

研究报告

大肠杆菌 LG101 生物合成 L-丙氨酸特征及作为细胞增殖调控节点的研究

韩梦圆¹, 王萌¹, 高明亮¹, 张濛¹, 牛丹丹¹, 王正祥^{*1,2}

1 天津科技大学 化工与材料学院, 天津 300457

2 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457

韩梦圆, 王萌, 高明亮, 张濛, 牛丹丹, 王正祥. 大肠杆菌 LG101 生物合成 L-丙氨酸特征及作为细胞增殖调控节点的研究[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 980-991.

HAN Mengyuan, WANG Meng, GAO Mingliang, ZHANG Meng, NIU Dandan, WANG Zhengxiang. Biosynthetic pathways of L-alanine and their role in the regulation of cell proliferation in *Escherichia coli* LG101[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 980-991.

摘要:【背景】细胞增殖可控是实现发酵自动控制的重要策略之一, 通过对关键营养物可控供给可方便实施细胞增殖调控。【目的】以 L-乳酸单体生产菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) LG101 为起始菌株, 系统解析其 L-丙氨酸生物合成的特征及作为细胞增殖调控节点的可行性。【方法】在全面分析菌株 L-丙氨酸生物合成途径组成特征的基础上, 采用基因重组技术敲除 L-丙氨酸合成途径基因(*avtA*、*alaA*、*alaC*)获得系列突变株, 通过摇瓶和发酵罐发酵检验菌体代谢与生理变化。【结果】大肠杆菌基因组中同时存在至少 3 条 L-丙氨酸生物合成途径, 其中 2 条合成途径以同样是乳酸单体合成前体的丙酮酸为前体物。对相关编码基因进行删除突变, 获得了突变株 LG101A (LG101 $\Delta avtA$)、LG102 (LG101 $\Delta alaA \Delta alaC$)和 LG103 (LG101 $\Delta alaA \Delta alaC \Delta avtA$)。摇瓶培养下, 突变株 LG101A 和 LG102 的细胞增殖特征与出发菌株无明显差异, 突变株 LG103 则表现为 L-丙氨酸营养缺陷型, 并且其细胞增殖与 L-丙氨酸补加量间呈现剂量依赖性正相关关系。进一步在 5 L 发酵罐评估菌株 LG103 的生理与代谢性能。菌株 LG103 可在补加 L-丙氨酸后恢复细胞增殖, 并且发酵结束时的发酵液中 L-丙氨酸水平(0.12 g/L)显著低于出发菌株(0.92 g/L)。【结论】大肠杆菌 LG101 过量合成和积累 L-丙氨酸, 主要通过以谷氨酸和缬氨酸为氨基供体的还原反应进行生物合成, 相应合成途径去除后的突变菌株, 呈现 L-丙氨酸营养缺陷型并呈现剂量依赖关系, 可作为大肠杆菌发酵生产主要化合物如乳酸

资助项目: 天津市杰出人才计划(JC20200309); 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项项目(2018YFE0100400)
This work was supported by the Tianjin Outstanding Talent Program (JC20200309), and the Key Special Project for International Science and Technology Innovation Cooperation between Governments under the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0100400).

*Corresponding author. E-mail: zxwang0519@tust.edu.cn

Received: 2024-05-06; Accepted: 2024-06-02; Published online: 2024-08-01

单体时高效控制细胞增殖的营养开关。

关键词：大肠杆菌；L-丙氨酸合成；细胞增殖控制；乳酸单体

Biosynthetic pathways of L-alanine and their role in the regulation of cell proliferation in *Escherichia coli* LG101

HAN Mengyuan¹, WANG Meng¹, GAO Mingliang¹, ZHANG Meng¹, NIU Dandan¹, WANG Zhengxiang^{*1,2}

¹ College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Background] Controllable cell proliferation is one of the important strategies for achieving automatic control of fermentation. It can be easily implemented by the controlled supply of key nutrients. [Objective] To analyze the characteristics of L-alanine biosynthesis in the L-lactic acid-producing strain *Escherichia coli* LG101 and explore the feasibility of taking L-alanine biosynthesis as a node to regulate cell proliferation. [Methods] We employed site-specific recombination to obtain mutants by deleting the corresponding genes (*avtA*, *alaA*, *alaC*) of the L-alanine biosynthesis pathway on the basis of comprehensively analyzing the L-alanine biosynthesis pathway. Shake-flask and bioreactor experiments were carried out to examine the physiological and metabolic differences between the original strain and the mutants. [Results] There were at least three L-alanine biosynthesis pathways in the genome of *E. coli*, two of which utilized pyruvate (also the precursor for the synthesis of lactic acid) as a precursor. The relevant coding genes were deleted, and mutants LG101A (LG101 $\Delta avtA$), LG102 (LG101 $\Delta alaA \Delta alaC$) and LG103 (LG101 $\Delta alaA \Delta alaC \Delta avtA$) were obtained. In shake-flask culture, the cell proliferation of the mutants LG101A and LG102 was not significantly different from that of the original strain. However, the mutant LG103 was L-alanine auxotrophic, and its proliferation presented a positive dose-dependent correlation with L-alanine supplementation. The physiological and metabolic properties of strain LG103 were further analyzed and evaluated in a 5 L fermenter. The strain LG103 restored cell proliferation after supplementation of L-alanine, and the accumulation of L-alanine (0.12 g/L) in the fermentation broth at the end of fermentation was significantly lower than that (0.92 g/L) of the original strain. [Conclusion] *E. coli* LG101 over-synthesizes and accumulates L-alanine through the reduction reaction with glutamate and valine as amino donors. The mutants with removal of the corresponding synthetic pathways became L-alanine auxotrophic and their proliferation showcased a dose-dependent relationship with L-alanine supplementation. The findings suggest that L-alanine synthesis can be utilized as a nutrient switch to control cell proliferation during the fermentation of *E. coli* for production of major compounds such as lactic acid.

Keywords: *Escherichia coli*; L-alanine synthesis; cell proliferation control; lactic acid monomer

细胞增殖可控是实现发酵自动控制的重要策略之一,通过对关键营养物可控供给可方便实施细胞增殖调控^[1-2]。在工业微生物育种历程中,氨基酸曾经是最常见的营养(特别是营养缺陷型)标记,是控制细胞代谢和细胞增殖的重要抓手^[3-4]。其中,L-丙氨酸(L-alanine)是丰度仅次于天冬氨酸和谷氨酸的一种重要的氨基酸^[5],在微生物生理代谢中处于分支点,可通过转氨反应在糖和氨基酸的生物合成和分解代谢途径中发挥重要作用^[6]。在细菌生理代谢中,L-丙氨酸除作为蛋白质合成原料外,也是胞壁肽聚糖的重要组成部分^[7],对维系菌体细胞活力与生理代谢等至关重要,为细胞生长所必需。因此,将L-丙氨酸生物合成过程用于大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞增殖控制具有潜在可行性。

大肠杆菌具有从头生物合成L-丙氨酸的能力^[8]。已有研究结果显示,大肠杆菌具有相对复杂的L-丙氨酸合成途径,其合成途径中的核心酶包括:缬氨酸-丙酮酸转氨酶(转氨酶C),编码基因为*avtA*^[9-10];谷氨酸-丙酮酸转氨酶(glutamate-pyruvate aminotransferase, AlaA),由*alaA*编码^[11];谷氨酸-丙酮酸转氨酶(glutamate-pyruvate aminotransferase, AlaC),由*alaC*编码^[12]。此外,Mihara等^[13]还发现,半胱氨酸脱硫酶也可将L-半胱氨酸转化为L-丙氨酸。可见,大肠杆菌的L-丙氨酸合成与供给是一个相对复杂的体系,研究并开发其作为控制细胞增殖的遗传或营养开关,需要在上述研究结果的基础上,进一步明确其L-丙氨酸供给途径在菌体生长代谢中的功能或角色。

为此,本研究以产L-乳酸单体工业生产菌株大肠杆菌LG101为研究对象,在分析其L-丙氨酸合成途径组成的基础上,通过遗传修饰对L-丙氨酸生物合成途径进行改造,并研究所获突变株的生长代谢特征及其变化规律,以期探明L-丙氨酸作为大肠杆菌细胞增殖控制节点的

可行性。

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒与引物

本研究所用菌株和质粒见表1。大肠杆菌B0013^[14]和质粒pKD46^[15]、pSKsym^[15]均为本实验室保藏。大肠杆菌LG101用作本研究出发菌株,为产L-乳酸单体工业生产菌株090B^[15]的衍生菌株(菌株090B的基础上进一步删除了*pflCD*、*pflEF*、*tdcE*、*aceA*)。本研究使用的寡核苷酸引物序列见表2,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶和T4 DNA连接酶等,宝日生物技术有限公司;质粒提取试剂盒,广州飞扬生物工程有限公司;DNA纯化试剂盒,北京庄盟国际生物基因科技有限公司;氨苄青霉素和红霉素等,生工生物工程(上海)股份有限公司;其他试剂为国产分析纯。DNA扩增仪,力康生物医疗科技控股有限公司;电转仪,BTX公司;紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;葡萄糖生物传感仪,山东省科学院生物研究所;高效液相色谱仪,浙江福立分析仪器有限公司;HPX-87H色谱柱,Bio-Rad公司。

1.3 培养基

LB培养基(g/L)^[16]:胰蛋白胨10.0,NaCl 10.0,酵母粉5.0。

M9培养基(g/L)^[16]:NaCl 0.5,NH₄Cl 1.0,KH₂PO₄ 3.0,(NH₄)₂SO₄ 3.0,Na₂HPO₄·12H₂O 15.1。

改良M9液体培养基^[16]:每升M9液体培养基中加入1 mL的1 mol/L MgSO₄和1 mL微量元素母液。微量元素母液成分(g/L):FeCl₃·6H₂O 2.400,CoCl₂·6H₂O 0.300,CuCl₂·2H₂O 0.150,ZnCl₂ 0.300,Na₂MO₄·2H₂O 0.300,H₃BO₃ 0.075,MnCl₂·4H₂O 0.500。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmid	遗传特征 Genetic characteristic	来源 Source
Strain		
<i>E. coli</i> B0013	Wild type	[14]
<i>E. coli</i> 090B	B0013 $\Delta ack-pta \Delta pps \Delta pflAB \Delta dld \Delta poxB \Delta frdA \Delta ldhA \Delta adhE::pldhA-BcoaLDH$	[15]
<i>E. coli</i> LG101	090B $\Delta pflCD \Delta pflEF \Delta tdcE \Delta aceA$	Lab stock
<i>E. coli</i> LG101-1	LG101 $\Delta alaA$	This study
<i>E. coli</i> LG102	LG101 $\Delta alaA \Delta alaC$	This study
<i>E. coli</i> LG101A	LG101 $\Delta avtA$	This study
<i>E. coli</i> LG103	LG101 $\Delta alaA \Delta alaC \Delta avtA$	This study
<i>E. coli</i> LG103/pAVTa	LG103 contained the expression vector pHC18-AVTa	This study
Plasmid		
pKD46	Ap ^r , γ , β , <i>exo</i> , red recombinase, temperature-conditional replicon	[15]
pSKsym	Ap ^r	[15]
pSKsym- <i>difEry</i>	Ap ^r , <i>difEry</i>	Lab stock
pSKsym- <i>alaA</i>	Ap ^r , <i>alaA</i>	This study
pSKsym- <i>alaA::difEry</i>	Ap ^r , Ery ^r , <i>alaA::difEry</i>	This study
pSKsym- <i>alaC</i>	Ap ^r , <i>alaC</i>	This study
pSKsym- <i>alaC::difEry</i>	Ap ^r , Ery ^r , <i>alaC::difEry</i>	This study
pSKsym- <i>avtA</i>	Ap ^r , <i>avtA</i>	This study
pSKsym- <i>avtA::difEry</i>	Ap ^r , Ery ^r , <i>avtA::difEry</i>	This study
pHC18	Ap ^r , temperature-conditional replicon	Lab stock
pHC18-AVTa	Ap ^r , temperature-conditional replicon, <i>avtA</i>	This study

表 2 本研究中所使用的引物序列

Table 2 The primer sequence used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
Ala-Up1	CCTGGAAGAAGAAGGTAACAAG
Ala-Up2	CAGTCAGAGGATTCATCGC
Ala-Dn1	GCGATGAATCCTCTGACTGCCCGGAAACACGCCAAAGGCTAC
Ala-Dn2	GTGACAATGCGGAAGTGA
AlaA-1	TCGGAAATCATCACGCAG
AlaADig-2	GCGAACTTGCTCAAAGACA
AlaC-Up1	CATTCCCGCTGGTATCAG
AlaC-Up2	AAGCCTTCGGCATTTCACGATATCATCTTCGGTTTCGG
AlaC-Dn1	GTTGAAATGCCGAAGGCTT
AlaC-Dn2	ACGACGGTGTTTATTCCGC
dAlaC-F	ATGGTTACTCCACTTCACGC
dAlaC-R	TATGGTCATCGTTTGGGC
avtA-1	CCGCTATGACATTCTCCCT
avtA-2	AGCCCTGGGAAGAAGTTGT
avtA-F	CTCACTTCAACAGACCGATT
avtA-R	GCCCAGGCTCTTTCTATCTC
AVTa-F	TTGCAGGATAAAGCACCGCT
AVTa-R	GGCCTGATAAGCGTAGCGCA

1.4 基因克隆与删除

分子克隆、体外重组、转化、DNA 纯化、PCR 基因扩增等按照实验室常规方法进行^[16]。大肠杆菌基因删除按照本实验室先前报道的基于 Red 和 Xer 的殊位重组建立起的无痕基因删除方法进行^[17-18]。参照文献[19]方法提取大肠杆菌 B0013 基因组 DNA, 以此为模板 PCR 扩增制备待删除目的基因 *alaA*、*alaC* 和 *avtA* 片段, PCR 反应条件和体系按照 *Ex Taq*[®] DNA Polymerase 试剂盒说明书操作。PCR 产物克隆入质粒 pSKsym 的 *Sma* I 酶切位点, 获得相应的重组质粒, 再经合适的酶切克隆入 *difEry* 片段(其中 *difEry* 片段由实验室保藏质粒 pSKsym-*difEry* 经 *Sma* I 酶切获得), 通过 PCR 扩增制备突变盒 *alaA::difEry*、*alaC::difEry* 和 *avtA::difEry*, 通过电击转化方法将突变盒依次转化入含有辅助质粒 pKD46 并经 4 mmol/L L-阿拉伯糖诱导的目标菌株, 正确的转化子经传代消除红霉素抗性基因和诊断 PCR 验证获得正确的突变株, 用于后续实验。

1.5 摇瓶培养

摇瓶培养试验在 250 mL 三角瓶中进行, 装液量为 50 mL^[16]。将 LB 平板上 37 °C 生长 24 h 的单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h; 按 0.5% 的接种量转接于含 5 g/L 葡萄糖的 50 mL 改良 M9 培养基中, 37 °C、200 r/min 好氧培养菌体。为了确定 L-丙氨酸添加量对营养缺陷型菌株生长的影响, 在 50 mL 的液体培养基中添加不同浓度的 L-丙氨酸, 培养 10 h 后测定菌体密度(OD_{600})用于评价菌体的生长情况。

1.6 发酵罐发酵试验

发酵罐发酵试验在 5 L 发酵罐中进行, 工作起始体积为 2.5 L^[16]。将新鲜培养获得的单菌落接种于 50 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h。以此为种子, 接种装有 2.5 L 改良

M9 培养基的发酵罐, 培养温度 37 °C, 维持溶氧 20% 以上, 至 OD_{600} 达到 30 左右。关闭通风、降低搅拌速度至 200 r/min、流加 60% 葡萄糖液维持发酵培养基中糖浓度不低于 20 g/L, 补加 25% $Ca(OH)_2$ 维持发酵培养基 pH 值为 7.0。过程中定时取样, 进行生物量、残糖、有机酸等分析。

1.7 发酵样品检测方法

发酵液中菌体量采用浊度法间接测量, 利用紫外分光光度计以 OD_{600} 表示或进一步换算为菌体干重^[16]。发酵液中残糖量用 SBA-40C 葡萄糖生物传感仪进行分析。有机酸组成与含量用高效液相色谱法进行定量分析^[16], 色谱柱为 HPX-87H, 流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 , 流速为 0.6 mL/min, 柱温 65 °C, 检测器为紫外检测器。发酵样本中 L-丙氨酸含量委托瀚盟测试科技(天津)有限公司, 通过高效液相色谱法进行定量分析。

1.8 细胞增殖参数统计

细胞增殖数据参照文献[20]介绍的方法。其中, 细胞增殖时的倍增时间(t_d), 以时间(t)为横坐标, 以 $\log_2 OD_{600}$ 为纵坐标绘制生长曲线确定指数生长范围, 在此范围内, 细胞倍增时间(t_d)按公式(1)计算, 比生长速率(μ)按公式(2)计算, 相对生长速率(k)按公式(3)计算。

$$t_d = (t_j - t_i) / \log_2 (OD_j / OD_i) \quad (1)$$

$$\mu = 1 / t_d \quad (2)$$

$$k = \ln 2 / t_d \quad (3)$$

式中: t_j 为 j 时刻菌体生长时间; t_i 为 i 时刻菌体生长时间; OD_j 为 j 时刻菌体吸光度; OD_i 为 i 时刻菌体吸光度; $OD_j = 2OD_i$ 。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌存在 2 条独立的、以丙酮酸为前体物的 L-丙氨酸合成途径

通过对大肠杆菌 K-12 基因组的代谢途径分析, 明确了大肠杆菌中负责其 L-丙氨酸生物合成的代谢途径至少有 3 条(图 1), 分别是: L-谷

氨酸经谷氨酸-丙酮酸转氨酶(glutamate-pyruvate aminotransferase, AlaA、AlaC)催化丙酮酸还原转氨形成 L-丙氨酸(途径 A), 丙酮酸和 L-缬氨酸经缬氨酸-丙酮酸转氨酶(valine-pyruvate aminotransferase, AvtA)催化形成 L-丙氨酸(途径 B), 以及 L-半胱氨酸在半胱氨酸脱硫酶(cysteine desulfurase, SufS、IscS)作用下形成 L-丙氨酸(途径 C)。鉴于丙酮酸同样也是乳酸单体生物合成的直接前体物, 并且本研究出发菌株为 L-乳酸单体生产菌株, 其细胞增殖过程采用化学限定基本培养基^[14], 发酵过程中也未检测到 L-半胱氨酸在发酵液中的积累。因此, 本研究不考虑途径 C 作为调控 L-丙氨酸合成的研究对象, 重点研究 L-丙氨酸生物合成途径的途径 A 和途径 B 在大肠杆菌生理代谢中发挥的作用。

2.2 大肠杆菌 LG101 的 L-丙氨酸生物合成特征

2.2.1 *alaA*、*alaC* 和 *avtA* 删除突变及其突变株的获得

对菌株 LG101 基因组中 L-丙氨酸转氨酶编码基因 *alaA*、*alaC* 和 *avtA* 进行单个删除和组合删除, 经 PCR 验证, 结果如图 2 所示。*alaA* 突变后形成 1.2 kb 大小的突变条带(野生型为

1.5 kb), *alaC* 突变后形成 0.7 kb 大小的突变条带(野生型为 1.1 kb), *avtA* 突变后形成 1.0 kb 大小的突变条带(野生型为 1.3 kb)。可见, 菌株 LG101 中 *alaA*、*alaC* 和 *avtA* 皆被成功删除, 所获得突变株分别命名为 LG102 (LG101 $\Delta alaA \Delta alaC$)、LG101A (LG101 $\Delta avtA$) 和 LG103 (LG101 $\Delta alaA \Delta alaC \Delta avtA$)。

2.2.2 L-丙氨酸生物合成供给对细胞生长的影响

在获得相应突变株后, 进一步考察了 L-丙氨酸合成途径调控对菌株 L-丙氨酸营养需求及其细胞增殖的影响。将突变株 LG102、LG101A 和 LG103 在相同条件下进行摇瓶培养, 定时取样测定其生物量, 结果如图 3 所示。突变株 LG102 和 LG101A 均可以在基本培养基中正常生长, 并且与出发菌株 LG101 的生长趋势和最大菌体量基本一致。这一结果表明, 在大肠杆菌 LG101 中仅阻断 L-丙氨酸合成途径 A 或途径 B 均不会对其细胞增殖与生长造成显著影响, 也即 $\Delta alaA$ 、 $\Delta alaC$ 和 $\Delta avtA$ 突变所形成的突变株 LG102 和 LG101A 皆不表现为 L-丙氨酸营养缺陷型或部分营养缺陷型。同时观察到 $\Delta alaA$ 、 $\Delta alaC$ 和 $\Delta avtA$ 组合突变株 LG103 则表现出

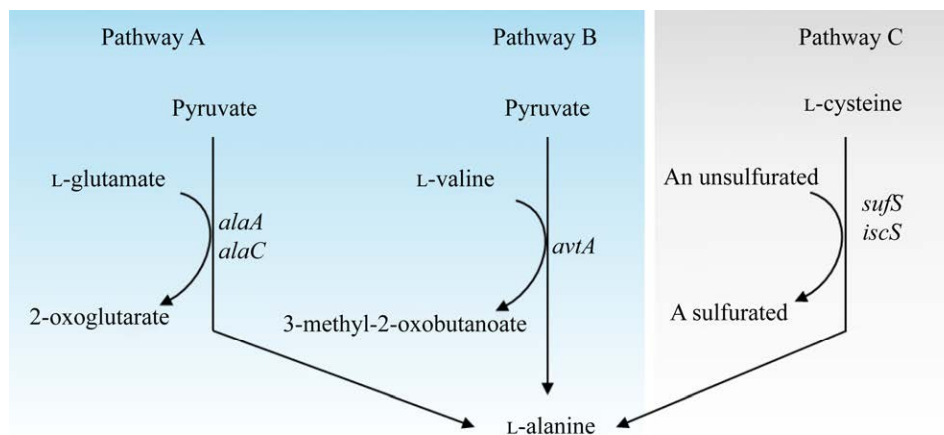


图 1 大肠杆菌 L-丙氨酸生物合成途径

Figure 1 Biosynthesis pathways for the synthesis of L-alanine in *Escherichia coli*.

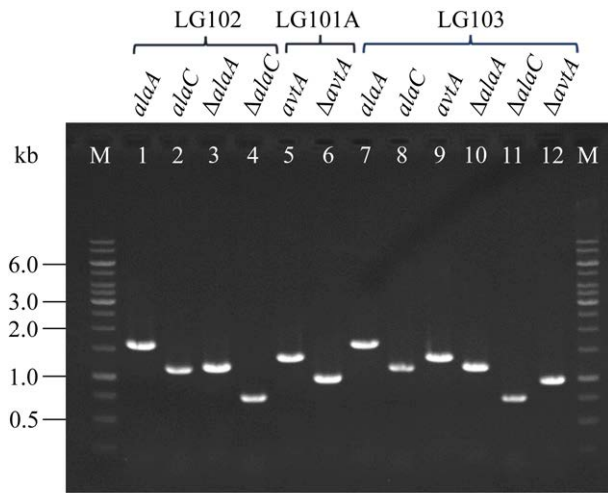


图2 大肠杆菌 LG101 中 *alaA*、*alaC* 和 *avtA* 删除突变及突变株的诊断 PCR 检验 M:DL10000 DNA marker; 1-4: 突变株 LG102 中 *alaA* 和 *alaC* 同时发生突变; 5-6: 突变株 LG101A 中 *avtA* 发生突变; 7-12: 突变株 LG103 中 *alaA*、*alaC* 和 *avtA* 同时发生突变。

Figure 2 *Escherichia coli* mutants with *alaA*, *alaC* and *avtA* mutation confirmed through diagnosis PCR. M: DL10000 DNA marker; 1-4: Mutation of both *alaA* and *alaC* in mutant LG102; 5-6: Mutation of *avtA* in mutant LG101A; 7-12: Combined mutations of *alaA*, *alaC*, and *avtA* in mutant LG103.

长缓慢、延滞期变长、达到最大菌体量的时间(20 h)较出发菌株(9 h)延长了 122.22%，并且其达到的最大生物量($OD_{600}=2.00$)仅为出发菌株($OD_{600}=3.14$)的 63.70%；在培养基中补加 100 $\mu\text{g/mL}$ L-丙氨酸后，其生长能力获得了显著改善(图 3)，表明突变株 LG103 尽管未出现完全 L-丙氨酸营养缺陷型，但其 L-丙氨酸从头合成能力已经不能满足其正常生长所需，L-丙氨酸的适量外源补充是恢复其正常生长繁殖的直接方式。

进一步考察了外源 L-丙氨酸补加量对菌株 LG103 生长的影响，结果汇总于图 4 和表 3。在一定浓度范围内，随着 L-丙氨酸添加量的增加，

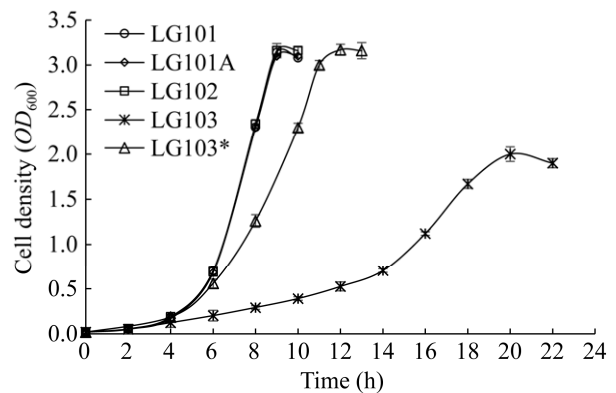


图3 摇瓶培养下 L-丙氨酸生物合成突变株的生长特征 LG103*:LG103 摇瓶培养补加了 100 $\mu\text{g/mL}$ L-丙氨酸。

Figure 3 The growth curves of mutants in shake flask culture. LG103*: 100 $\mu\text{g/mL}$ L-alanine was added in shake flask culture of strain LG103.

菌株 LG103 的生长延滞期和倍增时间不断缩短，即细胞增殖速率随 L-丙氨酸添加量的增加而提升；当 L-丙氨酸的补加量为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时，菌株 LG103 的生物量达到最大且延滞期和倍增时间最短，此与出发菌株的生长特征最为相近(图 4A，表 3)。继续增大 L-丙氨酸的添加量，菌株 LG103 的细胞增殖速率则未表现出继续增加甚至有所降低(图 4B，表 3)，此为几乎所有营养缺陷型菌株的常态型生长特征。可见，菌株 LG103 增殖水平与外源 L-丙氨酸添加量之间存在典型的剂量-效应关系，以 L-丙氨酸生物合成供给为节点控制其细胞增殖是可行的。

2.3 L-丙氨酸生物合成途径可以作为发酵过程控制细胞增殖的节点

摇瓶培养试验结果表明，单独阻断大肠杆菌 L-丙氨酸合成途径 A 或途径 B 对细胞增殖无显著影响，同时阻断合成途径 A 和途径 B，则自身 L-丙氨酸从头合成量明显不足支撑细胞增殖，补充适量 L-丙氨酸后可基本恢复其原有细胞增殖水平。为此，进一步在 5 L 发酵罐中

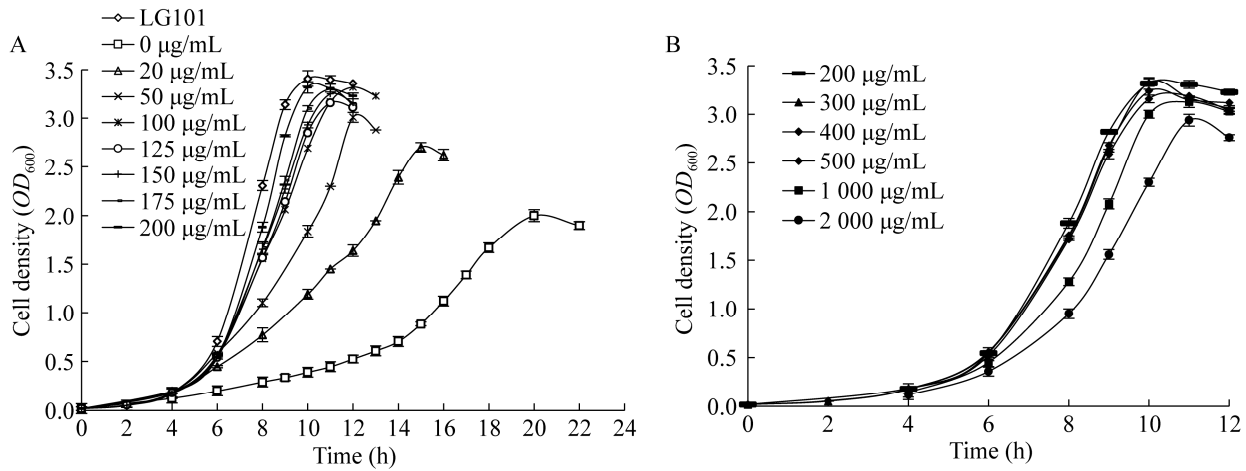


图 4 不同 L-丙氨酸添加量的 LG103 生长曲线 A: 补加 0、20、50、100、125、150、175、200 µg/mL L-丙氨酸的 LG103 的生长曲线; B: 补加 200、300、400、500、1 000、2 000 µg/mL L-丙氨酸的 LG103 的生长曲线。

Figure 4 Growth curves of LG103 with varying amounts of L-alanine supplementation. A: The growth curves of LG103 were supplemented with 0, 20, 50, 100, 125, 150, 175, 200 µg/mL L-alanine; B: The growth curves of LG103 were supplemented with 200, 300, 400, 500, 1 000, 2 000 µg/mL L-alanine.

表 3 不同 L-丙氨酸添加量的 LG103 好氧生长特征参数比较

Table 3 Aerobic growth parameters of LG103 under different L-alanine supplementation

L-丙氨酸添加量 L-alanine supplementation (µg/mL)	细胞倍增时间 Cell doubling time (min)	比生长速率 Specific growth rate (h ⁻¹)	相对生长速率 Relative growth rate (h ⁻¹)	细胞增殖速率回归方程* Regression equation of cell propagation rate*
0	192.74	0.31	0.22	y=0.31x-4.76
20	170.31	0.35	0.24	y=0.35x-3.25
50	150.75	0.40	0.28	y=0.40x-3.16
100	78.23	0.77	0.53	y=0.77x-5.48
125	77.32	0.78	0.54	y=0.78x-5.55
150	73.66	0.81	0.56	y=0.81x-5.76
175	72.81	0.82	0.57	y=0.82x-5.85
200	71.68	0.84	0.58	y=0.84x-5.82
300	72.52	0.83	0.57	y=0.83x-5.82
400	72.60	0.83	0.57	y=0.83x-5.80
500	74.32	0.81	0.56	y=0.81x-5.72
1 000	76.14	0.79	0.55	y=0.79x-5.92
2 000	84.01	0.71	0.50	y=0.71x-5.84

*: 细胞指数生长阶段的增殖速率回归方程; y: log₂ OD₆₀₀; x: 培养时间。

*: The equation was calculated in the exponential aerobic growth phase, y: log₂ OD₆₀₀; x: Incubation time.

进行发酵试验, 检验菌株 LG103 在模拟生产状态下的细胞增殖特征及其对目标产物 L-乳酸单体合成的影响。通过在培养基中一次性补加 L-

丙氨酸, 菌株 LG103 的好氧增殖能力得到极大的恢复(图 5), 其比生长速率恢复到出发菌株的 81.25% (表 4)。

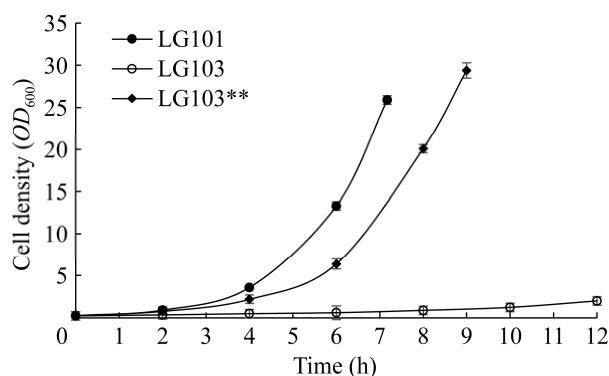


图5 突变株 LG103 在 5 L 发酵罐中的生长特征
LG103^{**}: LG103 生长阶段补加了 15 g L-丙氨酸。
Figure 5 Growth property of mutant in 5 L fermenter. LG103^{**}: The growth stage of LG103 was supplemented with 15 g L-alanine.

表4 突变株好氧生长特征参数比较

Table 4 Comparison of the mutants' growth parameters

菌株 Strain	细胞倍增 时间 Cell doubling time (min)	比生长速 率 Specific growth rate (h ⁻¹)	相对生长 速率 Relative growth rate (h ⁻¹)	细胞增殖速率 回归方程* Regression equation of cell propagation rate*
LG101	62.73	0.96	0.66	$y=0.96x-2.03$
LG103	285.71	0.21	0.15	$y=0.21x-1.89$
LG103 ^{**}	76.90	0.78	0.54	$y=0.78x-1.96$

*: y : $\log_2 OD_{600}$, x : 培养时间; **: 菌株 LG103 生长阶段补加了 15 g L-丙氨酸。

*: y : $\log_2 OD_{600}$, x : Incubation time; **: The growth stage of LG103 was supplemented with 15 g L-alanine.

进一步对菌株 LG103 发酵生产 L-乳酸单体的性能进行分析, 结果汇总于表 5。其目标产物 L-乳酸的合成水平和转化率维系略高水平。由于外源补加 L-丙氨酸未能完全恢复其原生长速率, 连带影响了 L-乳酸合成效率。可见, 在乳酸单体生产菌株中引入 L-丙氨酸合成节点, 可以通过建立 L-丙氨酸代谢控制营养开关, 从而实现细胞增殖与增殖速率的有效控制。此

外, 发酵结束时突变株 LG103 在其发酵液中的 L-丙氨酸的积累仅为 0.12 g/L, 较出发菌株 (0.92 g/L) 减少了 86.96%, 进一步说明 L-丙氨酸作为细胞增殖控制的营养开关的有效性, 并进一步提升后续乳酸单体的生物经济效率的可行性。

表5 突变株发酵性能数据比较

Table 5 Comparison of fermentation performance by mutants

Item	LG101	LG103 ^f
L-乳酸产率 L-lactate titer (g/L)	129.86±1.50	131.17±0.50
L-乳酸生产速率 ^a L-lactate volumetric productivity ^a (g/(L·h))	4.69±0.20	4.24±0.50
限氧阶段 L-乳酸生产速率 ^b Oxygen-limited volumetric L-lactate productivity ^b (g/(L·h))	7.18±0.10	6.30±0.15
限氧阶段 L-乳酸比生产速率 ^c Oxygen-limited specific L-lactate productivity ^c (g/(g·h))	0.82±0.01	0.59±0.05
限氧阶段葡萄糖比消耗速率 ^d Oxygen-limited specific glucose consumption ^d (g/(L·h))	0.82±0.00	0.60±0.10
限氧阶段 L-乳酸转化率 ^e Oxygen-limited L-lactate yield ^e (g/100 g glucose)	98.54±0.20	98.95±0.06

^a: 整个发酵阶段的 L-乳酸平均生产速率; ^b: 限氧阶段的 L-乳酸平均生产速率; ^c: 限氧阶段的平均 L-乳酸比生产速率; ^d: 限氧阶段的平均葡萄糖比消耗速率; ^e: 限氧阶段的 L-乳酸平均转化率; ^f: 菌株 LG103 生长阶段补加 15 g L-丙氨酸。

^a: Average volumetric productivity for L-lactate during the overall fermentation process; ^b: Average volumetric productivity for L-lactate during the oxygen-limited phase; ^c: Average specific lactate productivity during the oxygen-limited phase; ^d: Average specific glucose consumption rate during the oxygen-limited phase; ^e: Average L-lactate yield during the oxygen-limited phase; ^f: The growth stage of LG103 was supplemented with 15 g L-alanine.

2.4 通过遗传回补可以利用 L-丙氨酸生物合成途径高效控制细胞的增殖

鉴于在培养基中外源补充一定量的 L-丙氨酸可以极大程度地恢复菌株 LG103 的好氧增殖, 但未能完全恢复突变株的生长繁殖能力, 为此, 进一步尝试运用遗传回补法恢复突变株 LG103 的原生长繁殖属性。将包含完整启动子序列的 *avtA* 克隆入单拷贝载体 pHC18 中并转化入突变株 LG103 中, 获得转化子 LG103/pAVTa。此转化子在 5 L 发酵罐中的好氧增殖特征与原出发菌株无异, 即完全恢复了其生长繁殖的能力(图 6A)。进一步借助质粒 pHC18 原有的复制温度敏感性特点, 可以经培养温度的调节自动控制菌株的增殖和所需的细胞密度(图 6B)。

3 讨论

本研究系统解析了大肠杆菌 LG101 中 L-丙氨酸生物合成途径及其在细胞增殖调控中的作用。通过对 L-丙氨酸合成相关基因 *avtA*、*alaA* 和 *alaC* 的删除, 获得系列突变株, 再通过丙氨酸补充、遗传回补及发酵试验等进一步验证了将 L-丙氨酸生物合成与生物供给途径转换为细胞增殖控制节点的可行性和有效性。这一研究工作将在后续乳酸单体新工业菌种创建中获得完善与优化。

前人已有相关研究揭示, 大肠杆菌 K-12 中具有 *AlaA/AlaC* 和 *AvtA* 等 L-丙氨酸转氨酶^[11-12], 分别通过转氨还原其前体物丙酮酸催化 L-丙氨酸的生物合成, 其氨基的供体则分别为谷氨酸和缬氨酸。本研究中发现, 突变株 LG101A 和 LG102 的细胞增殖特征与出发菌株无明显差异, 表明菌株 LG101A 和 LG102 通过任一条 L-丙氨酸合成途径皆可获得满足其细胞增殖所需的 L-丙氨酸。L-丙氨酸生物合成的 2 条途径皆被阻断的突变株 LG103, 则表现为典型的 L-丙氨酸

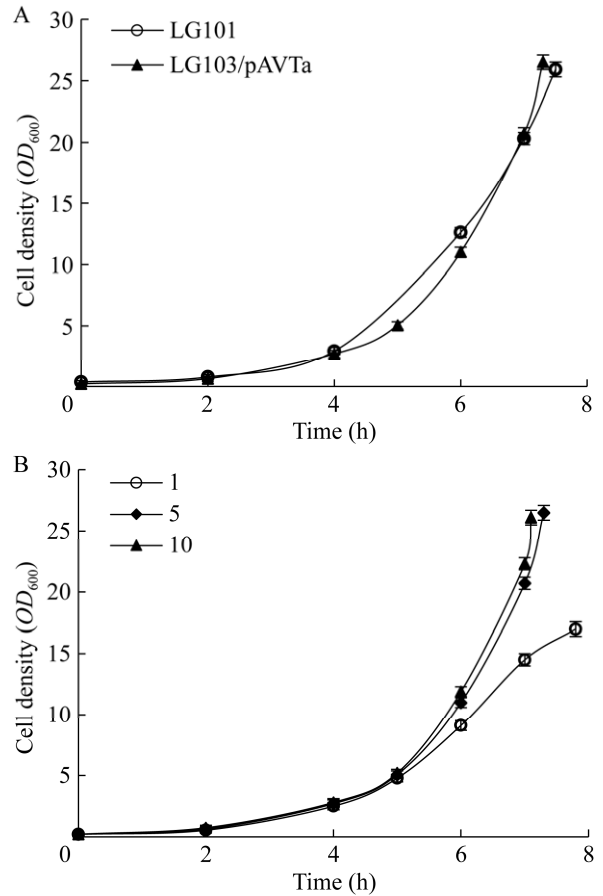


图 6 突变株 LG103/pAVTa 在 5 L 发酵罐中的生长特征 A: 突变株 LG103/pAVTa 与出发菌株 LG101 的生长曲线; B: 重组菌 LG103/pAVTa 以不同菌体积累量(OD_{600} 值)为变温节点的生长曲线; 1、5 和 10: 在菌体积累量(OD_{600} 值)达到约 1、5 和 10 时调整培养温度。

Figure 6 Growth property of mutant in 5 L fermenter. A: Growth curves of LG103/pAVTa and LG101; B: With different OD_{600} values as the starting points for adjusting the culture temperature, the growth curves of LG103/pAVTa were obtained; 1, 5 and 10: adjust the culture temperature when the accumulation of bacteria (OD_{600} value) reaches about 1, 5 and 10.

营养缺陷型表型, 并且其细胞增殖与外源补加的 L-丙氨酸量呈现剂量依赖性正相关关系, 进一步表明通过调整/控制 L-丙氨酸的供给, 可以

有效控制细胞的增殖速率与细胞密度。这一结果也间接表明,另一条经半胱氨酸脱硫酶(SufS、IscS)催化合成L-丙氨酸的生物合成途径^[13]至少在本研究所采用的菌株中的生物作用贡献度较低。

鉴于自然条件下微生物发酵生成乳酸的生物过程是一个典型的厌氧初级代谢过程,而多数细胞仅在好氧条件能高效增殖,与乳酸厌氧合成与积累自相矛盾,无法在工业规模下实现高效的细胞增殖,也就无法实现具有工业价值的乳酸生成。前期的相关研究已经揭示,通过温度诱导表达^[16]或以温度为环境条件^[15]来呈现合成途径关键酶的催化活力等新策略,一方面可以与发酵过程控制高度整合,另一方面可以在有效控制乳酸合成的同时,兼顾改善了细胞增殖速率与细胞活力。通过创建硫胺素营养缺陷型生产菌株,并基于此建立了以最适量硫胺素补充为细胞密度控制的主要手段,成功实现了对乳酸单体工业生产菌株细胞增殖的直接精准控制^[2]。本研究阐明了大肠杆菌L-丙氨酸供给与其细胞增殖间的相关关系,未来可运用L-丙氨酸生物合成与供给这一新节点,独立或与上述策略有机结合,实现对乳酸单体生产菌株及相关工业菌种的细胞增殖高效管控。

4 结论

乳酸单体工业生产菌株LG101中存在功能完整的多条L-丙氨酸生物合成途径,通过遗传修饰可以获得L-丙氨酸营养缺陷型突变株。所获得的突变可以通过在培养基中补加一定量的L-丙氨酸,恢复其在基本培养基上的生长性能。通过遗传回补法回补表达*avtA*,则可以完全恢复突变株为L-丙氨酸原养型生长速率。可见,L-丙氨酸生物合成途径可以作为大肠杆菌细胞

的代谢控制节点应用于包括乳酸单体等重要工业菌株在内的细胞生长繁殖的主动可控。

REFERENCES

- [1] 王正祥. 我国聚乳酸产业发展现状与对策研究[J]. 中国工程科学, 2021, 23(6): 155-166.
WANG ZX. China's polylactic acid industry: current status and development strategies[J]. Strategic Study of CAE, 2021, 23(6): 155-166 (in Chinese).
- [2] TIAN KM, NIU DD, LIU XG, PRIOR BA, ZHOU L, LU FP, SINGH S, WANG ZX. Limitation of thiamine pyrophosphate supply to growing *Escherichia coli* switches metabolism to efficient D-lactate formation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(1): 182-188.
- [3] YAN CX, GAO N, CAO X, YAO L, ZHOU YJ, GAO JQ. Auxotrophs compromise cell growth and fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Journal, 2023, 18(4): e2200510.
- [4] ZHU JJ, THOMPSON CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20: 436-450.
- [5] 孟帅帅, 黄钦耿, 吴松刚, 刘峰. 丙氨酸转氨酶修饰对大肠杆菌L-色氨酸合成的影响[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 66-72.
MENG SS, HUANG QG, WU SG, LIU F. Effects of modification of alanine aminotransferase on synthesis of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 66-72 (in Chinese).
- [6] PEÑA-SOLER E, FERNANDEZ FJ, LÓPEZ-ESTEPANA M, GARCÉS F, RICHARDSON AJ, QUINTANA JF, RUDD KE, COLL M, VEGA MC. Structural analysis and mutant growth properties reveal distinctive enzymatic and cellular roles for the three major L-alanine transaminases of *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102139.
- [7] REITZER L. Biosynthesis of glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine[J]. EcoSal Plus, 2004. DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.3.
- [8] MISHIMA H, WATANABE H, UCHIGASAKI K, SHIMODA S, SEKI S, KUMAGAI T, NOCHI T, ANDO T, YONEYAMA H. L-alanine prototrophic suppressors emerge from L-alanine auxotroph through stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*[J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 472.
- [9] FALKINHAM JO 3rd. Identification of a mutation affecting an alanine-alpha-ketoisovalerate transaminase activity in *Escherichia coli* K-12[J]. Molecular & General Genetics, 1979, 176(1): 147-149.
- [10] WANG MD, LIU L, WANG BM, BERG CM. Cloning and characterization of the *Escherichia coli* K-12 alanine-valine transaminase (*avtA*) gene[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(9): 4228-4234.

- [11] KIM SH, SCHNEIDER BL, REITZER L. Genetics and regulation of the major enzymes of alanine synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(20): 5304-5311.
- [12] YONEYAMA H, HORI H, LIM SJ, MURATA T, ANDO T, ISOGAI E, KATSUMATA R. Isolation of a mutant auxotrophic for L-alanine and identification of three major aminotransferases that synthesize L-alanine in *Escherichia coli*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(5): 930-938.
- [13] MIHARA H, ESAKI N. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(1): 12-23.
- [14] 周丽, 田康明, 左志锐, 陈献忠, 石贵阳, Suren Singh, 王正祥. 大肠杆菌琥珀酸和乙酸合成途径的删除及其重组菌株的 D-乳酸发酵[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 31-40.
ZHOU L, TIAN KM, ZUO ZR, CHEN XZ, SHI GY, SINGH S, WANG ZX. Elimination of succinate and acetate synthesis in recombinant *Escherichia coli* for D-lactate production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(1): 31-40 (in Chinese).
- [15] NIU DD, TIAN KM, PRIOR BA, WANG M, WANG ZX, LU FP, SINGH S. Highly efficient L-lactate production using engineered *Escherichia coli* with dissimilar temperature optima for L-lactate formation and cell growth[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 78.
- [16] ZHOU L, NIU DD, TIAN KM, CHEN XZ, PRIOR BA, SHEN W, SHI GY, SINGH S, WANG ZX. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 560-568.
- [17] 周丽, 牛丹丹, 李宁, 陈献忠, 石贵阳, 王正祥. 基于 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌多基因删除方法[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 923-928.
ZHOU L, NIU DD, LI N, CHEN XZ, SHI GY, WANG ZX. Multiple gene inactivation approach in *Escherichia coli* mediated by a combination of Red recombination and Xer recombination[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 923-928 (in Chinese).
- [18] 王正祥. 微生物遗传育种[M]. 北京: 高等教育出版社, 2020: 168.
WANG ZX. *Genetic Breeding of Microorganisms*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2020: 168 (in Chinese).
- [19] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
ZHU GJ, WANG ZX. *Technical manual of industrial microbiology experiment*[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1994 (in Chinese).
- [20] SZERMER-OLEARNIK B, SOCHOCKA M, ZWOLIŃSKA K, CIEKOT J, CZARNY A, SZYDZIK J, KOWALSKI K, BORATYŃSKI J. Comparison of microbiological and physicochemical methods for enumeration of microorganisms[J]. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 2014, 68: 1392-1396.