

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150159

## 敲除 *iclR* 基因对大肠杆菌发酵 *L*-色氨酸的影响

陈胜杰, 刘 辉, 谢希贤, 徐庆阳, 陈 宁

(代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室,  
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为了研究敲除 *iclR* 基因对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 发酵 *L*-色氨酸的影响, 以 *L*-色氨酸工程菌大肠杆菌 TRTH 为出发菌株, 利用 Red 重组技术构建了 *iclR* 基因 (编码乙醛酸操纵子阻遏蛋白) 缺失菌株 TRTH $\Delta$ *iclR*。摇瓶发酵实验结果显示: TRTH $\Delta$ *iclR* 的 *L*-色氨酸产量和糖酸转化率分别达到  $(6.52 \pm 0.46)$  g/L 和 13.17%, 比原菌的分别提高了 21.86% 和 22.85%; 乙酸积累量为 6.82 g/L, 比原菌的降低了 37.63%。30 L 发酵罐发酵实验结果显示: TRTH $\Delta$ *iclR* 的 *L*-色氨酸产量及糖酸转化率分别达到  $(13.01 \pm 1.05)$  g/L 和 6.51%, 比原菌的下降了 60.34% 和 68.27%; 乙酸积累量为 18.21 g/L, 比原菌的增加了 33.42%。结果表明: 在摇瓶条件下, 重组菌株生物量较出发菌株高, 代谢流分配适合 *L*-色氨酸积累; 但在发酵罐条件下, 乙醛酸循环的增强导致重组菌株供能不足和乙酸的过多积累, 最终使得生物量不足以及 *L*-色氨酸产量下降。

**关键词:** *L*-色氨酸; 大肠杆菌; 乙醛酸循环; *iclR*; 发酵

中图分类号: Q816 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2016)03-0025-06

## Effects of Knockout of Gene *iclR* on *L*-tryptophan Fermentation in *Escherichia coli*

CHEN Shengjie, LIU Hui, XIE Xixian, XU Qingyang, CHEN Ning

(National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology,  
Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, College of Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** *Escherichia coli* TRTH  $\Delta$ *iclR* was constructed via knockout of *iclR*, the key gene of the glyoxylate shunt in *E. coli* TRTH through Red recombination to study the effects of *iclR* knockout on *E. coli* TRTH *L*-tryptophan accumulation. The results of shake flask fermentation indicated that the yield of *L*-tryptophan and the titer of *L*-tryptophan from glucose of *E. coli* TRTH  $\Delta$ *iclR* reached  $(6.52 \pm 0.46)$  g/L and 13.17%, which were 21.86% and 22.85% higher than those obtained from *E. coli* TRTH, respectively; 6.82 g/L of acetic acid accumulated in the culture of *E. coli* TRTH  $\Delta$ *iclR*, which was 37.63% lower than that of the control strain. In the fermentation of 30 L fermenter, the titer and yield of *L*-tryptophan of *E. coli* TRTH  $\Delta$ *iclR* were  $(13.01 \pm 1.05)$  g/L and 6.51%, which were 60.34% and 68.27% lower than those of the control, respectively; 18.21 g/L acetic acid, 33.42% times higher than that of the control, accumulated in the broth. In conclusion, in shake flask fermentation assays, the metabolic flux of the recombined strain was beneficial for *L*-tryptophan accumulation although the biomass was lower than *E. coli* TRTH. On the contrary, enhancement of glyoxylate shunt resulted in the shortage of energy supply and higher acetic acid accumulation, which can lead to lower biomass and *L*-tryptophan titer in 30 L fermentation.

**Key words:** *L*-tryptophan; *Escherichia coli*; glyoxylate shunt; *iclR*; fermentation

*L*-色氨酸 (*L*-tryptophan, *L*-trp) 是人和动物的必需氨基酸之一<sup>[1-2]</sup>。目前, 发酵法工业生产 *L*-色氨酸

收稿日期: 2015-10-14; 修回日期: 2015-12-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2012AA022102, 2012AA02A703); 天津市科技支撑计划重点资助项目 (14ZCZDSY00015)

作者简介: 陈胜杰 (1991—), 男, 河南新乡人, 硕士研究生; 通信作者: 陈 宁, 教授, ningch@tust.edu.cn.

存在的主要问题是 L-色氨酸转化率偏低(低于 23%),其主要原因是较多的碳源在 TCA 循环中消耗. 以往的菌株改造主要集中在修饰与合成 L-色氨酸直接相关的途径(如莽草酸途径)或过表达关键基因(如 *tktA*、*ppsA*、*aroG* 等<sup>[3]</sup>),但鲜有改变 TCA 循环等中心代谢途径和 L-色氨酸积累的研究报道. Rezaei 等<sup>[4]</sup>在酵母菌株 S288C 中同时敲除 TCA 循环的关键酶基因 *aco1* (编码顺乌头酸酶)和基因 *icl1* (编码异柠檬酸裂合酶),重组菌的产琥珀酸的能力明显下降. 借鉴此思路,若对 TCA 循环的支路代谢(乙醛酸循环)作适当修饰,可能会增加草酰乙酸的合成,通过丙酮酸更多地转化成合成 L-色氨酸的重要前体物——磷酸烯醇式丙酮酸;另外也可能会降低 TCA 中间代谢物的生成,减少因生成能量而消耗的碳源. 作为乙醛酸循环的抑制子 IclR,能和编码乙醛酸循环关键酶(异柠檬酸裂合酶、苹果酸合成酶和异柠檬酸脱氢酶/磷酸化酶)的 *aceBAK* 操纵子结合<sup>[5-6]</sup>,关闭乙醛酸循环. 抑制子 IclR 的缺失会导致乙醛酸循环关键酶的组成型表达,强化乙醛酸循环,有利于减少 TCA 循环的 CO<sub>2</sub> 损失,可能是一种更经济的代谢方式<sup>[7]</sup>. Lee 等<sup>[8]</sup>发现大肠杆菌(*E. coli*) *iclR* 敲除菌株的苏氨酸产量显著提高. 本文基于此,改变乙醛酸循环代谢流分布,构建 *iclR* 缺失的工程菌 TRTH  $\Delta iclR$ ,研究了 *iclR* 缺失对 L-色氨酸积累的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

所用菌株和质粒均为本实验室保存,见表 1.

表 1 菌株和质粒

Tab. 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒	相关特性
<i>E. coli</i> DH 5 $\alpha$	高效、稳定的感受态细胞
<i>E. coli</i> TRTH	<i>trpEDCBA</i> + <i>Tet<sup>r</sup></i> , $\Delta$ <i>tnaA</i>
<i>E. coli</i> TRTH $\Delta iclR$	<i>trpEDCBA</i> + <i>Tet<sup>r</sup></i> , $\Delta$ <i>tnaA</i> , $\Delta iclR$
pKD3	Cm <sup>r</sup>
pKD46	Ap <sup>r</sup> , $\lambda$ Red-表达载体
pCP20	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , FLP-表达载体

### 1.2 培养基

LB 培养基:用于大肠杆菌的培养. 根据需要添加抗生素,氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL,氯霉素 25  $\mu$ g/mL.

用于大肠杆菌发酵培养的种子培养基(g/L):葡萄糖 40,酵母粉 1,柠檬酸钠 1.6,硫酸铵 1.2,磷酸氢二钾 5.6,硫酸镁 1.6,维生素 B<sub>1</sub> 0.001 3,硫酸亚铁

0.002 8,硫酸锰 0.001 2,生物素 0.000 3,微量元素混合液 0.004.

发酵培养基(g/L):葡萄糖 7.5,硫酸铵 1.6,酵母粉 1,柠檬酸钠 2,磷酸氢二钾 7.5,硫酸镁 2,微量元素混合液 0.001.

### 1.3 试剂

引物合成由金唯智生物科技公司完成. PCR 所用试剂以及限制酶、T4 DNA 连接酶均购于 TaKaRa 公司. 其他化学试剂均为分析纯.

### 1.4 产 L-色氨酸大肠杆菌 TRTH $\Delta iclR$ 的构建

质粒和基因组提取、DNA 片段回收、大肠杆菌的电转化等常规技术的操作参照文献<sup>[9]</sup>进行. 根据大肠杆菌的转录抑制子基因 *iclR* 的序列设计引物. 分别扩增 *iclR* 上游同源臂、下游同源臂和 Cm<sup>r</sup> 抗性基因盒,对应的扩增上、下游引物分别为 *iclR*-1 : 5'-TTGCGTAACCTTTTCCCTGG-3', *iclR*-2 : 5'-CTCCAGCCTACAAATCGCTCAAGCTAACATCTCTTCA GATTCGGTT-3', *iclR*-3 : 5'-GCTAATTCCCATGTCAGCCGTTATACCGAGCGGCACTACTAACAC-3', *iclR*-4 : 5'-CAGCAGAGTAGAACCCAGGATTAC-3', pKD 3-up : 5'-TTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAG-3', pKD 3-down : 5'-TAACGGCTGACATGGGAATTAGC-3'(其中标注下划线的引物为用于同源重组的具有同源碱基的引物). 再采用重叠 PCR,以 *iclR*-1 和 *iclR*-4 扩增连接 3 个片段,得到片段 $\Delta iclR$ . 其中 PCR 条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸,时间依各片段大小设定,1 kbp 对应 1 min,循环 25 次. 22  $^{\circ}$ C 保温,PCR 体系为 EX-Taq (10 U/mL) 0.25  $\mu$ L, dNTP mixture (10 mmol/L) 4  $\mu$ L, PCR buffer (10  $\times$ ) 5  $\mu$ L, 上、下游引物 1  $\mu$ L, 模板 10 ~ 100 ng, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 50  $\mu$ L. 将片段 $\Delta iclR$  电转化入感受态细胞,击穿电压为 1 800 V,时间为 5.8 s. 利用 Red 同源重组技术<sup>[9]</sup>,用 Cm<sup>r</sup> 抗性基因盒替换 *iclR* 基因. 基因替换成功的阳性克隆子通过转化入 pCP20 质粒,消除染色体上 Cm<sup>r</sup> 抗性基因.

### 1.5 发酵实验

摇瓶发酵:将保存菌株接种到四环素抗性斜面活化,37  $^{\circ}$ C 培养 12 h,活化两代后接种于含 30 mL 的种子培养基的 500 mL 挡板摇瓶中,培养至 A<sub>600</sub> 为 4 ~ 6 时,以 10% 接种量接种于含 30 mL 发酵培养基的 500 mL 挡板摇瓶中. 用 2% 的苯酚红溶液作为 pH 指示剂,并用氨水调节并维持 pH 在 6.7 ~ 7.0. 发酵周期为 32 h,期间补加质量分数为 60% 的葡萄糖溶液.

30 L 发酵罐发酵:用接种环刮取斜面菌苔接种至含 3 L 种子培养基的 5 L 发酵罐中,培养至  $A_{600}$  为 14~16 时,以 13% 接种量接种于含 16 L 发酵培养基的 30 L 发酵罐中. 发酵周期为 36 h,通过溶氧反馈控制葡萄糖质量浓度小于 1 g/L,流加氨水调节并维持 pH 在 6.7~7.0,溶氧控制在 30%~40%,流加质量分数为 80% 的葡萄糖溶液进行分批补料发酵.

## 1.6 检测方法

菌体生物量检测:菌体生物量以菌体干质量表示.取 10 mL 发酵液,13 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,菌体用去离子水洗涤 3 次后置于 55 °C 恒温干燥箱中干燥至质量恒定.将发酵液稀释不同倍数,使其在 600 nm 波长下的吸光度为 0.2~0.8,绘制吸光度( $x$ )与干质量( $y$ )曲线并测定菌体生物量, $y = 0.39x + 0.01$ , $R^2 = 0.991$ .

发酵液中葡萄糖浓度和谷氨酸浓度均采用 SBA-40C 型生物传感仪(山东科学院生物研究所)测定.

采用高效液相色谱仪测定 L-色氨酸含量.色谱条件:色谱柱为 Agilent C18(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),采用纯乙腈和质量分数 0.3% 的磷酸二氢钾缓冲液(乙腈与磷酸二氢钾体积比为 1:9)恒梯度洗脱,柱温 39 °C,流量 1 mL/min,检测波长 278 nm.

胞内 ATP 浓度采用 ATP 快速检测试剂盒(Promega 公司)测定.

采用高效液相色谱仪检测发酵液中乙酸的含量.色谱条件:色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H(300 mm × 7.8 mm, 9 μm),0.05 mol/L 硫酸缓冲液洗脱,柱温 30 °C,流量 0.5 mL/min,检测波长 215 nm.

## 1.7 数据分析

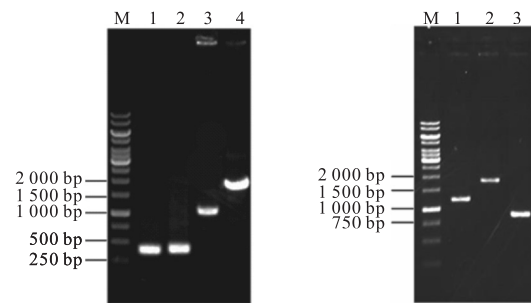
摇瓶发酵实验每组实验均设 3 个平行并重复 3 次,利用 Origin 8.0 和 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行处理.30 L 发酵罐实验共重复 3 次.

## 2 结果与分析

### 2.1 *iclR* 基因缺失突变株构建

本研究采用 Red 同源重组技术构建 *iclR* 基因缺失突变株 TRTH $\Delta$ *iclR*.先将 378 bp、388 bp 和 1 024 bp 的 *iclR* 基因的上、下游同源臂片段和氯霉素抗性  $Cm^r$  片段通过重叠 PCR 扩增得到大小为 1 790 bp 的  $\Delta$ *iclR* 片段,如图 1(a)所示;然后将  $\Delta$ *iclR* 片段电转化

到含有 pKD46 质粒的 TRTH 感受态中,复苏 2 h 后涂布于氨苄青霉素培养基上,挑取阳性菌进行 PCR 验证,*iclR* 敲除阳性菌 PCR 产物大小为 1 790 bp,原菌 PCR 产物大小为 1 207 bp,如图 1(b)所示.选取 pCP20 质粒转化的阳性菌,切除基因组上的氯霉素抗性基因,成功构建 TRTH $\Delta$ *iclR*.



M. marker. (a)中:1、2. 上、下游同源臂;3. 抗性基因 *cat*; 4. 上下游同源臂和抗性基因 *cat* 重叠. (b)中:1—3. 分别以 *E. coli* TRTH、 $\Delta$ *iclR* 单交换 *iclR*、删除抗性基因 *cat* 的菌株基因组 DNA 为模板扩增得到的片段

(a)抗性基因 *cat* 重叠片段的构建 (b)抗性基因 *cat* 片段消除的验证

图 1 TRTH $\Delta$ *iclR* 敲除菌 PCR 验证图谱

Fig. 1 PCR identification map of TRTH $\Delta$ *iclR* knock-out mutant strains

### 2.2 *iclR* 基因缺失突变株发酵测试

#### 2.2.1 摇瓶分批补料发酵

将 TRTH $\Delta$ *iclR* 接种于 30 mL 发酵培养基中,接种量 10%. 定时取样,经 32 h 发酵,结果如图 2 所示.重组菌 TRTH $\Delta$ *iclR* 的细胞生物量(以干质量计)最大为  $(10.52 \pm 0.42)$  g/L; L-色氨酸产量达到  $(6.52 \pm 0.46)$  g/L,相比原菌提高了 21.86%. 由此可见,在摇瓶上分批补料培养,敲除基因 *iclR* 能明显提高菌体生物量和 L-色氨酸积累量.摇瓶水平分批补料培养,重组菌 TRTH $\Delta$ *iclR* 和原菌的耗糖速率几乎同时在 17 h 达到峰值,之后的耗糖趋势基本一致,说明敲除基因 *iclR* 对菌体耗糖能力影响很小,甚至有微弱促进,因为前者峰值略高于后者;与原菌相比,重组菌胞内 ATP 浓度更高,16 h 时为  $(4 210 \pm 450)$  pmol/L,与原菌的差值达到最大,是原菌的 2.1 倍,这说明在发酵过程中重组菌的能量供给更充足.这可能是重组菌 TRTH $\Delta$ *iclR* 的生物量高于原菌的主要原因.

摇瓶分批补料培养下,重组菌 TRTH $\Delta$ *iclR* 发酵过程乙酸积累更低,最大值为  $(6.82 \pm 0.58)$  g/L(图 3a),比原菌降低了 37.63%. 这说明在摇瓶条件下,重组菌不会增加乙酸的积累,一定程度上降低了乙酸对菌体的毒害作用.作为中间代谢物,发酵液中谷氨酸

的含量对菌体的生长代谢也具有重要影响,相较于原菌株,谷氨酸浓度更低,在 15 h 后保持在 1.01 g/L,而原菌则保持在 2.03 g/L(图 3 b). 虽然谷氨酸浓度略低,但摇瓶内菌体量有限,对谷氨酸的需求并不高,故影响不大.

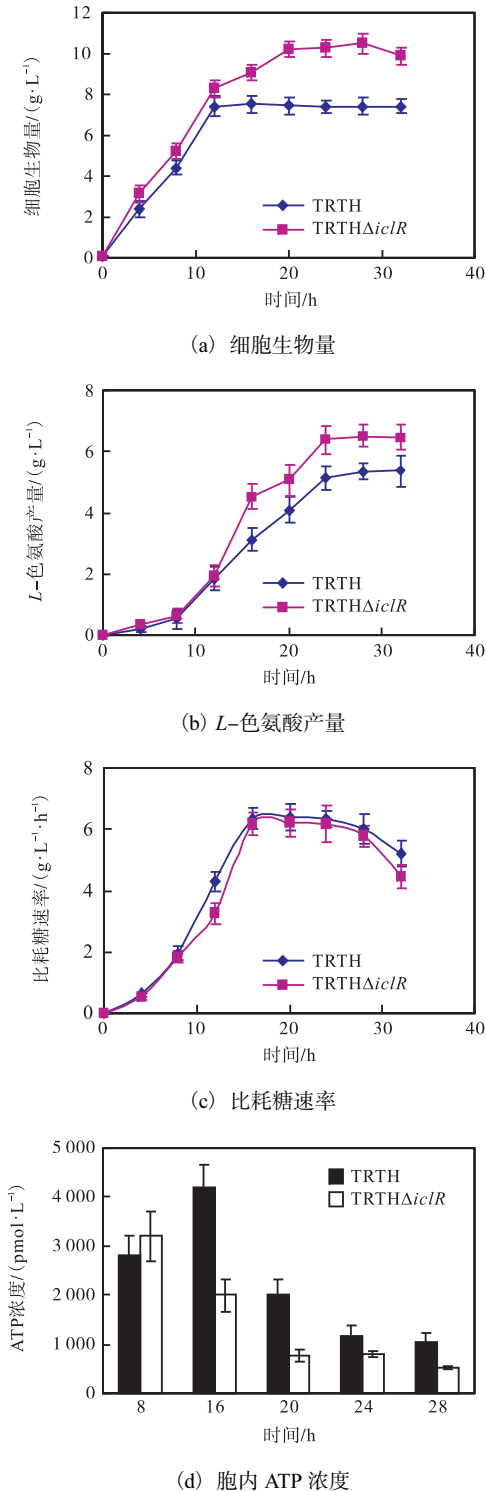


图 2 大肠杆菌 TRTH $\Delta$ iclR 摇瓶分批补料发酵过程曲线  
Fig. 2 The shake flask fed-batch fermentation process curve of *E. coli* TRTH $\Delta$ iclR

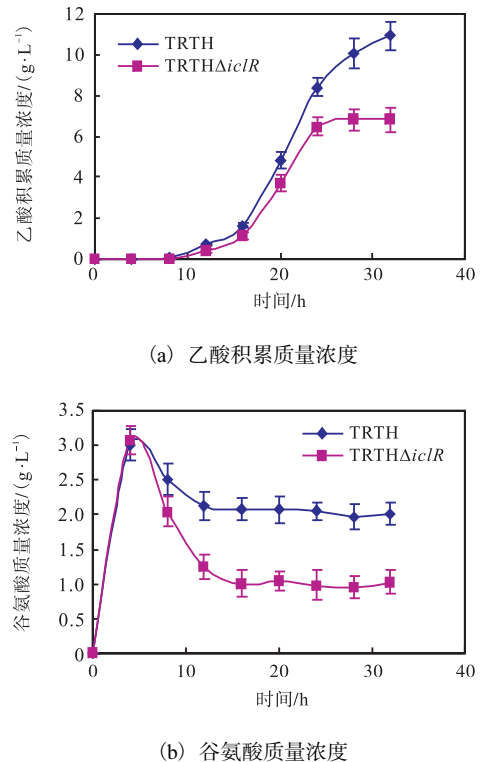


图 3 摇瓶条件下的大肠杆菌 TRTH $\Delta$ iclR 发酵液中乙酸积累浓度和谷氨酸浓度过程曲线

Fig. 3 Acetic acid concentrations and glutamic acid concentrations in *E. coli* TRTH $\Delta$ iclR shake flask fermentation broth

### 2.2.2 30 L 发酵罐分批补料发酵

将种子液以 13% 接种量接种于 16 L 发酵培养基中(30 L 发酵罐). 发酵周期为 36 h, 每 4 h 取样测细胞生物量和残糖量并记录, 剩余部分离心留样用于后续发酵液分析, 结果如图 4 和图 5 所示.

重组菌 TRTH $\Delta$ iclR 细胞生物量(以干质量计)为  $(30.36 \pm 2.10)$  g/L, 相比原菌  $(42.52 \pm 2.50)$  g/L 降低了 28.59%, 并且在培养 16 h 时进入稳定期, 比原菌提前了 4 h; L-色氨酸产量为  $(13.01 \pm 1.00)$  g/L, 比原菌  $(32.81 \pm 2.20)$  g/L 降低了 60.34%. 重组菌 TRTH $\Delta$ iclR 比耗糖速率先于原菌在 11 h 时就达到峰值, 比原菌提前了 7 h, 并在 22 h 后比耗糖速率急剧下降, 相比原菌耗糖明显缓慢. 胞内 ATP 浓度在发酵前期与原菌的相差不大, 但在发酵 16 h 时即降到  $(110 \pm 20)$  pmol/L, 远低于原菌的  $(5760 \pm 590)$  pmol/L, 且此后几乎检测不到 ATP 含量, 这可能是 TRTH $\Delta$ iclR 生物量低的原因.

30 L 发酵罐发酵中, 重组菌发酵液中的乙酸积累量略高于原菌, 达到了  $(18.21 \pm 1.10)$  g/L, 相比原菌增加了 33.42%. 其原因可能是 TRTH $\Delta$ iclR 过多、过快的摄糖使菌体无法消耗, 多余的糖则易转化为乙

酸. 乙酸积累量的增多, 加重了菌体的负担, 导致菌体裂解死亡、生物量减少、活力下降. 谷氨酸含量低于原菌, 在 20 h 后保持在 2 g/L, 而原菌在 24 h 达到最高值 4 g/L, 并最终保持在 3 g/L.

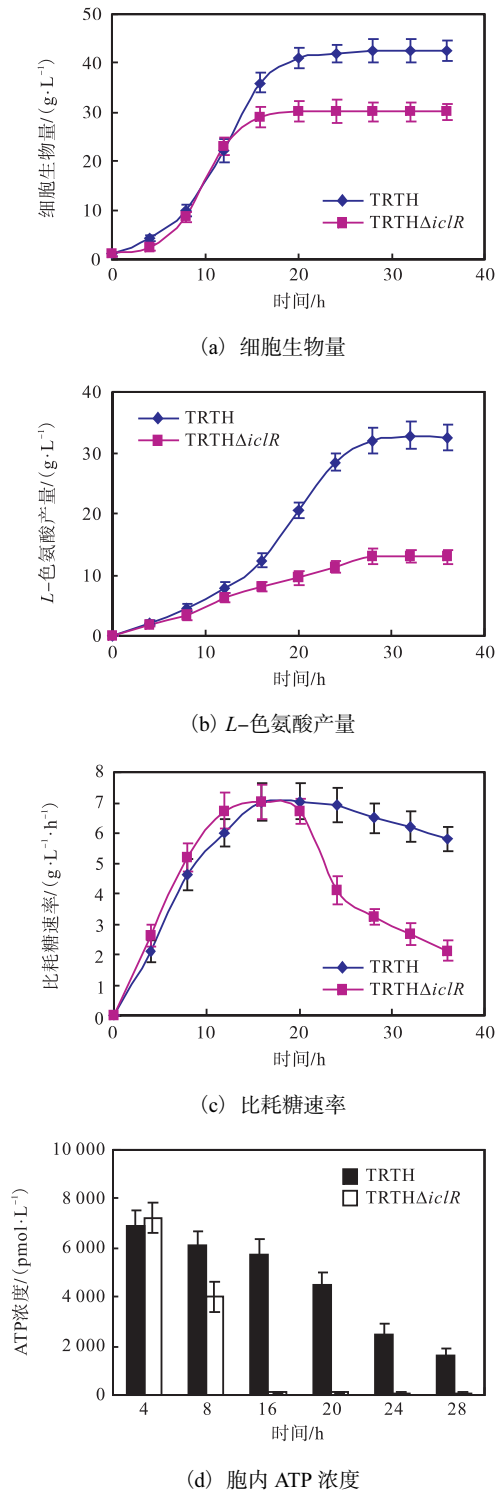


图 4 大肠杆菌 TRTH $\Delta$ iclR 30 L 发酵罐分批补料发酵过程曲线

Fig. 4 30 L fermenter fed-batch fermentation process curve of *E. coli* TRTH $\Delta$ iclR

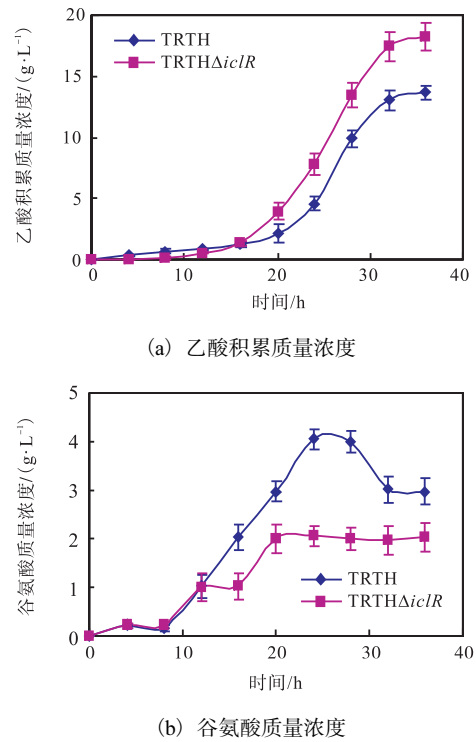


图 5 30 L 发酵罐条件下的大肠杆菌 TRTH $\Delta$ iclR 发酵液中乙酸积累浓度和谷氨酸浓度

Fig. 5 Acetic acid concentrations and glutamic acid concentrations in *E. coli* TRTH $\Delta$ iclR 30 L fermenter fermentation broth

### 3 讨论

通过敲除基因 *iclR*, 强化乙醛酸循环, 并研究了 TCA 代谢流量改变对 *L*-色氨酸合成的影响. 基因 *iclR* 的缺失对菌体在摇瓶上 *L*-色氨酸的积累有一定的促进作用, 但在 30 L 发酵罐上效果却不明显. 在摇瓶上 *L*-色氨酸产量高于原菌, 可能是摇瓶的溶氧和 pH 条件等欠佳, 在低生物量下, 由于能量代谢相对较弱, 敲除基因 *iclR* 的结果是通过 TCA 循环损失的  $\text{CO}_2$  量减少, 有利于提高 *L*-色氨酸的产量和转化率. 对比 Lee 等<sup>[8]</sup>的研究发现, 缺失了基因 *iclR* 后的改造菌较出发菌有更高的 *L*-苏氨酸积累, 可以推测增强乙醛酸循环敲除 *iclR* 会对下游的氨基酸代谢产生明显影响, 包括 *L*-色氨酸合成(莽草酸途径和分支途径等)和 *L*-苏氨酸合成(苏氨酸合成途径)等. 而在 30 L 发酵罐上, 溶氧和 pH 等条件适宜时, 菌体前期快速生长, 能量需求量大, 而重组菌缺失 *iclR* 基因, 在促进乙醛酸循环的同时, 间接削弱 TCA 循环的进行. 同样的结果出现在了周茜等<sup>[10]</sup>的实验中, 可以推测作为 TCA 循环的支路——乙醛酸的加强一定程度

上抑制了 TCA 循环. 作为中心代谢途径, TCA 循环一旦被削弱, 则会从多方面影响菌体的生长, 例如使谷氨酸的合成量减少, 而谷氨酸又是许多重要氨基酸的合成前体, 可能影响菌体生长和 L-色氨酸的积累(图 4); 又如减少重要中间产物  $\alpha$ -酮戊二酸的合成<sup>[10]</sup>, 作为碳-氮代谢的关键节点, 其供应量不足势必会影响菌体的生长; 同时也会导致能量供应不足, 胞内 ATP 浓度的降低(图 5). 供能不足会产生大量的乙酸(图 5), 而乙酸对菌体生长和各种酶的活性都有毒害和抑制作用, 导致生物量偏低和 L-色氨酸积累不足. 根据相关研究<sup>[5, 11-12]</sup>, 在接下来可以尝试对乙醛酸循环的强度进行适时、准确的调整, 使其不会干扰菌体正常生长, 做到这点不易, 需要更深刻地认识乙醛酸循环和与其相关的代谢网络; 在强化能量代谢方面作进一步研究, 例如增加细胞生长阶段的 ATP 合成等; 通过基因手段去除或减弱合成乙酸途径, 降低乙酸的积累等.

#### 参考文献:

- [1] Liu Qian, Cheng Yongsong, Xie Xixian, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of L-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Biore-source Technology, 2012, 114: 549-554.
- [2] Wakasa K, Ishihara A. Metabolic engineering of the tryptophan and phenylalanine biosynthetic pathways in rice [J]. The Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology, 2009, 26(5): 523-533.
- [3] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(6): 615-626.
- [4] Rezaei M N, Aslankoochi E, Verstrepen K J. Contribution of the tricarboxylic acid(TCA) cycle and the glyoxylate shunt in *Saccharomyces cerevisiae* succinic acid production during dough fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 204: 24-32.
- [5] Wang Zhengxiang, Brämer C O, Steinbüchel A. The glyoxylate bypass of *Ralstonia eutropha*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 228(1): 63-67.
- [6] Yamamoto K, Lshihama A. Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by *iclR*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 47(1): 183-194.
- [7] 刘子鹤, 王庆昭. *iclR* 基因敲除对大肠杆菌产琥珀酸的影响[EB/OL]. (2011-01-03) [2015-09-09]. 中国科技论文在线. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201101-13>.
- [8] Lee K H, Park J H, Kim T Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3: 1-8.
- [9] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 166-218.
- [10] 周茜, 郑会明, 陈宁, 等. 增强乙醛酸循环对大肠杆菌合成 L-苏氨酸的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 111-114.
- [11] 丁起龙, 李锡明. 能够产生 L-氨基酸的微生物及使用其产生 L-氨基酸的方法: 中国, 201380008312.0[P]. 2013-01-07.
- [12] Eiteman M A, Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(11): 530-536.

责任编辑: 郎婧