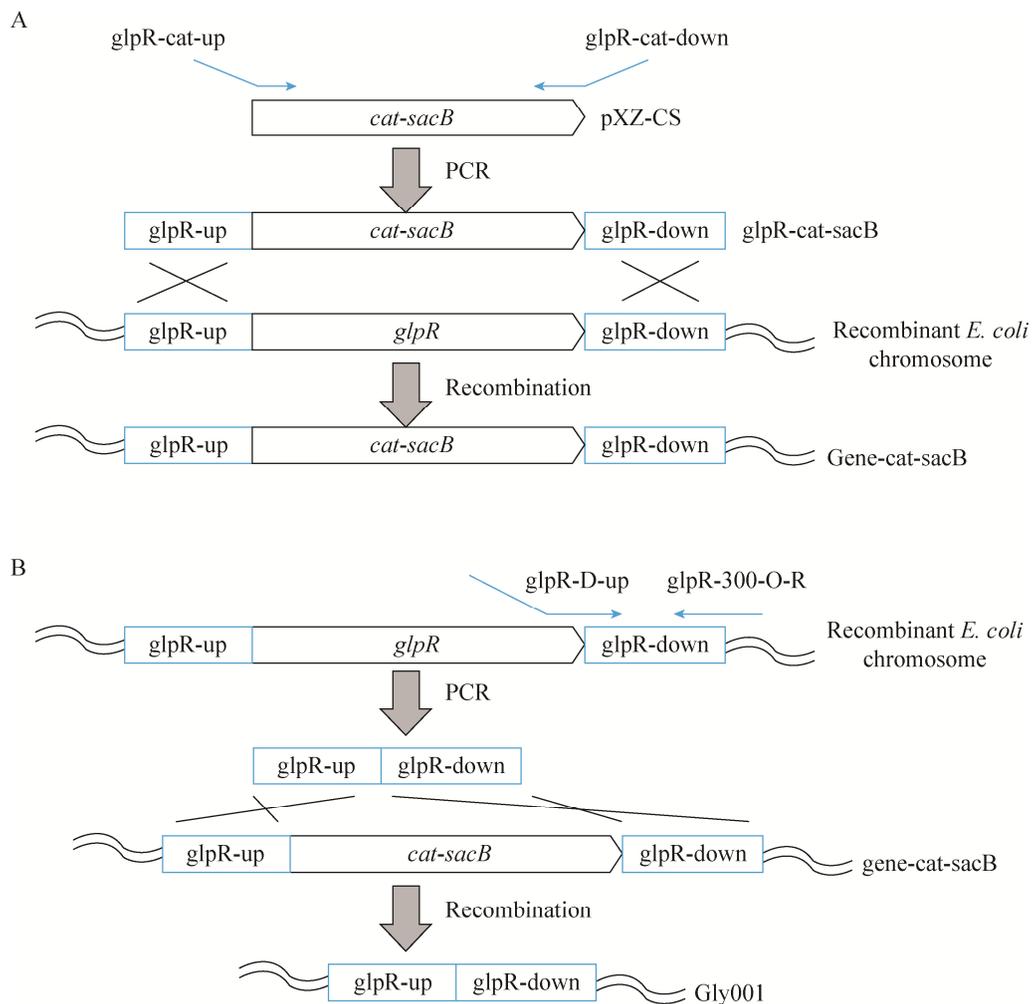


图 2 基因敲除流程图 (A: 第一步同源重组; B: 第二步同源重组)

Fig. 2 Modulation of gene deletion by the two-step recombination method. (A) The first recombination step. (B) The second recombination step.

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')
Deletion of <i>glpR</i> gene	
glpR-cat-up	CACAACGTCACAACGGTATTATCGAACTGGTTAAACAGCAGGGTTATGTC TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
glpR-cat-down	GACCTGGGAAGCATTGCAGGATCAGCACAGCTCCAGTTGAATATGGTGGTTTATTGT TAACTGTTAATTGTCCT
glpR-D-up	CACAACGTCACAACGGTATTATCGAACTGGTTAAACAGCAGGGTTATGTC ACCACCATATTCAACTGGAGC
glpR-400-O-F	TTCTCGCTGATGCATATCCT
glpR-300-O-R	ACTCTGGACGTGGTTGAAGA
Modulation of <i>glpD</i> gene	
glpD-FRT-up	GCACAGTTTACGTGCGAAGCGGCAGATAAACGCCATAATGTTATACATATC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
glpD-RBS-down	CCAGCACCATTGATGCCGCCCTATCACAATCAGATCTTTGGTTTCCATAGCTGTTTC CTGGTT
glpD-cat-up	GCACAGTTTACGTGCGAAGCGGCAGATAAACGCCATAATGTTATACATATC TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
glpD-cat-down	CCAGCACCATTGATGCCGCCCTATCACAATCAGATCTTTGGTTTCCATTTATTGTTA ACTGTTAATTGTCCT
glpD-P-up	GCACAGTTTACGTGCGAAGCGGCAGATAAACGCCATAATGTTATACATATC TTATCTCTGGCGGTGTTGAC
glpD-373-I-r	AACGCAAACCAGTTGATCC
Modulation of <i>glpFK</i> gene	
glpF-FRT-up	AGTTAGCTCCGATTGTATGAAGCCGCGCCATCGCTGTCCAGCGGCACGCCGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
glpF-RBS-down	CCGAGGAATTCAGCAATGCACTGGCCTTTCAAGGTTGATGTTTGACTCATAGCTGTTT CCTGGTT
glpF-cat-up	AGTTAGCTCCGATTGTATGAAGCCGCGCCATCGCTGTCCAGCGGCACGCCTGTGACGG AAGATCACTTCGCA
glpF-cat-down	CCGAGGAATTCAGCAATGCACTGGCCTTTCAAGGTTGATGTTTGACTCATTTATTGTT AACTGTTAATTGTCCT
glpF-P-up	AGTTAGCTCCGATTGTATGAAGCCGCGCCATCGCTGTCCAGCGGCACGCCTTATCTCT GGCGGTGTTGAC
glpF-490-O-f	GATGGTATCAATCGCCTGCT
glpF-461-r	TGTGATGAGTCTGCTCGAAGT
Modulation of <i>tpiA</i> gene	
tpiA-FRT-up	CGATTAAGCTGGCGCTATCTGAATCGCTTGAAGGTTTGAATAAATGACAAGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
tpiA-RBS-down	TGGCGGCTGCCGTTTCAGTTTCCAGTTACCCATCACTAAAGGATGTGCGCATAGCTGTTT CCTGGTT
tpiA-cat-up	CGATTAAGCTGGCGCTATCTGAATCGCTTGAAGGTTTGAATAAATGACAATGTGACGG AAGATCACTTCGCA
tpiA-cat-down	TGGCGGCTGCCGTTTCAGTTTCCAGTTACCCATCACTAAAGGATGTGCGCAT TTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCT

续表 2

tpiA-P-up	CGATTAAGCTGGCGCTATCTGAATCGCTTGAAGGTTTGAATAAATGACAATTATCTCTG GCGGTGTTGAC
tpiA-322-r	GTTCGTCAGACTCTTTGTGG
Primers for Q-PCR	
16S-797-f	CTGGTAGTCCACGCCGTA
16S-963-r	CGAATTAACCACATGCTCCAC
GlpF-443-Q-f	CTTTCGCAGTTGAGATGGTGA
GlpF-573-Q-r	GCCAATGACCGCAATCAGTA
GlpK-547-Q-f	GATTACACCAACGCCTCTCGT
GlpK-700-Q-r	CTTTGCCGCCAATGTTAGTCT
TpiA-415-Q-f	ACTGAAGAAGTTTGCACACG
TpiA-583-Q-r	CGATGTGGTCACGGATGAA
Universal primers for verification	
Kan-F	CCGTGATATTGCTGAAGAG
cat-up	ATGAAACCGCTGATTGCATCTA
P-up	TTATCTCTGGCGGTGTTGAC

### 1.2.5 调控基因转录水平测定

为了确定人工调控元件调控相应基因后转录水平,我们用实时定量 PCR (Q-PCR) 的方法,测定调控前后基因转录水平的改变。将待测菌取单菌落接种于含 3 mL LB 的试管中,培养过夜,以 1% 的接种量转接,30 培养 5 h 后,按照 RNA 提取试剂盒要求收集一定菌体,液氮速冻后,RNA 提取试剂盒提取 RNA,并用 DNase I 去除污染的 DNA,用 RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit 准备 cDNA,用 Q-PCR 仪进行 Q-PCR。16S rRNA 基因为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对转录水平。Q-PCR 引物见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 *glpR* 基因的敲除

GlpR 是三磷酸甘油的阻遏蛋白,在葡萄糖存在下对大肠杆菌的甘油代谢起阻遏作用<sup>[30-33]</sup>。因此,本研究首先敲除编码 GlpR 的基因 *glpR*,防止 GlpR 对甘油代谢的阻抑作用,同时,为重

组工程菌共代谢葡萄糖和甘油做准备。

本研究用两步同源重组的方法,敲除出发菌株 CAR015 中的 *glpR*,特异引物验证阳性克隆(图 3)。

结果如图 3 所示,用引物 *glpR*-400-O-F/*glpR*-300-O-R 进行 PCR 验证,出发菌株 CAR015 为模板,扩增出 1 500 bp 条带,而敲除 *glpR* 后,用同样引物扩增,得到约 700 bp 条带,因此敲除成功,获得菌株命名为 Gly001。

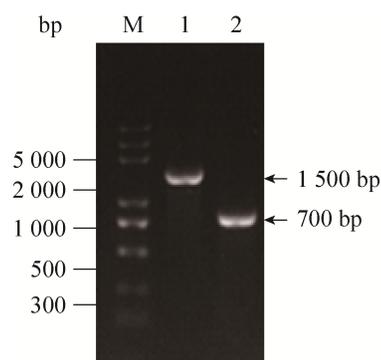


图 3 敲除 *glpR* 前后菌株 PCR 验证

Fig. 3 PCR verification of strain CAR015 and Gly001. M: DNA marker trans2K plus; 1: CAR015; 2: Gly001.

发酵 Gly001, 发现敲除 *glpR* 后,  $\beta$ -胡萝卜素产量比 CAR015 降低约 8%, 生长基本不受影响 (图 4), 可以作为出发菌株, 调控甘油代谢途径各基因。

## 2.2 调控甘油代谢途径基因对 $\beta$ -胡萝卜素产量影响

采用一步同源重组方法, 用 M1-37、M1-46 和 M1-93 号人工调控元件调控甘油代谢途径中的 *glpFK*、*glpD* 和 *tpiA* 基因。

结果表明, M1-37、M1-46 和 M1-93 调控 *glpFK* 基因后, 生长分别为 Gly001 的 0.96、0.76 和 0.57 倍,  $\beta$ -胡萝卜素产量分别为 Gly001 的 0.96、0.76 和 0.54 倍, 甘油消耗分别为 CAR015 的 1.16、1.13 和 1.12 倍, 说明 3 个固定强度调控 *glpFK* 后, 对细胞生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量都有一定抑制作用。*TpiA* 调控后, 生长基本不受影响 (图 4A),  $\beta$ -胡萝卜素产量略高于 Gly001, 分别比 Gly001 提高了 29%、24% 和 17%, 说明, 改变 *tpiA* 的强度可以提高  $\beta$ -胡萝卜素产量。

M1-37 和 M1-93 调控 *glpD* 基因后,  $\beta$ -胡萝卜素产量分别降低了 8% 和 19%, 而生长基本没有影响 (图 4), 但是, 用 M1-46 号人工调控元件调控 *glpD* 后, 生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量明显升高,  $\beta$ -胡萝卜素产量和产率分别达 64.82 mg/L 和 16.44 mg/g DCW, 分别为 CAR015 的 4.86 倍和 2.64 倍。 $OD_{600}$  达 12.19, 为 CAR015 的 1.84 倍, 说明适当强度的人工调控元件调控 *glpD*, 可以有效提高  $\beta$ -胡萝卜素产量。

## 2.3 两基因组合调控提高 $\beta$ -胡萝卜素产量

因为 M1-46 调控 *glpD* 后,  $\beta$ -胡萝卜素产量明显提高, 所以从 *glpD* 调控菌株出发, 分别与 *glpFK* 和 *tpiA* 组合调控, 观察两基因组合调控后, 对细胞生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量的影响。

为了便于对基因组合调控, 都用两步同源重组的方法调控各基因。首先从 Gly001 出发, 两步法用 M1-46 号启动子调控 *glpD* 基因, 得到测序正确菌株, 命名为 Gly002。Gly002 和 *glpD*-M1-46 相比, 两者都为 M1-46 调控, 但是在 *glpD*-M1-46 的启动子前面有一个 FRT-Km-FRT 片段, 从  $\beta$ -胡萝卜素产量来看, Gly002 产量为 68.9 mg/L, 略高于 *glpD*-M1-46 (产量为 64.82 mg/L) (图 5)。

从 Gly002 出发, 用 M1-37、M1-46 和 M1-93 人工调控元件分别调控 *glpFK* 和 *tpiA* 基因, 观察两基因组合调控对  $\beta$ -胡萝卜素产量的影响。

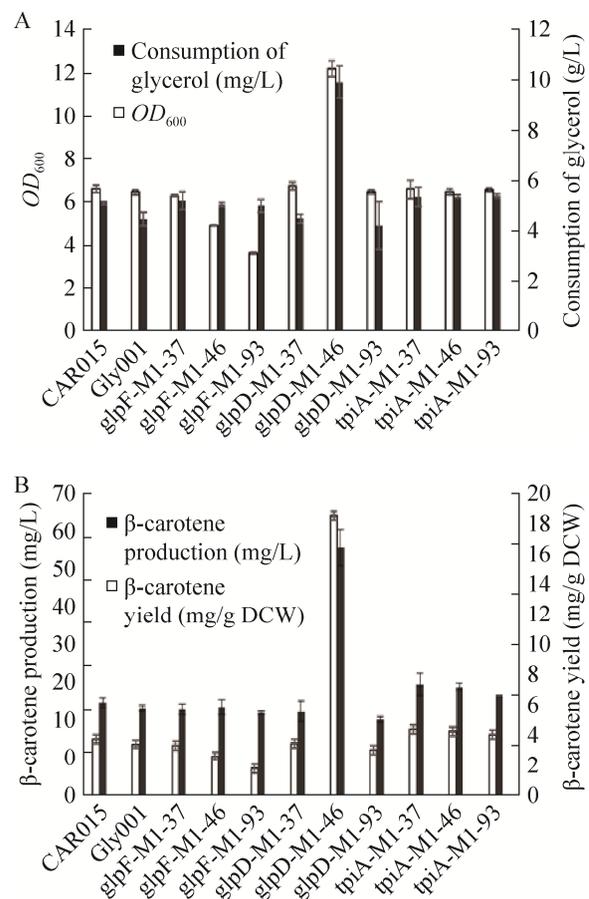


图 4 单基因调控后菌株  $\beta$ -胡萝卜素产量及生长  
Fig. 4  $\beta$ -carotene production and cell growth after modulating single gene.

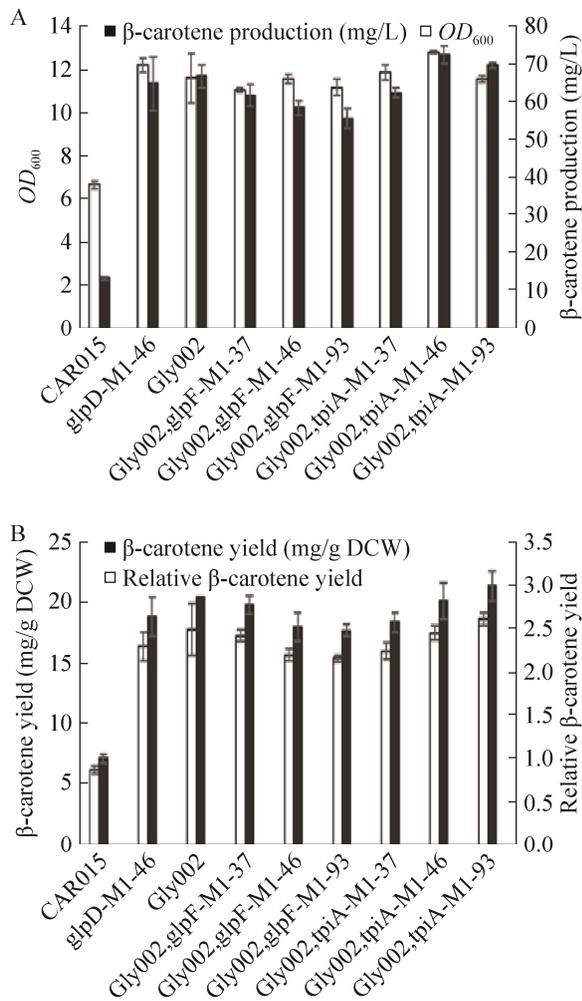


图5 双基因调控后菌株  $\beta$ -胡萝卜素产量及生长  
Fig. 5  $\beta$ -carotene production and cell growth after modulating double genes.

结果表明, 单独调控 *tpiA* 基因时, M1-37号调控后,  $\beta$ -胡萝卜素产量最高(图4)。在Gly002基础上调控 *tpiA* 时, M1-37号调控后,  $\beta$ -胡萝卜素产量反而更低, 说明同样的调控元件, 在不同菌株中, 对目标产物的影响不同。GlpFK调控后, 产量没有提高, 反而下降, 分别比出发菌株Gly002降低8%、13%和17%。双基因组合调控得到  $\beta$ -胡萝卜素产量最高菌株为Gly002, *tpiA*-M1-46, 产量达72.45 mg/L, 比

Gly002提高了8%, 命名为Gly003。

#### 2.4 调控对转录水平的影响

M1-37和M1-93调控 *glpD* 后,  $\beta$ -胡萝卜素产量有一定降低, 而生长基本没有影响(图4), 但是, 用M1-46号人工调控元件调控 *glpD* 后, 生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量明显升高。*glpFK*和 *tpiA* 调控后, 对细胞生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量也有一定影响。本文所用的3个不同强度的启动子是组成型启动子, 对不同基因可能启动强度不同; 另外, 所调控基因在细胞中原始转录水平不同, 调控后相对转录水平是升高还是降低, 结果必定不同。为了研究对基因调控后, 转录水平与生长及  $\beta$ -胡萝卜素产量的关系, 本文用Q-PCR方法, 测定了基因调控菌株中, 相对应基因转录水平的改变。本文以出发菌株Gly001中相对应的基因为1, 来计算改造后基因的相对转录水平。

由图6可知, 从Gly001出发单独调控 *glpFK*, M1-37、M1-46和M1-93调控使 *glpF* 和 *glpK* 转录水平依次升高(图6)。调控后 *glpF* 基因的转录水平都低于对照的转录水平, 但是, 只有M1-37调控使 *glpK* 的转录水平低于对照,

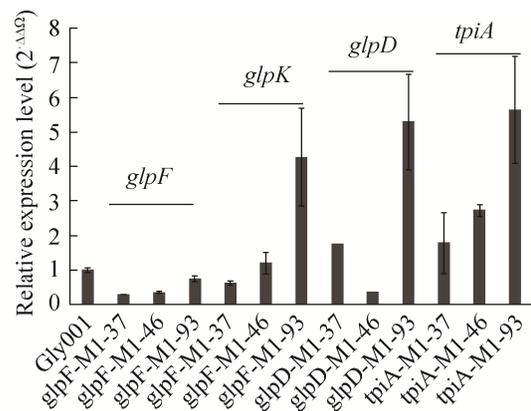


图6 调控对转录水平的影响  
Fig. 6 Relative expression level of *glpF*, *glpK*, *glpD* and *tpiA* after modulated by M1-37, M1-46 and M1-93.

是对照的 0.6 倍, M1-46 和 M1-93 调控都使 *glpK* 转录水平高于对照, 分别是对照的 1.2 和 4.6 倍, 因此, 目前 *glpFK* 的转录水平依然高, 推测进一步降低 *glpFK* 的转录水平可以提高  $\beta$ -胡萝卜素产量, 增加细胞生长速度, 建议进一步用调控元件文库调控 *glpFK* 基因, 以实现提高  $\beta$ -胡萝卜素产量, 增加细胞生长速度的目的。

M1-37 和 M1-93 调控使 *glpD* 转录水平升高, 分别是对照的 1.75 和 5.28 倍 (图 6), M1-46 调控使 *glpD* 转录水平降低了 68%, 调控菌株 *glpD*-M1-46 细胞生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量明显提高, 说明 *glpD* 转录水平降低, 有利于细胞生长及  $\beta$ -胡萝卜素合成。

M1-37、M1-46 和 M1-93 调控使 *tpiA* 转录水平依次升高, 分别是对照的 1.78、2.72 和 5.63 倍 (图 6),  $\beta$ -胡萝卜素产量都有一定提高 (图 4), 说明提高 *tpiA* 的强度可以提高  $\beta$ -胡萝卜素产量。

甘油代谢包括有氧代谢和厌氧代谢两条途径。改造甘油厌氧代谢途径基因集中在提高乙醇、乳酸等产物生成<sup>[17-34]</sup>; Mazumdar 等在微氧条件下过表达甘油有氧代谢中的 *glpK* 和 *glpD* 加速了甘油利用, 提高了 L-乳酸和 D-乳酸的产量<sup>[18-35]</sup>。Applebee 在进行适应性进化研究时发现, 降低 *glpK* 转录水平, 可以减少丙酮醛 (Methylglyoxal) 积累, 降低细胞毒性, 有利于细胞生长<sup>[36]</sup>。本研究发现在有氧条件下, 催化甘油转化成 DHAP 的 *glpFK* 和 *glpD* 转录水平降低, 有利于细胞生长和  $\beta$ -胡萝卜素合成, 而分解 DHAP 的 *tpiA* 转录水平提高有利于细胞生长和  $\beta$ -胡萝卜素产量。丙酮醛主要来自甘油代谢途径的 DHAP, 经丙酮醛合成酶催化形成。本研究中降低 *glpFK* 和 *glpD* 转录水平, 可以通过

减少 DHAP 合成, 进而减少丙酮醛积累, 从而加快细胞生长和提高  $\beta$ -胡萝卜素产量。

### 3 结论

本研究在高产  $\beta$ -胡萝卜素的重组大肠杆菌 CAR015 基础上, 通过用不同强度的人工调控元件调控甘油代谢途径的 *glpFK*、*glpD* 和 *tpiA* 基因, 系统研究了甘油代谢途径各基因转录水平对  $\beta$ -胡萝卜素产量的影响。结果表明, 降低 *glpD* 基因的转录水平可以显著提高重组大肠杆菌的生长速度和  $\beta$ -胡萝卜素产量, *glpFK* 基因的转录水平与  $\beta$ -胡萝卜素合成能力呈反比, 本研究所用固定强度启动子调控 *glpFK* 都不能使  $\beta$ -胡萝卜素产量提高, 需要强度更低的调控元件调控 *glpFK* 基因, 以期提高  $\beta$ -胡萝卜素产量。提高 *tpiA* 的转录水平可以适当增加  $\beta$ -胡萝卜素的产量; 组合调控 *glpD* 和 *tpiA* 基因后, 得到产量最高菌株 Gly003, 小摇瓶发酵 24 h,  $\beta$ -胡萝卜素产量达 72.45 mg/L、产率达 18.65 mg/g DCW, 是高产  $\beta$ -胡萝卜素重组大肠杆菌 CAR015 的 5.23 倍和 1.99 倍。研究结果表明, 适当程度表达甘油代谢途径的 *glpD* 和 *tpiA* 基因, 可以有效提高  $\beta$ -胡萝卜素产量及细胞生长速度, 这个策略可以用于大肠杆菌生产其他萜烯类化合物。

### REFERENCES

- [1] Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, et al. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate-cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(23): 1767-1776.
- [2] Malvy DJM, Burtshy B, Arnaud J, et al. Serum beta-carotene and antioxidant micronutrients in children with cancer. *Int J Epidemiol*, 1993, 22(5): 761-771.

- [3] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of  $\beta$ -carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3/4): 218–226.
- [4] Yoon SH, Park HM, Kim JE, et al. Increased  $\beta$ -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(3): 599–605.
- [5] Yuan LZ, Rouvière PE, LaRossa RA, et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng*, 2006, 8(1): 79–90.
- [6] Lemuth K, Steuer K, Albermann C. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 29.
- [7] Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*, 2008, 5(2): 167–190.
- [8] Alper H, Jin YS, Moxley JF, et al. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 155–164.
- [9] Farmer WR, Liao JC. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2001, 17(1): 57–61.
- [10] Choi HS, Lee SY, Kim TY, et al. *In silico* identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(10): 3097–3105.
- [11] Zhao J, Li QY, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving  $\beta$ -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50.
- [12] Yazdani SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotech*, 2007, 18(3): 213–219.
- [13] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 877–902.
- [14] Clomburg JM, Gonzalez R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(2): 419–434.
- [15] Kim J, Kong MK, Lee SY, et al. Carbon source-dependent carotenoid production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *World J Microb Biotechnol*, 2010, 26(12): 2231–2239.
- [16] Lee PC, Mijts BN, Schmidt-Dannert C. Investigation of factors influencing production of the monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(5): 538–546.
- [17] Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(1): 148–161.
- [18] Mazumdar S, Blankschien MD, Clomburg JM, et al. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 7.
- [19] Heller KB, Lin ECC, Wilson TH. Substratespecificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1980, 144(1): 274–278.
- [20] Zhang XL, Li QY, Tang JL. Construction methods and applications of a  $\beta$ -carotene recombinant microorganisms: CN, 201610866681.9 (in Chinese). 张学礼, 李清艳, 唐金磊. 生产  $\beta$ -胡萝卜素的重组微生物及构建方法和应用: 中国, 201610866681.9.
- [21] Lu J, Tang JL, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *gkK* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455–2462.
- [22] Tan ZG, Zhu XN, Chen J, et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improvement of

- succinate production. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(16): 4838–4844.
- [23] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [24] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of  $\beta$ -carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3/4): 218–226.
- [25] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(48): 20180–20185.
- [26] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(1): 64–76.
- [27] Albermann C, Trachtmann N, Sprenger GA. A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnol J*, 2010, 5(1): 32–38.
- [28] Zhao J, Liu Y, Li QY, et al. Modulation of isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts for improved  $\beta$ -carotene production. *Chin J Biotech*, 2013, 29(1): 41–55 (in Chinese).  
赵婧, 刘怡, 李清艳, 等. 多个调控元件调控萜类合成途径基因表达提高  $\beta$ -胡萝卜素的生产. *生物工程学报*, 2013, 29(1): 41–55.
- [29] Chen J, Zhu XN, Tan ZG, et al. Activating  $C_4$ -dicarboxylate transporters *DcuB* and *DcuC* for improving succinate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(5): 2197–2205.
- [30] Yang B, Larson TJ. Action at a distance for negative control of transcription of the *glpD* gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1996, 178(24): 7090–7098.
- [31] Zeng G, Ye S, Larson TJ. Repressor for the sn-glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: primary structure and identification of the DNA-binding domain. *J Bacteriol*, 1996, 178(24): 7080–7089.
- [32] Larson TJ, Ye SZ, Weissenborn DL, et al. Purification and characterization of the repressor for the sn-glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem*, 1987, 262(33): 15869–15874.
- [33] Schweizer H, Boos W, Larson TJ. Repressor for the sn-glycerol-3-phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: cloning of the *glpR* gene and identification of its product. *J Bacteriol*, 1985, 161(2): 563–566.
- [34] Cintolesi A, Clomburg JM, Rigou V, et al. Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(1): 187–198.
- [35] Mazumdar S, Clomburg JM, Gonzalez R. *Escherichia coli* strains engineered for homo fermentative production of D-lactic acid from glycerol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4327–4336.
- [36] Applebee MK, Joyce AR, Conrad TM, et al. Functional and metabolic effects of adaptive glycerol kinase (GLPK) mutants in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2011, 286(26): 23150–23159.

(本文责编 陈宏宇)