

大肠杆菌 MetD 运输系统缺失对蛋氨酸积累的影响

李华^{1,2} 董伟^{1,2} 李由然^{1,2} 张梁^{1,2} 丁重阳^{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】构建 MetD 运输系统缺失突变株, 研究该运输系统功能缺失对 *Escherichia coli* W3110 蛋氨酸吸收和积累的影响。【方法】通过 RT-qPCR 比较 MetJ 阻遏调控解除菌株和野生株 *E. coli metNIQ* 表达量的变化, 并分析蛋氨酸吸收速度的变化; 利用 Red 同源重组系统分别敲除 *metNIQ* 基因簇、*metN*、*metI* 和 *metQ*, 构建 MetD 运输功能缺失的突变株, 研究蛋氨酸吸收速度的变化及对蛋氨酸积累的影响。【结果】MetJ 阻遏调控解除后, *metNIQ* 的表达量和蛋氨酸吸收速度显著增加。通过敲除 *E. coli* W3110 和 Me05 的 *metNIQ*, MetD 运输系统缺失导致蛋氨酸吸收速度下降。另外, 分别敲除用于产蛋氨酸基座菌株 Me06 的 *metNIQ* 基因簇、*metN*、*metI* 和 *metQ*。生长曲线和摇瓶发酵结果表明, *metI* 的敲除促进菌体的生长和蛋氨酸的合成, 蛋氨酸的产量从 0.39 g/L 提高到 0.45 g/L, 提高了 15.4%, 蛋氨酸产率从 0.14 g/g DCW 提高到 0.15 g/g DCW。【结论】*E. coli* MetD 功能的缺失能够降低蛋氨酸的吸收速度, 敲除 *metNIQ* 基因簇上的 *metI* 能够提高蛋氨酸产量。

关键词: 大肠杆菌, MetJ 阻遏蛋白, MetD 运输系统, L-蛋氨酸, 基因敲除

Effect of inactivating MetD transporter system of *Escherichia coli* W3110 on L-methionine production

LI Hua^{1,2} DONG Wei^{1,2} LI You-Ran^{1,2} ZHANG Liang^{1,2} DING Zhong-Yang^{1,2}
SHI Gui-Yang^{1,2*}

(1. National Engineering Laboratory of Food Fermentation Process and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of inactivating MetD transporter system of *Escherichia coli* W3110 on the production of L-methionine. [Methods] We compared the *metNIQ* genes' expression ratio of wild type *E. coli* W3110 and the deregulation of MetJ repression strains by Quantitative

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31401674); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA02120101); Jiangnan University Independent Key Project (No. JUSRP51503)

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

Received: August 24, 2016; Accepted: November 28, 2016; Published online (www.cnki.net): January 03, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31401674); 国家高技术研究发展计划项目 (863 计划) (No. 2012AA02120101); 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: 2016-08-24; 接受日期: 2016-11-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-03

real-time PCR (RT-qPCR). The methionine uptake capacity of *E. coli* W3110 and Me05 were analyzed. To construct the inactivation of MetD transporter system mutants, *metNIQ* genes cluster, *metN*, *metI*, and *metQ* were deleted by Red recombinase system respectively. We analyzed their effects on the uptake capacity and methionine production of these mutants. **[Results]** The *metNIQ* genes expression ratio and the uptake capacity of methionine were significantly increased by the deregulation of MetJ repression. By deleting the *metNIQ* genes cluster of *E. coli* W3110 and Me05, the MetD transport capacity were inactivated which resulted in the reduced uptake capacity of methionine. Besides, we deleted the *metNIQ* genes cluster, *metN*, *metI*, and *metQ* of methionine-producing chassis strain Me06. Growth curves and flask batch fermentation showed that, the growth and production of methionine were improved by the deletion of *metI*. The methionine production improved from 0.39 g/L to 0.45 g/L, increased by 15.4%. The methionine yield on biomass improved from 0.14 to 0.15 g/g DCW. **[Conclusion]** Inactivation of the function of MetD transport system in *E. coli* could lead to the decreased uptake capacity of methionine. Deletion of the *metI* can improve the methionine-producing capacity of recombination *E. coli* strain.

Keywords: *Escherichia coli* W3110, MetJ repressor, MetD transporter, L-methionine, Gene knockout

L-蛋氨酸(L-methionine, 分子量:149.21, CAS No. 63-68-3)是一种含硫必需氨基酸,除了参与蛋白质的合成,同时具有甲基供体和代谢中间物的作用,在体内能被用来合成类脂、精胺、腺苷甲硫氨酸等^[1]。人类和动物不具备合成蛋氨酸的功能,蛋氨酸缺乏时会引起一系列的疾病,如心血管病、老年痴呆、癌症等^[2],因此在人类饮食和动物饲料中必需含有充足的蛋氨酸。基于蛋氨酸的重要作用,它被广泛用于制药、食品、饲料添加剂等领域。截止到2013年,全球蛋氨酸的市场规模约为80万t(超过60万t被用于饲料行业)^[3]。目前,所有商品化蛋氨酸均是利用石化原料如甲硫醇、丙烯醛、氯化氰等通过化工合成,其底物、中间产物和废物均是剧毒物质,生产属于高风险、高污染和高耗能行业。越来越多的研究者开始关注利用可再生资源通过低成本、环境友好型的微生物发酵法生产蛋氨酸。由于蛋氨酸合成调控的复杂性,在过去几十年里,通过各种筛选和育种手段并没有得到适合于工业生产的菌株^[3]。随着大肠杆菌蛋氨酸合成调控机制的深入研究,通过代谢工程技术构建重组大肠杆菌蛋氨酸生产菌株受到越来越多国内外研究者的青睐^[4-6]。

改造氨基酸向胞内吸收的途径是提高氨基酸产量的有效手段之一^[7-9]。目前,尚未有关于改造大肠杆菌蛋氨酸吸收系统对其产量影响的报道。蛋氨酸的跨膜运输需要载体蛋白的协助,生物化学和动

力学研究表明,*E. coli*至少存在两个特异性的蛋氨酸转运蛋白:MetD和MetP转运系统,MetD(TC 3.A.1.24.1)对蛋氨酸具有高亲和力(K_T ,约0.1 $\mu\text{mol/L}$),是胞外的蛋氨酸向胞内运输的主要途径,MetP对蛋氨酸的亲和力较低(K_T ,约40 $\mu\text{mol/L}$),转运蛋氨酸的能力相对较弱,蛋氨酸被吸收到胞内后快速转化成细胞代谢物、精胺等^[10-11]。

MetD属于ABC转运蛋白超家族,*metD*操纵子(*metNIQ*)已经被克隆和表征,目前尚未发现*metP*在*E. coli*基因组上的定位位置。*metNIQ*操纵子由*metN*、*metI*和*metQ*三个基因组成(图1A),分别编码ABC蛋白的相应元件。其中,*metN*编码ATP结合蛋白(ATPase),*metI*编码蛋氨酸透过酶,*metQ*编码蛋氨酸结合蛋白,这3个基因任一个被敲除都会造成MetD转运功能的缺失^[12-13]。Zhang等的研究表明,MetD转运系统能够向胞内转运L-蛋氨酸和D-蛋氨酸及结构类似物如甲酰-L-蛋氨酸等^[14]。Kadaba等对MetD蛋白进行结晶,获得了3.7 Å分辨率水平的蛋白晶体结构图,他们提出MetD通过异构调节机制调控向胞内转运蛋氨酸的能力^[15]。*metNIQ*基因簇的表达受MetJ阻遏蛋白和蛋氨酸水平的调控。*metNIQ*启动子的-35和-10区之间有两个Met-box回文序列(图1B),MetJ通过与Met-box结合,负调控*metNIQ*的表达^[12]。*E. coli*转录组分析表明,*metJ*敲除突变株中*metNIQ*的表达量显著上调^[16]。

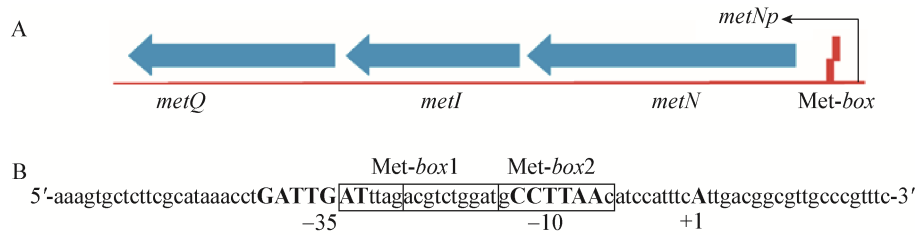


图 1 *metNIQ* 操纵子基因组成结构(A)和启动子调控序列结构(B)

Figure 1 The structure and composition of *metNIQ* operon (A) and the structure and regulation sequence of *metNIQ* promoter (B)

本研究通过基因敲除技术构建了 MetD 缺失突变株，比较了弱化蛋氨酸转运途径后对大肠杆菌蛋氨酸吸收速度的影响。另外，分别敲除蛋氨酸生产菌株 Me06 的 *metNIQ*、*metN*、*metI* 和 *metQ*，研究了 MetD 运输系统缺失对蛋氨酸合成的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

本研究中所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 引物

本研究中所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司负责合成，具体核酸序列信息见表 2。

1.3 主要试剂和仪器

卡那霉素、氯霉素、氨苄青霉素和 L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司； $2\times Taq$ PCR Master Mix、胶回收试剂盒、细菌总 RNA 提取试剂盒购自杭州宝赛生物公司；One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit 购自大连 TaKaRa 公司；蛋白胨、酵母粉、琼脂粉购自 OXOID 公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。

PCR 仪、Bio-Rad CFX Manager Real-Time PCR，美国 Bio-Rad 公司；Eppendorf 核酸测定仪、电转仪，德国 Eppendorf 公司；分光光度计，上海 UNICO 公

表 1 本研究中主要的菌株和质粒

Table 1 Main strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Description	Reference/Source
Strains		
<i>E. coli</i> W3110	F λ rph-1 INV (rrnD, rrnE)	CGSC
Me05	W3110 Δ lacl, Δ metJ, Δ thrC, Δ lysA	本实验室构建、保存
Me06	W3110 Δ lacl, Δ metJ, Δ thrC, Δ lysA, <i>metKp</i> ^{-150A→G} :: <i>metKp</i>	本实验室构建、保存
Me07	W3110 Δ metNIQ	本实验室构建、保存
Me08	W3110 Δ lacl, Δ metJ, Δ thrC, Δ lysA, Δ metNIQ	本实验室构建、保存
Me09	Me06, Δ metNIQ	本实验室构建、保存
Me10	Me06, Δ metN	本实验室构建、保存
Me11	Me06, Δ metI	本实验室构建、保存
Me12	Me06, Δ metQ	本实验室构建、保存
Plasmids		
pKD46	Ap ^R , λ Red recombinase expression plasmid, ara-inducible expression, temperature sensitive replication	[17]
pKD13	Cm ^R , Ap ^R , oriR plasmid containing an FRT-Km-FRT cassette	[17]
pCP20	Ap ^R , Cm ^R , repA (Ts), pSC101 based vector expressing the yeast Flp recombinase	[17]
pETMA ^{Fbr} -B-Y	Km ^R , pN25 启动子控制表达 <i>metA</i> ^{Fbr} , <i>metB</i> , <i>malY</i>	本实验室构建、保存

注：CGSC：美国 Coli Genetic Stock Center；Ap：氨苄霉素；Cm：氯霉素；Km：卡那霉素；R：抗性；Fbr：抗反馈抑制。

Note: CGSC: Coli Genetic Stock Center; Ap: Ampicillin; Cm: Chloramphenicol; Km: Kanamycin; R: Resistance; Fbr: Feedback inhibition resistance.

表 2 本实验所用引物
Table 2 Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5'→3')
In MetQFW	TTACCAGCCTTTAACAGCTCCGCCGTTAAACACTTTGTTTGCTGCTTCGTAAACTTCGGTAGGCTGGAGCTGC <u>TTCC</u>
In MetQRV	ATGGCGTTCAAATTCAAAACCTTTGCGGCAGTGGGAGCCCTGATCGGATCACTGGCACTCCGGGGATCCGTCG
In MetIFW	TTACTTGCAGTGACAGCCCGACGATGCGGTGCGCTGCGAACTGAATTAATAAACCGTAGGCTGGAGCTG <u>CTTCG</u>
In MetIRV	ATGTCTGAGCCGATGATGTGGCTGCTGGTTCGTGGCGTATGGGAAACGCT <u>GGCAATGATCCGGGGATCCGTCG</u>
In MetNFW	CAGTACCTCTACTTTTACATGGTGTTCCTGCAGCCAGGCAATGGCGGCTTGCATCTTGGTAGGCTGGAGCT <u>GCTTCG</u>
In MetNRV	ATGATAAACTTTTCAATATCACCAAAGTGTCCACCAGGGCACCCGCACCATCCAGGTCGGGGATCCGTCG
V MetQFW	GGTGCAGTGCTTTGAACGGGT
V MetQRV	ACCGTTTCTGCGATTGTGA
V MetIFW	TGGCACGGCAACCTGCGAAC
V MetIRV	TGCGTCTGGAGTTIACCGGT
V MetNFW	TAACGGAACAATCGCTGCC
V MetNRV	GTTACTACCACCAGCGCAAA
K1	AGGCTATTCGGCTATGACTG ^[18]
K2	GGACAGGTCGGTCTTGACAA ^[18]
Q MetNF	CACGCTGTCAGAATCCGAGT
Q MetNR	ATCATGCTTATCGCCAAGACCA
Q MetIF	TACCGTTTCTGCGATTGTGA
Q MetIR	CACCTTACGGACGATCTGC
Q MetQF	ACAAATATGGCCTGGACGTT
Q MetQR	CGACCAGTTTGTAGCCACGA
Pf_16S	CACACTGGAAGTGGACACG ^[19]
Pr_16S	TGCTTCTTCTGCGGGTAACG ^[19]

注 :In gene 表示含有同源臂 ,用于敲除基因的引物 ;下划线表示与 pKD13 结合的引物序列 ;V gene 表示用于验证的引物序列 ;Q gene 表示用于做实时定量 PCR (RT-qPCR)的引物序列。

Note: Primers of "In gene" contained homology extensions, used for gene knockout; Primers bond with pKD13 are underlined; "V gene" are used for verifying inactivation of target genes; The Qmet oligonucleotides are used for RT-qPCR.

司 ; HPLC Agilent 1260 , 美国 Agilent 公司 ; C₁₈ 反相柱 (ODS 5 μm , 250 mm×4.6 mm) , 爱尔兰 Waters 公司。

1.4 基因敲除方法

根据 Datsenko 等报道的 Red 重组系统敲除相关基因^[17]。(1) 突变盒制备 : 以 pKD13 为模板 , In metQFW/In metNRV、In metNFW/In metNRV、In metIFW/In metIRV 和 In metQFW/In metQRV 为引物 , 使用 2×Taq 聚合酶进行 PCR , 扩增用于基因敲除的突变盒。分别获得用于敲除 *metNIQ*、*metN*、*metI*、*metQ* 的突变盒片段 , 大小为 1.4 kb。PCR 条件 : 95 °C 5 min ; 94 °C 30 s , 55 °C 30 s , 72 °C 90 s , 30 个循环 ; 72 °C 5 min。PCR 反应体系 (20 μL) : 模

板 0.2 μL , 2×PCR Master Mix 10 μL , 25 μmol/L 引物各 0.2 μL , 灭菌 ddH₂O 9.4 μL。(2) 突变盒纯化和浓缩 : 取 500 μL PCR 产物经过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳纯化 , 胶回收试剂盒纯化片段 ; 纯化后片段加 2 倍体积的无水乙醇和 1/50 体积的 5 mol/L NaCl , 放置于 -70 °C 20 min ; 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min , 轻轻倾倒入上清 , 加 400 μL 预冷的 70% 乙醇 , 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min , 弃上清 ; 55 °C 烘干 , 加 50 μL ddH₂O 溶解 , 待用 , 使用核酸测定仪检测突变盒浓度为 700 mg/L。(3) 基因敲除 : 电转 pKD46 到待敲除基因的 *E. coli* 菌株 , SOB 固体平板上挑取含 pKD46 的菌株 , 30 °C、200 r/min 培养 4-5 h 至 OD₆₀₀ 为 0.5-0.6 ; 10% 预冷的甘油洗 3 遍 ,

离心收集菌体加 500 μL 10%甘油重悬；取 97 μL 感受态细胞和 3 μL 突变盒片段，1 800 V 电击转化；电转后加 1 mL SOB 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 h；卡那霉素抗性 SOB 平板筛选，挑转化子 PCR 验证。

(4) PCR 验证^[18]：以 *E. coli* W3110 为对照，metQFW/V metNRV、V metNFW/K1、K2/V metNRV 为引物，PCR 验证 *metNIQ* 基因簇的敲除；V metNFW/V metNRV、V metNFW/K1、K2/V metNRV 为引物，PCR 验证 *metN* 的敲除；V metIFW/V metIRV、V metIFW/K1、K2/V metIRV 为引物，PCR 验证 *metI* 的敲除；V metQFW/V metQRV、V metQFW/K1、K2/V metQRV 为引物，PCR 验证 *metQ* 的敲除。PCR 条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 反应体系(20 μL)，模板 0.2 μL 菌液，2 \times PCR Master Mix 10 μL ，25 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.2 μL ，灭菌 ddH₂O 9.4 μL 。(5) 消除卡那霉素抗性：电转 pCP20 质粒至整合了突变盒的 *E. coli* 菌株，氯霉素抗性 SOB 平板筛选^[17]，挑转化子 PCR 验证，提取基因组 DNA 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 荧光定量 PCR (RT-qPCR)

用于提取 RNA 的菌体在改进的 TPM1 培养基上培养至对数期后期， OD_{600} 约为 2.0–3.0。收集细胞，按照产品操作手册步骤，使用细菌总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。使用核酸测定仪，通过测量 260 nm 和 280 nm 吸光值检测提取的 RNA 纯度和质量。使用 RT-qPCR 试剂盒和 Bio-Rad CFX Manager Real-Time PCR 系统进行实时定量 PCR 和结果分析。用于 RT-qPCR 分析的引物见表 2。16S rRNA 基因作为内参基因校正 qPCR 的 C_T 值，根据 Nakashima 等报道的引物 Pf_16S 和 Pr_16S 扩增 16S rRNA 基因^[19]。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 模型分析基因的相对表达量^[20]。

1.6 培养基与培养条件

接种 pKD46、pCP20 的 *E. coli* 转化子到 SOB 培养基^[21]，30 $^{\circ}\text{C}$ 固体培养基或者 200 r/min 振荡培养。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，固体 SOB 培养基需加入 1.5% (质量体积比)的琼脂；用于 pKD46 转化子培养的液体 SOB 培养基需另加入 7.5 g/L 的 L-阿拉伯糖。平板挑出含有 pETMA^{Fbr}-B-Y 质粒的重组菌，接种到装液 50 mL SOB 培养基的 250 mL 三角瓶，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12–16 h，作为种子待用。500 mL 三角瓶进行分批发酵，装液 70 mL，培养基为改进的 TPM1 培养基^[8]，接种量 2% (体积比)，31 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 摇床培养 48 h。改进的 TPM1 培养基成分(g/L)：葡萄糖 20.0，酵母粉 4.0，MgSO₄·7H₂O 2.0，KH₂PO₄ 4.0，(NH₄)₂SO₄ 14.0，L-lysine 0.164，L-threonine 0.238，生物素 0.01，PLP 0.01，维生素 B12 0.01，微量元素母液 5 mL，CaCO₃ 10.0。微量元素母液成分(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 10 mL。4 mol/L NaOH 调整最终 pH 为 7.0。

用于分析蛋氨酸吸收速度的菌株在含有 0.5 g/L 的 SOB 培养基上培养 12 h，收集细胞，用预冷的 0.9% NaCl 洗 3 遍，接种到分析培养基，调整所有菌株初始接种量 OD_{600} 约为 2.0。分析培养基组成(g/L)：K₂HPO₄ 4.0，Na₂HPO₄ 2.0，(NH₄)₂SO₄ 0.75，(NH₄)₂HPO₄ 2，NH₄Cl 0.13，MgSO₄ 2.05，CaCl₂ 40.0，FeSO₄ 40.0，MnSO₄ 20.0，CoCl₂ 8.0，ZnSO₄ 4.0，(NH₄)₂Mo₂O₇ 2.8，CuCl₂ 2.0，蛋氨酸 0.5，H₃BO₃ 1 mg，pH 6.7。

根据需要，培养基中添加氨基苄霉素 100 mg/L，氯霉素 35 mg/L，卡那霉素 35 mg/L。

1.7 分析方法

发酵液中的菌体浓度以分光光度计测量 600 nm 处吸光值(OD_{600})表示。根据本实验室测定的经验公式换算菌体干重(DCW)：DCW= $OD_{600} \times 0.3809 - 0.0048$ ^[22]。分别精确吸取培养 48 h 的发酵培养基或 10 h 的分析培养基 1 mL，12 000 r/min 离心 2 min，精确吸取 200 μL 上清，加等体积的 10%三氯乙酸，混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 放 3 h，12 000 r/min 离心 20 min，测定上清中蛋氨酸的浓度。HPLC 柱前邻苯二醛(OPA)自动衍生法测

定蛋氨酸浓度。梯度洗脱衍生物, 通过 C_{18} 反相柱分离, 柱温箱设定温度 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 紫外检测器检测, 检测波长 338 nm 。梯度洗脱程序和流动相成分如表 3 所示。所构建的菌株都进行 3 次生物学重复实验, 通过 SPSS 软件分析改造后菌株与出发菌株比生长速率和蛋氨酸产量等显著性差异(t 检验, $\alpha=0.05$, 若 t 检验结果 $\alpha>0.05$, 差异不显著; 若 t 检验结果 $\alpha<0.05$, 差异显著)。

2 结果与分析

2.1 解除 MetJ 阻遏蛋白负调控对 MetD 运输系统的影响

MetJ 阻遏蛋白与 *E. coli* 蛋氨酸合成途径相关基因(*metA*、*metB*、*metF*、*metC*、*metE*、*metF*、*metK*、*metR* 和 *metNIQ*)操纵子区域的 Met-box 结合^[16], 因此, 降低或失活 MetJ 阻遏蛋白与 Met-box 结合能力是构建解除阻遏调控作用基因工程菌的必要条件之一。在阻断 *E. coli* 赖氨酸和苏氨酸合成途径后, 敲除 *metJ* 构建了重组菌 Me05, 以解除蛋氨酸合成途径的负调控。另外, 在 Me05 的基础上, 突变了 Me05 基因组上 *metK* 启动子-150A→G, 构建了弱化蛋氨酸腺苷转移酶活力的 Me06, 降低 *E. coli* 分解蛋氨酸的能力。为了解除蛋氨酸的反馈抑制和增强蛋氨酸合成的代谢流, 构建了过量表达 *metA^{Fbr}*、

metB、*malY* 的质粒 pETMA^{Fbr}-B-Y。Me06 (pETMA^{Fbr}-B-Y)作为发酵生产蛋氨酸的基座菌株, 在 500 mL 摇瓶 $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 发酵 48 h, 蛋氨酸产量为 0.39 g/L (数据另文发表)。

通过 RT-qPCR 分析了 Me05 和 Me06 相对于野生 *E. coli* W3110 的基因表达比率, 每个实验做 3 次重复, 结果如表 4 所示。与 *E. coli* W3110 相比, Me05 的 *metN*、*metQ* 和 *metI* 的表达量分别上调了 12.9、9.18 和 7.83 倍; Me06 的 *metN*、*metQ* 和 *metI* 的表达量分别上调了 5.38、10.19 和 7.62 倍。结果表明, 敲除 *metJ* 后, *metNIQ* 操纵子的阻遏调控解除, *metN*、*metI* 和 *metQ* 的表达水平显著上调。

另外, 测定了野生 *E. coli* W3110 和解除 MetJ 阻遏效应后重组菌 Me05 蛋氨酸的吸收速度。蛋氨酸被转运到活细胞体内后快速转化成细胞代谢物、精胺等, 根据这一原理, 用无生长的分析培养基中蛋氨酸的消耗量来间接表示蛋氨酸被吸收到胞内的速度。在无碳源分析培养基中添加 0.5 g/L 的蛋氨酸, 调整初始接种量 OD_{600} 为 2.0, 0 h 和 10 h 分别测定蛋氨酸含量, 每个实验做 3 次重复。测定 10 h 内的蛋氨酸的消耗速度[mg/(L·h)], 以每克细胞干重浓度的蛋氨酸的消耗速度间接表示蛋氨酸被运输到胞内的速度[mg/(L·h·g DCW)], 结果见表 5。10 h 时 *E. coli* W3110 消耗了 83.2 mg 的蛋氨酸, Me05 消耗 142.1 mg 的蛋氨酸, 蛋氨酸吸收速率分别为 10.88 和 18.67 mg/(L·h·g DCW)。与 *E. coli* W3110 相比, 解除 MetJ 阻遏调控的 Me05 蛋氨酸吸收速度提高了 1.71 倍。RT-qPCR 和蛋氨酸吸收速率结果表明, 随着 MetJ 阻遏调控的解除, *metNIQ* 表达量上调, MetD 向胞内运输蛋氨酸的速度显著提高。

表 3 HPLC 分析蛋氨酸梯度洗脱程序

Table 3 The program of gradient elution for analysis L-methionine by HPLC

时间 Time (min)	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)	流速 Flow rate (mL/min)
0.00	90.0	10.0	1.00
16.00	44.0	56.0	1.00
20.50	0.0	100.0	1.20
23.00	0.0	100.0	1.20
24.00	90.0	10.0	1.00
27.00	90.0	10.0	1.00

注: 流动相 A: 三乙胺 0.2 mL, 醋酸钠 5 g, 四氢呋喃 5 mL, ddH₂O 1 L, pH 7.2; 流动相 B: 醋酸钠 5 g, ddH₂O 200 mL, 甲醇 400 mL, 乙腈 400 mL, pH 7.2.

Note: Eluent A: Triethylamine 0.2 mL, Sodium acetate anhydrous 5 g, Tetrahydrofuran 5 mL, Double distilled water 1 L, pH 7.2; Eluent B: Sodium acetate anhydrous 5 g, Double distilled water 200 mL, Methyl alcohol 400 mL, Acetonitrile 400 mL, pH 7.2.

表 4 解除 MetJ 负调控 *metN*、*metQ* 和 *metI* 表达比率
Table 4 Expression ratios of *metN*, *metQ*, *metI* relevant to deregulation of MetJ repression

Genes	Me05/W3110	Me06/W3110
<i>metN</i>	12.90±0.264	5.38±0.092
<i>metQ</i>	9.18±0.141	10.19±0.854
<i>metI</i>	7.83±0.136	7.62±0.052

注: 图中数据是 3 个平行实验的平均值, ±代表 3 次实验结果的 s 。
Note: All±indicate s , $n=3$.

表 5 L-蛋氨酸吸收速率分析
Table 5 L-methionine uptake assay of MetD modified transport system strains

菌株 Strains	OD_{600}	L-蛋氨酸消耗速率	L-蛋氨酸消耗速率
		L-methionine uptake rate mg/(L·h)	/DCW L-methionine uptake rate/DCW (mg/(L·h·g DCW))
<i>E. coli</i> W3110	2.02±0.06	8.32±0.16	10.88±0.20
Me05	2.01±0.08	14.21±0.26	18.67±0.34
Me07	2.01±0.04	7.14±0.21	9.38±0.28
Me08	2.04±0.03	7.36±0.18	9.57±0.23

注:表中每个数据是3个平行实验的平均值,±表示3次实验结果的s.

Note: All±indicate s, n=3.

2.2 MetD 运输系统缺失菌株的构建

为了研究失活 MetD 功能对蛋氨酸吸收和产蛋氨酸的影响,构建了不同类型的 MetD 运输系统缺失型重组菌 Me08、Me09、Me10、Me11 和 Me12,其基因型见表 1,谱系图见图 2。

metNIQ 突变盒片段电转 *E. coli* W3110(pKD46)、Me05(pKD46)和 Me06(pKD46)感受态细胞,转化子经菌落 PCR 验证,分别得到 2.18、1.09 和 0.99 kb 的片段,对照 *E. coli* W3110 菌落 PCR 得到 3.09 kb 的核酸片段,如图 3A 所示,该结果表明 Frp-Km-Frp 突变盒整合到了目的基因靶定位置。消除抗性基因后进行菌落 PCR 验证,产物大小为 0.75 kb,说明 *metNIQ* 已经被敲除。测序结果也证明 *metNIQ* 被敲

除,构建了重组菌 Me07、Me08 和 Me09。

metN 突变盒片段电转 Me06(pKD46)感受态细胞,转化子经菌落 PCR 验证,分别得到 2.05、1.17 和 0.99 kb 的片段,对照 *E. coli* W3110 菌落 PCR 得到 1.56 kb 的核酸片段,如图 3B 所示,该结果表明 Frp-Km-Frp 突变盒整合到了目的基因靶定位置。消除抗性基因菌落进行 PCR 验证,产物大小为 0.85 kb,该结果说明 *metN* 已经被敲除。测序结果也证明 *metN* 被敲除,构建了重组菌 Me10。

metI 突变盒片段电转 Me06(pKD46)感受态细胞,转化子经菌落 PCR 验证,分别得到 2.08、1.42 和 0.74 kb 的片段,对照 *E. coli* W3110 菌落 PCR 得到 1.32 kb 的核酸片段,如图 3C 所示,该结果表明 Frp-Km-Frp 突变盒整合到了目的基因靶定位置。消除抗性基因后 V *metIFW*/V *metIRV* 为引物进行菌落 PCR 验证,产物大小为 0.88 kb,该结果说明 *metI* 已经被敲除。测序结果也证明 *metI* 被敲除,构建了重组菌 Me11。

metQ 突变盒片段电转 Me06(pKD46)感受态细胞,转化子经菌落 PCR 验证,分别得到 2.15、1.09 和 1.17 kb 的片段,对照 *E. coli* W3110 菌落 PCR 得到 1.65 kb 的核酸片段,如图 3D 所示,该结果表明 Frp-Km-Frp 突变盒整合到了目的基因靶定位置。电

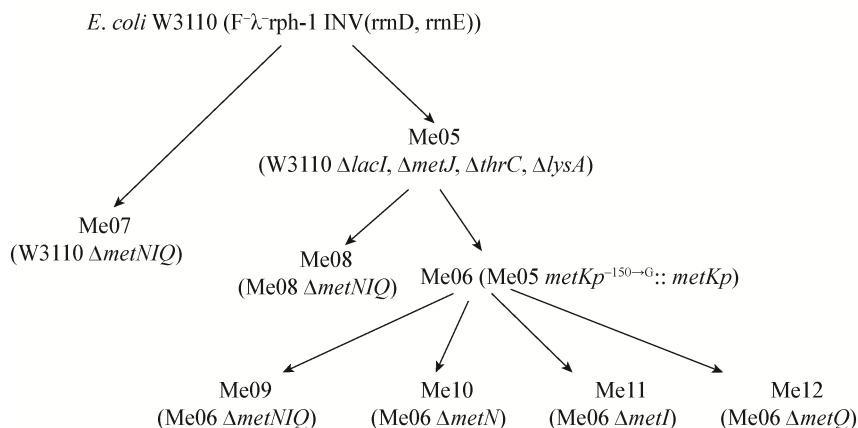


图 2 *E. coli* W3110 和 MetD 系统缺失菌株谱系图

Figure 2 Pedigree chart of *E. coli* W3110 and inactivating MetD transporter mutants

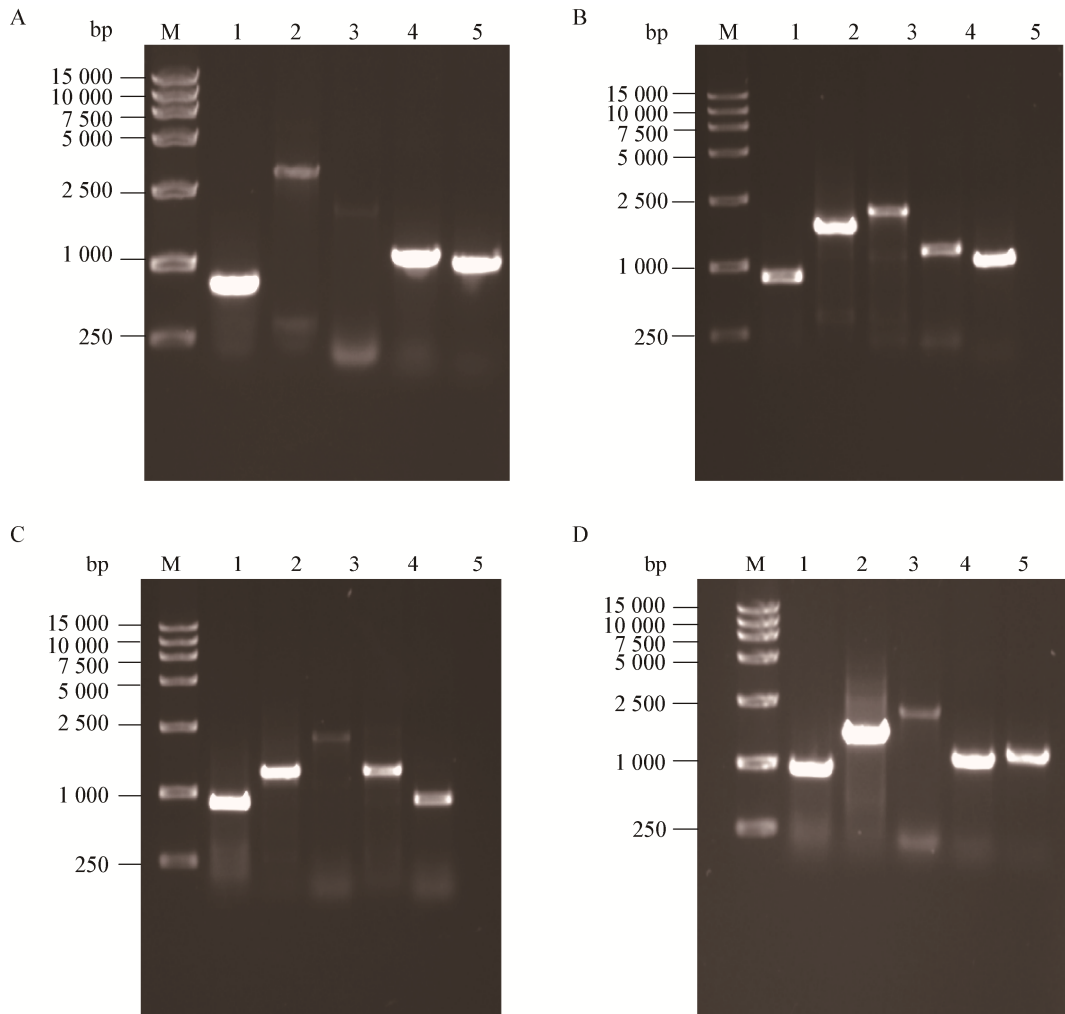


图3 *metNIQ* (A)、*metN* (B)、*metI* (C)和*metQ* (D)突变转化子的PCR鉴定电泳图谱

Figure 3 PCR identification of *metNIQ* (A), *metN* (B), *metI* (C), *metQ* (D) gene mutants

注: M: DL1.5 kb marker; 1: 敲除 *metNIQ*、*metN*、*metI*、*metQ* 后 PCR 验证; 2: *E. coli* W3110 对照; 3: 整合 Frp-Km-Frp 敲除盒 PCR 验证; 4、5: V gene FW+K1、V gene RV+K2 引物 PCR 验证。

Note: M: DL1.5 kb marker; 1: Verification of *metNIQ*, *metN*, *metI*, *metQ* by PCR after genes knockout; 2: *E. coli* W3110 were used for control; 3: Verification of Frp-Km-Frp mutation cassette by PCR after integration; 4, 5: PCR verification by V gene FW+K1 and V gene RV+K2 primers.

转 pCP20 质粒, 消除抗性基因后 V *metQ*FW/V *metQ*RV 为引物进行菌落 PCR 验证, 产物大小为 0.95 kb, 该结果说明 *metQ* 已经被敲除。测序结果也证明 *metQ* 被敲除, 构建了重组菌 Me12。

2.3 MetD 运输系统缺失对蛋氨酸吸收效率的影响

敲除 *E. coli* W3110 和 Me05 的 *metNIQ* 基因簇后, 分析了重组菌 Me07(*E. coli* W3110 Δ *metNIQ*)和

Me08(Me05 Δ *metNIQ*)的蛋氨酸吸收速率, 结果如表 5 所示。10 h 时 Me07 消耗 71.4 mg 蛋氨酸, 蛋氨酸吸收速率为 9.38 mg/(L·h·g DCW), 与 *E. coli* W3110 相比蛋氨酸吸收速度减慢。这一结果表明 MetD 蛋氨酸运输系统的缺失能够降低蛋氨酸被吸收到胞内的速度; 另外, MetD 系统的缺失并不能完全阻断蛋氨酸向胞内运输的途径, 除 MetD 以外, *E. coli*

中至少还存在一个蛋氨酸向胞内运输途径,这与 Kadner 等报道^[10-11]的结果相一致。10 h 时 Me08 消耗 73.6 mg 蛋氨酸,蛋氨酸吸收速率为 9.57 mg/(L·h)。与 *E. coli* W3110 和 Me05 相比,蛋氨酸吸收速率均有下降,尤其是与 Me05 相比,蛋氨酸向胞内运输速度显著下降,减慢了 1.95 倍。这一结果表明,通过敲除 *metNIQ* 能够消除由于 MetJ 阻遏调控解除而造成的蛋氨酸吸收速度的增加。弱化蛋氨酸向胞内运输的能力将有助于改善蛋氨酸过量生产菌株的内环境,减少蛋氨酸参与无效循环,利于蛋氨酸的积累。

2.4 MetD 运输系统缺失对蛋氨酸产量的影响

我们实验室前期构建了一株用来产蛋氨酸的基座菌株 Me06,为了考察 MetD 运输系统的缺失对菌体生长和产蛋氨酸的影响,分别敲除 Me06 突变株的 *metNIQ*、*metN*、*metI* 和 *metQ*,构建了失活 MetD 功能的 Me09、Me10、Me11 和 Me12。接种重组菌到 TPM1 培养基,每隔 2 h 取样,直至菌体生长进入稳定期,每个实验重复 3 次,测定其生长曲线,结果如图 4 所示。从图 4 可以看出,培养 14 h 后,所有重组菌的生长进入稳定期。出发菌株 Me06 最大比生长速率为 0.37 g/(L·h),最大生物量为 2.88 g/L。SPSS 分析结果表明,与 Me06 相比,Me09、Me10、Me11、Me12 生物量和比生长速率的 *t* 检验结果的 α 值均小于 0.05,结果说明改造后菌株生长与 Me06 生长状况差异显著。敲除 *metNIQ* 基因簇和 *metQ* 的 Me09、Me12 最大比生长速率分别下降为 0.33 和 0.32 g/(L·h),最大生物量分别为 2.54 和 2.66 g/L,低于 Me06;分别敲除 *metN* 和 *metI* 的 Me10、Me11 最大比生长速率提高到 0.38 和 0.39 g/(L·h),最大生物量为 3.15 和 3.03 g/L,高于 Me06。结果表明,*metNIQ* 基因簇和 *metQ* 的敲除对 Me06 的生长有抑制作用,而 *metN* 和 *metI* 的敲除能促进 Me06 菌体的生长。

本实验室前期构建了 pETMA^{Fbr}-B-Y 质粒,用于表达解除了反馈抑制的高丝氨酸转琥珀酰基酶,增强蛋氨酸代谢流的 γ -胱硫醚聚合酶和 β -胱硫醚

酶。Me06、Me09、Me10、Me11、Me12 菌株虽然经过一系列的改造,如阻断苏氨酸或赖氨酸碳代谢流竞争途径,解除 MetJ 阻遏调控,弱化蛋氨酸分解途径等,但是并没有解除蛋氨酸反馈抑制负调节,这几株菌胞外蛋氨酸积累量低于 OPA 衍生法的检测限。因此,电转 pETMA^{Fbr}-B-Y 质粒到 Me06、Me09、Me10、Me11 和 Me12,构建产蛋氨酸的重组菌 Me06(pETMA^{Fbr}-B-Y)、Me09(pETMA^{Fbr}-B-Y)、Me10(pETMA^{Fbr}-B-Y)、Me11(pETMA^{Fbr}-B-Y) 和 Me12(pETMA^{Fbr}-B-Y),接种到 TPM1 培养基,在 500 mL 摇瓶培养 48 h,结果如表 6 所示。

SPSS 分析结果表明,与 Me06 相比,Me09、Me10、Me11 蛋氨酸产量和产率 α 值均小于 0.05,结果说明改造后菌株与出发菌株 Me06 蛋氨酸产量和产率差异显著。与 Me06 相比较,Me12 的 $\alpha > 0.05$,差异不显著。*metNIQ* 基因簇和 *metN* 敲除的重组菌蛋氨酸产量和产率显著下降;而敲除 *metQ* 的 Me12 (pETMA^{Fbr}-B-Y)蛋氨酸产量和产率基本不变;只有敲除 *metI* 基因的重组菌 Me11(pETMA^{Fbr}-B-Y)蛋氨酸从 0.39 g/L 提高到 0.45 g/L,产量提高了 15.4%,蛋氨酸产率从 0.14 g/g DCW 提高到 0.15 g/g DCW。

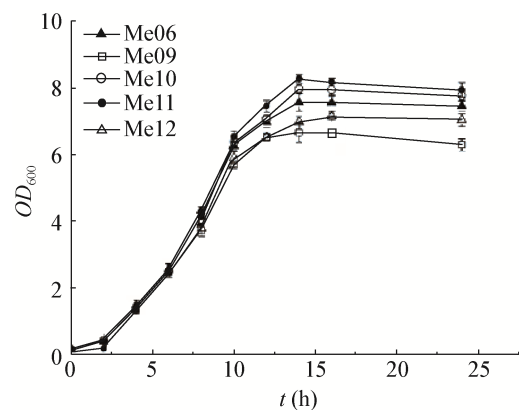


图 4 重组大肠杆菌 Me06、Me09、Me10、Me11 和 Me12 在摇瓶中的生长情况

Figure 4 The growth curve of recombinant strains *E. coli* Me06, Me09, Me10, Me11 and Me12 mutants

注:图中数据是 3 个平行实验的平均值,误差限代表 3 次实验结果的 *s*。

Note: All error bars indicate $\pm s$, $n=3$.

表 6 重组菌 500 mL 摇瓶发酵蛋氨酸结果

Table 6 The methionine production of recombinant strains in 500 mL shake-flask experiments

菌株 Strains	OD_{600}	蛋氨酸产量 Methionine production (g/L)	蛋氨酸产量/g DCW Methionine production/g DCW (g/g DCW)
Me06(pETMA ^{Fbr} -B-Y)	7.33±0.18	0.390±0.01	0.14±0.001
Me09(pETMA ^{Fbr} -B-Y)	6.56±0.08	0.120±0.02	0.05±0.002
Me10(pETMA ^{Fbr} -B-Y)	7.14±0.14	0.079±0.07	0.03±0.002
Me11(pETMA ^{Fbr} -B-Y)	7.64±0.10	0.450±0.01	0.15±0.004
Me12(pETMA ^{Fbr} -B-Y)	7.12±0.11	0.380±0.04	0.14±0.001

注: 蛋氨酸产率为每克菌体干重蛋氨酸的量(g/g DCW), 表中每个数据是 3 个平行实验的平均值, ±表示 3 次实验结果的 *s*.

Note: Methionine yield on dry cell weight (g/g DCW). All ± indicate *s*, *n*=3.

3 结论与讨论

我们发现随着 *E. coli* W3110 MetJ 阻遏调控的解除, *metNIQ* 基因的表达量和蛋氨酸吸收速度显著增加。通过敲除 *metNIQ*, MetD 运输系统缺失导致 *E. coli* W3110 和 Me05 蛋氨酸吸收速度显著下降。另外, 我们分别敲除用于产蛋氨酸基座菌株 Me06 的 *metNIQ* 基因簇及 *metN*、*metI* 和 *metQ*, 生长曲线和摇瓶发酵结果表明, *metI* 的敲除促进菌体的生长和蛋氨酸的合成, 蛋氨酸的产量提高了 15.4%, 蛋氨酸产量和产率分别从 0.39 g/L 和 0.14 g/g DCW 提高到 0.45 g/L 和 0.15 g/g DCW。

研究表明, 弱化色氨酸、苏氨酸等生产菌株向胞内运输的途径是提高目的氨基酸产量的有效策略之一。Lee 等发现, 敲除 *E. coli* 负责编码苏氨酸运输蛋白的 *tdcC* 后, 苏氨酸的产量提高了 15.6%^[8]。Okamoto 等通过多轮诱变, 得到一株完全阻断苏氨酸向胞内运输的突变株, 抑制胞外的苏氨酸被再吸收到胞内, 使胞内的苏氨酸浓度稳定地保持在较低浓度, 因此其合成途径不受反馈抑制的调控, 苏氨酸产量达到 100 g/L^[23]。Liu 等敲除 *E. coli* 的 *aroP*, 以弱化色氨酸向胞内的运输, 与出发菌株相比, 色氨酸的产量提高了 12.6%^[24]。理论上, 敲除 *E. coli* *metNIQ* 基因簇或者分别敲除 *metN*、*metI* 和 *metQ* 均造成 MetD 功能的缺失^[12-13], 弱化蛋氨酸向胞内吸收的能力, 进而起到增强蛋氨酸产量的作用。但我们的研究表明, 只有敲除 *metI* 的重组菌促使

蛋氨酸的产量提高了 15.4% *metNIQ* 基因簇和 *metN* 敲除的重组菌蛋氨酸产量和产率显著下降, 而敲除 *metQ* 的蛋氨酸产量和产率基本不变。我们推测, *metNIQ*、*metN*、*metQ* 的敲除, 不仅影响到 MetD 的功能, 还会引起复杂的基因交互作用, 从而造成蛋氨酸生产能力的差异。我们在研究苏氨酸吸收系统 TdcC、SstT 和 LIV-1 缺失对苏氨酸积累的影响时也发现, 敲除 *tdcC* 和 *sstT* 的重组菌其苏氨酸产量比出发菌高出 172.5%; 但是同时敲除 *tdcC*、*sstT* 和 *livJ* 的重组菌其虽然苏氨酸吸收能力也降低, 但是苏氨酸产量反而降低了 42.2%^[25]。这一结果表明虽然弱化蛋氨酸向胞内运输的能力是代谢改造 *E. coli* 以提高蛋氨酸产量的有效手段之一, 但是在改造蛋氨酸吸收系统时需要选择合适的策略, 避免基因的交互作用对蛋氨酸合成途径相关基因表达的影响。

与过量表达蛋氨酸合成途径上的关键酶不同, 修饰向胞内的运输系统并不能直接提高蛋氨酸合成代谢流, 但是弱化其吸收途径可以降低胞外蛋氨酸再次被吸收到胞内的速度, 进而起到降低胞内蛋氨酸浓度的作用, 改善胞内环境, 减少进入无效循环(Futile cycle)和对细胞的毒害作用, 进而提高菌体的鲁棒性(Robustness)和产蛋氨酸的能力。目前, 仅有编码 MetD 基因的定位被报道, *E. coli* 其他向胞内运输的途径并不清楚。随着 *E. coli* 转运蛋白编码基因功能的深入解析, 敲除转运蛋白基因, 进而完全阻断蛋氨酸运输途径将成为代谢改造 *E. coli* 高产

蛋氨酸的必需策略之一。

参 考 文 献

- [1] Mitsuhashi S. Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 38-44
- [2] Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. Sulfur containing amino acids and human disease[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004, 58(1): 47-55
- [3] Willke T. Methionine production—a critical review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24): 9893-9914
- [4] Krömer JO, Wittmann C, Schröder H, et al. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(4): 353-369
- [5] Guo Q, Fang F, Li JH, et al. Metabolic engineering of methionine biosynthesis pathway for production of L-methionine by *Escherichia coli*[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2013, 13(6): 1013-1019 (in Chinese)
郭谦, 方芳, 李江华, 等. 代谢工程改造蛋氨酸代谢途径构建高产 L-蛋氨酸大肠杆菌[J]. *过程工程学报*, 2013, 13(6): 1013-1019
- [6] Qu GS, Guo Q, Fang F, et al. Production of methionine by overexpression of methionine synthesis genes in *Escherichia coli*[J]. *Industrial Microbiology*, 2013, 43(5): 21-26 (in Chinese)
屈更思, 郭谦, 方芳, 等. 过量表达蛋氨酸合成途径基因对重组大肠杆菌产蛋氨酸的影响[J]. *工业微生物*, 2013, 43(5): 21-26
- [7] Gu PF, Yang F, Li FF, et al. Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving L-tryptophan production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(15): 6677-6683
- [8] Lee KH, Park JH, Kim TY, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. *Molecular Systems Biology*, 2007, 3(1): 149
- [9] 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
- [10] Kadner RJ. Transport systems for L-methionine in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 117(1): 232-241
- [11] Kadner RJ, Watson WJ. Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two uptake systems[J]. *Journal of Bacteriology*, 1974, 119(2): 401-409
- [12] Gál J, Szvetnik A, Schnell R, et al. The *metD* D-methionine transporter locus of *Escherichia coli* is an ABC transporter gene cluster[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(17): 4930-4932
- [13] Merlin C, Gardiner G, Durand S, et al. The *Escherichia coli metD* locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ)[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(19): 5513-5517
- [14] Zhang ZG, Feige JN, Chang AB, et al. A transporter of *Escherichia coli* specific for L- and D-methionine is the prototype for a new family within the ABC superfamily[J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(2): 88-100
- [15] Kadaba NS, Kaiser JT, Johnson E, et al. The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation[J]. *Science*, 2008, 321(5886): 250-253
- [16] Marincs F, Manfield IW, Stead JA, et al. Transcript analysis reveals an extended regulon and the importance of protein-protein co-operativity for the *Escherichia coli* methionine repressor[J]. *Biochemical Journal*, 2006, 396(2): 227-234
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [18] Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, et al. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes[J]. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7(1): 31
- [19] Nakashima N, Tamura T. Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(15): e103
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [21] Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 4th Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [22] Liu SP, Liu RX, Xiao MR, et al. A systems level engineered *E. coli* capable of efficiently producing L-phenylalanine[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(5): 751-757
- [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
- [24] Liu Q, Cheng YS, Xie XX, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 549-554
- [25] Yang DM, Li H, Li YR, et al. Effects of TdcC, SstT and LIV-1 systems deletion of *Escherichia coli* on extracellular L-threonine accumulation[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 20-29 (in Chinese)
杨冬美, 李华, 李由然, 等. 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[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 20-29