



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160152

## 乙酸激酶编码基因缺失的 *L*-色氨酸生产菌株的理性构建

赵春光, 徐庆阳, 张成林, 陈 宁  
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 针对 *L*-色氨酸生产菌株 (*Escherichia coli* TRTH) 发酵生产 *L*-色氨酸过程中乙酸积累的问题, 本文采用基因组学的方法证实了该菌株基因组上存在乙酸激酶编码基因 *ackA* 及 *tdcD* 的完整基因序列; 并通过敲除 *ackA*、*tdcD* 构建出菌株 TRTHA (TRTH,  $\Delta ackA$ )、TRTHT (TRTH,  $\Delta tdcD$ )、TRTHAT (TRTH,  $\Delta ackA \Delta tdcD$ ), 进而考察 *ackA* 或/和 *tdcD* 缺失对 *L*-色氨酸发酵的影响. 结果表明: 基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 的缺失会使得乙酸积累减少、菌体生物量及其 *L*-色氨酸产量增加, 但同时会造成谷氨酸积累量的增加; 菌株 TRTHA 的生物量及 *L*-色氨酸产量均高于 TRTHT. 利用 TRTHAT 菌株发酵生产 *L*-色氨酸时, 菌体生物量、*L*-色氨酸产量和糖酸转化率分别为 47.48 g/L、40.52 g/L 和 15.44%, 较 TRTH 菌株分别提高了 6.03%、7.94% 及 7.82%; 乙酸和谷氨酸积累量分别为 1.41 g/L、8.58 g/L, 较 TRTH 菌株分别降低了 10.19%、提高了 12.15%. 由 TRTH 与 TRTHAT 菌株的代谢流分析得知, 与出发菌株 TRTH 相比, TRTHAT 菌株的乙酸合成代谢流降低了 72.78%, 谷氨酸合成代谢流提高了 13.13%, *L*-色氨酸合成代谢流是 TRTH 菌株的 1.74 倍.

**关键词:** 大肠杆菌; *L*-色氨酸; 基因组学; 乙酸激酶; 代谢流分析

中图分类号: Q815 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2017)06-0015-06

## Rational Construction of Mutants without Acetate Kinase for *L*-Tryptophan Production

ZHAO Chunguang, XU Qingyang, ZHANG Chenglin, CHEN Ning  
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To deal with the high concentration of acetate accumulated in *L*-tryptophan production by using *Escherichia coli* TRTH, genes encoded with acetate kinase were analyzed with genomic methods and the results indicate that the complete sequence of *ackA* or/and *tdcD* existed in *E. coli* TRTH. Three mutants TRTHA (TRTH,  $\Delta ackA$ ), TRTHT (TRTH,  $\Delta tdcD$ ) and TRTHAT (TRTH,  $\Delta ackA \Delta tdcD$ ) were constructed by deleting *ackA* or/and *tdcD*, and the effect of *ackA* or/and *tdcD* deletion on *L*-tryptophan fermentation was investigated. The results indicate that the deletion of *ackA* or/and *tdcD* decreased the accumulation of acetate, increased the biomass and the production of *L*-tryptophan, but increased the concentration of glutamate. The biomass and production of *L*-tryptophan obtained with TRTHA were higher than those with TRTHT. Compared with TRTH, the highest biomass (47.48 g/L), the production of *L*-tryptophan (40.52 g/L) and the glucose conversion rate (15.44%) of TRTHAT increased by 6.03%, 7.94% and 7.82% respectively; the accumulation of acetate (1.41 g/L) and glutamate (8.58 g/L) decreased by 10.19% and increased by 12.15% respectively. Analysis of metabolic flux distribution of TRTH and TRTHAT indicates that the flux of acetate in TRTHAT was decreased by 72.78% and the flux of glutamate in TRTHAT was increased by 13.13% compared with TRTH, and the flux of tryptophan biosynthesis of TRTHAT was 1.74-times of that of TRTH.

**Key words:** *Escherichia coli*; *L*-tryptophan; genomics; acetate kinase; analysis of metabolic flux

作为人与脊椎动物的必需氨基酸之一, *L*-色氨酸在食品、医药及饲料行业得到广泛应用<sup>[1]</sup>. *L*-色氨酸

收稿日期: 2016-04-29; 修回日期: 2016-06-02

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2012AA02A703)

作者简介: 赵春光(1983—), 男, 山西忻州人, 博士研究生; 通信作者: 陈 宁, 教授, ningch@tust.edu.cn

酸可利用廉价原料通过微生物发酵法获得,且大肠杆菌(*E. coli*)是构建 L-色氨酸生产菌株的优选菌株. 乙酸是 *E. coli* 培养中的主要代谢副产物,乙酸的积累会抑制细胞生长并降低 *E. coli* 合成目的产物的能力<sup>[2-3]</sup>. 在 L-色氨酸发酵中,采用合适的补料策略将葡萄糖浓度维持在较低水平,可减少乙酸的积累并且能够提高菌体生物量与 L-色氨酸得率<sup>[4]</sup>. L-色氨酸作为初级代谢产物,与细胞生长呈部分偶联关系,因此提高菌株生物量,可有效地提高 L-色氨酸产量<sup>[1,3]</sup>.

乙酰辅酶 A 经磷酸乙酰转移酶(*pta* 编码)与乙酸激酶(*ackA* 编码)途径以及丙酮酸经丙酮酸氧化酶 B(*poxB* 编码)途径均可生成乙酸. 降低磷酸乙酰转移酶及乙酸激酶活性可显著降低乙酸的积累量<sup>[4]</sup>. 与野生型 *E. coli* 相比,*pta* 缺失菌株的乙酸积累量与乙酸合成速率均较低<sup>[5]</sup>. 基因 *pta* 或者 *ackA* 的缺失会减少乙酸的积累,但也会使得其他代谢副产物(丙酮酸、丙酮酸和乳酸等)的积累量增加<sup>[4]</sup>. 敲除 L-色氨酸生产菌株中的 *pta* 基因,可降低乙酸积累,并且能够获得较高的 L-色氨酸产量<sup>[6]</sup>. 研究表明,基因 *tdcD*

编码的酶具有丙酸及乙酸激酶活性,对乙酸合成有重要作用<sup>[7]</sup>. 过量表达 *tdcD* 可使乙酸激酶的比活性提高 38 倍. 与 *ackA* 单缺失菌株相比,*ackA-tdcD* 双缺失菌株的乙酸积累量较低<sup>[8]</sup>.

本研究以 *E. coli* TRTH 为出发菌株,敲除 *ackA*、*tdcD* 基因,构建了 3 株缺失菌株 TRTHA (TRTH,  $\Delta ackA$ )、TRTHT (TRTH,  $\Delta tdcD$ )、TRTHAT (TRTH,  $\Delta ackA \Delta tdcD$ ),并考察 *ackA* 及 *tdcD* 基因缺失对大肠杆菌发酵生产 L-色氨酸的影响. 同时,分析了菌株 TRTH 和 TRTHAT 中色氨酸合成途径代谢流的分布情况.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒及引物

本研究中所用菌株、质粒及引物见表 1. 其中, L-色氨酸生产菌株大肠杆菌 (*E. coli*) TRTH (*trpED-CBA*, Tet<sup>R</sup>,  $\Delta tanA$ )由天津科技大学工业微生物菌种保藏管理中心提供(保藏号为 TCCC27003).

表 1 菌株、质粒和引物

Tab. 1 Strains, plasmids and primers

类别	名称	特性
菌株	TRTH	<i>trpEDCBA</i> , Tet <sup>R</sup> , $\Delta tanA$
	TRTHA	TRTH 缺失 <i>ackA</i> 基因
	TRTHT	TRTH 缺失 <i>tdcD</i> 基因
	TRTHAT	TRTH 缺失 <i>ackA</i> 和 <i>tdcD</i> 基因
质粒	pKD46	Amp <sup>R</sup> , $\lambda$ Red-expressing vector
	pKD3	Cm <sup>R</sup> , Template vector
	pCP20	Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , FLP-expressing vector
引物	<i>ackA</i> 敲除上游引物	5'- <u>TGTCCCCGCGCAAACAAGCTAAAAAAATTAACAGAACGATTATCCGGCGTTGACATTGAG</u> CGATTGTGTAGGCTGGAG-3' <sup>a</sup>
	<i>ackA</i> 敲除下游引物	5'- <u>CGGATCACGCCAAGGCTGACGCTGGTCAGACCGACGCTGGTTCCGGTAGGGATCAG</u> TAACGGCTGACATGGGAATTAGC-3' <sup>a</sup>
	<i>ackA</i> 鉴定上游引物	5'-TGCCAGCCACCACAATC-3'
	<i>ackA</i> 鉴定下游引物	5'-GTGGTAGTTTGCACGAT-3'
	<i>tdcD</i> 敲除上游引物	5'- <u>GTGGGAGAGATCTCACTAAAACTGGGGATACGCCTTAAATGGCGAAGAAACGGTTTGAG</u> CGATTGTGTAGGCTGGAG-3' <sup>b</sup>
	<i>tdcD</i> 敲除下游引物	5'- <u>CATCCTGAACATCGTATACAACTGTTTTAATCCGTAACCTCAGGATGAGAAAAGAG</u> TAACGGCTGACATGGGAATTAGC-3' <sup>b</sup>
	<i>tdcD</i> 鉴定上游引物	5'-CGGGCGGACCAAATGATAC-3'
	<i>tdcD</i> 鉴定下游引物	5'-AACCCGAACATCCTTGAC-3'

注: a.下划线部分为基因 *ackA* 的同源臂序列; b.下划线部分为基因 *tdcD* 的同源臂序列.

#### 1.1.2 主要仪器

PCR 仪、电转化仪和核酸分析仪,美国 Bio-Rad 公司; 10 L、50 L 发酵罐,上海保兴生物工程设备有限公司; pH 和溶氧电极,美国 Mettler Toledo 公司; SBA-40C 型生物传感分析仪,山东省科学院生物研

究所; Agilent 1200 型高效液相色谱系统,美国 Agilent Technologies 公司; BioProfile 300A 型多参数生化分析仪,美国 Nova Biomedical 公司.

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基、2-YT 培养基及 SOC 培养基,参考文

献[9].

种子培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母提取物 7.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5, KCl 1.9,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.15,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 6.

发酵培养基(g/L):葡萄糖 10,酵母提取物 1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5, KCl 1.9,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.15,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 6.

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组学分析乙酸激酶编码基因

以 *E. coli* K-12 MG1655 为参考序列设计乙酸激酶编码基因 *ackA* 及 *tdcD* 的测序引物,以 *E. coli* TRTH 的基因组为模板进行 PCR 扩增,并进行基因序列测序分析;利用 BioEdit 软件对不同大肠杆菌蛋白质序列文件进行整合,利用 ClustalW2 软件,以整合后的蛋白质序列文件作为输入数据源进行多重序列比对, e-value 参数设置为  $1\text{E}-6^{[10]}$ .

### 1.2.2 利用 Red 技术敲除基因 *ackA* 与 *tdcD*

利用 Red 重组系统敲除 *E. coli* TRTH 中的基因 *ackA* 与 *tdcD*,具体操作步骤参见文献[9].

### 1.2.3 培养方法

基因 *ackA* 与 *tdcD* 敲除过程中,细菌培养方法参见文献[9].

### 1.2.4 分析方法

生物量和 L-色氨酸含量测定参见文献[1];葡萄糖及谷氨酸浓度采用生物传感分析仪测定;乙酸、乳酸及丙氨酸浓度采用 BioProfile 300A 分析仪测定.

### 1.2.5 代谢流分布情况分析

流量平衡方程计算<sup>[6,9]</sup>:假设细胞处于拟稳态,即代谢物的浓度变化速率为 0,则基于物料质量守恒定律,计算各个代谢物的积累速率.

代谢网络构建<sup>[6]</sup>:在本文中,仅检测发酵液中的色氨酸、丙氨酸、乙酸及乳酸的含量,因此在代谢网络中不考虑其他合成支路.

代谢流平衡模型建立<sup>[9]</sup>:基于 L-色氨酸的代谢网络、代谢节点处反应速率方程及化学计量平衡式,建立代谢流平衡模型.

## 2 结果与讨论

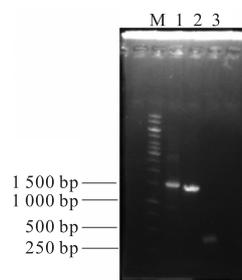
### 2.1 基因组学分析乙酸激酶编码基因 *ackA* 及 *tdcD*

生物信息学分析结果表明,菌株 *E. coli* TRTH 与野生型菌株 *E. coli* K-12 MG1655 的 *ackA* 和 *tdcD* 基因序列一致.序列比对分析表明,菌株 *E. coli*

TRTH 中的 *ackA* 与 *tdcD* 的基因序列及其相应的氨基酸序列相似度分别为 44% 和 63%;且乙酸激酶的所有活性中心位点均处于 *ackA* 与 *tdcD* 基因编码产物的保守序列区域.因此,敲除基因 *ackA* 与 *tdcD* 可降低乙酸激酶活性,从而有利于降低乙酸积累<sup>[11]</sup>.

### 2.2 缺失基因菌株的构建

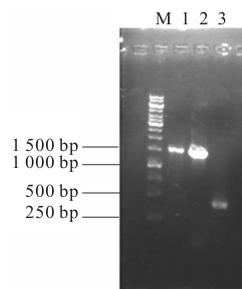
根据文献[9],敲除基因 *ackA* 与 *tdcD*,得到缺失菌株 TRTHA (TRTH,  $\Delta ackA$ )、TRTHT (TRTH,  $\Delta tdcD$ )、TRTHAT (TRTH,  $\Delta ackA \Delta tdcD$ ).利用鉴定引物 *ackA*-P3-*ackA*-P4、*tdcD*-P3-*tdcD*-P4 扩增 TRTHA、TRTHT、TRTHAT,结果如图 1 和图 2 所示.获得的片段经 DNAMAN 软件进行序列比对,结果与理论值相符,因此,成功得到缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株 TRTHA、TRTHT、TRTHAT.



M. 1 kbp DNA marker; 1. 菌株 TRTHP 的 *ackA* 基因的 PCR 产物; 2. 氯霉素抗性基因替换 *ackA* 基因 PCR 产物; 3. 氯霉素抗性基因消除 PCR 产物

图 1 基因 *ackA* 缺失的鉴定

Fig. 1 Identification of the deletion of *ackA*



M. 1 kbp DNA marker; 1. 菌株 TRTHP 的 *tdcD* 基因 PCR 产物; 2. 氯霉素抗性基因替换 *tdcD* 基因 PCR 产物; 3. 氯霉素抗性基因消除 PCR 产物

图 2 基因 *tdcD* 缺失的鉴定

Fig. 2 Identification of the deletion of *tdcD*

### 2.3 缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株发酵 L-色氨酸的过程分析

#### 2.3.1 生物量及细胞生长速率

基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 缺失菌株细胞在培养初期的生长速率较低,而到发酵后期时细胞生长速率较

高. 与菌株 TRTH (44.78 g/L) 相比, 菌株 TRTHA、TRTHT、TRTHAT 的生物量分别提高了 3.04%、2.59%、6.03%. 利用 TRTHAT 菌株发酵生产 *L*-色氨酸时, 其生物量最高达到 47.48 g/L (图 3).

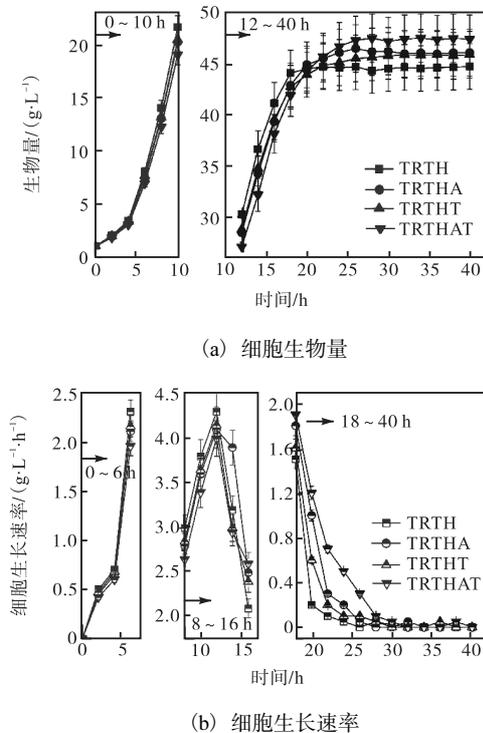


图 3 基因缺失对菌体生物量及其生长速率的影响

Fig. 3 Effect of gene deletion on biomass and cell growth rate

### 2.3.2 *L*-色氨酸产量及其合成速率

基因缺失对 *L*-色氨酸产量与合成速率的影响如图 4 所示. 由图 4 可知: 缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的 *L*-色氨酸产量均高于菌株 TRTH; 基因 *ackA-tdcD* 双缺菌株的 *L*-色氨酸产量高于 *ackA* 或 *tdcD* 单缺菌株, 且菌株 TRTHA 的 *L*-色氨酸产量高于菌株 TRTHT. 在发酵初期, 菌株 TRTH 的 *L*-色氨酸合成速率高于基因缺失 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株; 而在培养后期, 缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的 *L*-色氨酸合成速率高于菌株 TRTH. 利用菌株 TRTHAT 发酵生产 *L*-色氨酸, 其 *L*-色氨酸产量为 40.52 g/L, 较出发菌株提高了 7.94%. 乙酸积累量的降低会减少其对 *L*-色氨酸合成的抑制作用, 则会提高 *L*-色氨酸的产量<sup>[4,9]</sup>, 因此缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的 *L*-色氨酸产量均高于菌株 TRTH. 在缺失基因 *ackA*、*tdcD* 菌株发酵生产 *L*-色氨酸时, 丙酮酸浓度的增加会提高 PEP 合成酶的表达水平及 NADPH 的供应量, 则会提高 PEP 的供应量及进入还原途径的碳代谢流,

从而提高 *L*-色氨酸的合成<sup>[5]</sup>. 同时, 由于较低的乙酸积累量, 则缺失基因 *ackA*、*tdcD* 菌株的色氨酸合成速率高于 TRTH<sup>[4]</sup>.

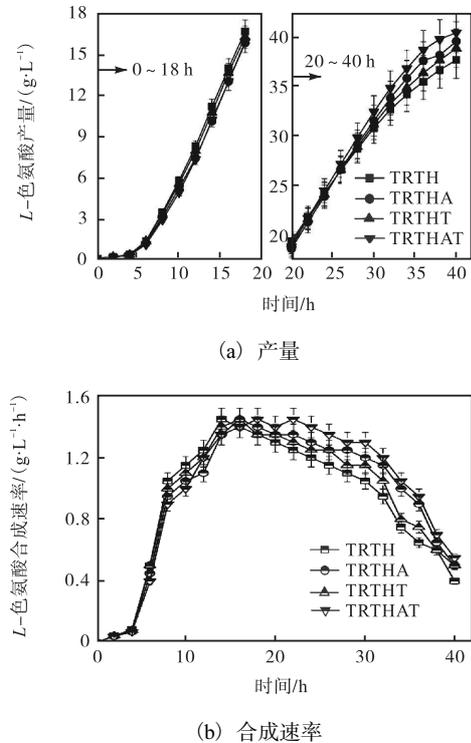


图 4 基因缺失对 *L*-色氨酸产量及合成速率的影响

Fig. 4 Effect of gene deletion on the production and production rate of *L*-tryptophan

### 2.3.3 乙酸积累量及其合成速率

基因缺失对乙酸积累量及其合成速率的影响如图 5 所示. 由图 5 可知, 基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 缺失会降低乙酸积累. 菌株 TRTHAT 的乙酸积累量为 1.41 g/L, 较菌株 TRTH 降低了 10.19%. 敲除基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的乙酸激酶活性会降低, 使得乙酸的合成速率与积累量降低<sup>[11]</sup>, 并且, 菌株 TRTHAT 的乙酸积累量低于基因 *ackA* 或 *tdcD* 单缺突变菌株<sup>[6]</sup>. 由于较低的乙酸积累量, 缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的生物量高于菌株 TRTH, 且基因 *ackA-tdcD* 缺失菌株的生物量最高. 缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的最大比生长速率均低于菌株 TRTH, 且菌株 TRTHAT 的最大比生长速率最低.

在 *E. coli* 中, 过量表达乙酰辅酶 A 合成酶编码基因 *acs* 可显著降低乙酸积累量及更多的乙酸发生同化作用, *Acs* 的表达受到乙酸的调节<sup>[5]</sup>. 由于缺失基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 菌株的乙酸积累量较低, 降低了 *Acs* 的活性, 基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 缺失菌株的乙酸消耗速率低于菌株 TRTH<sup>[2]</sup>.

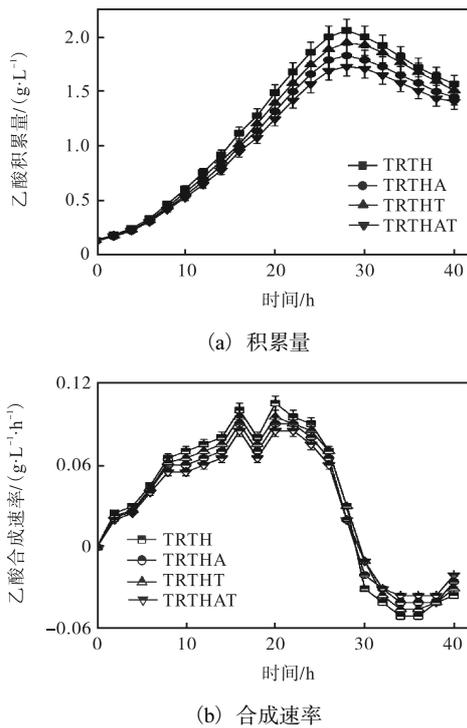


图5 基因缺失对乙酸积累量及其合成速率的影响

Fig. 5 Effect of gene deletion on the accumulation and production rate of acetate

2.3.4 丙酮酸与谷氨酸的积累量

基因缺失对丙酮酸与谷氨酸积累量的影响如图6所示.

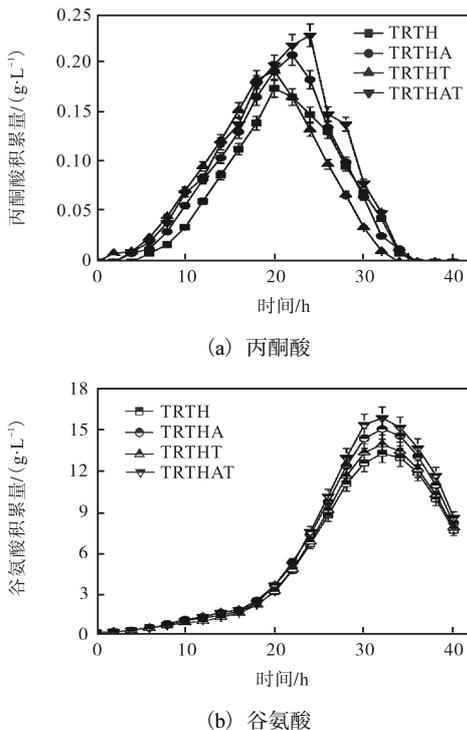


图6 基因缺失对丙酮酸与谷氨酸积累量的影响

Fig. 6 Effect of gene deletion on the accumulation of pyruvate and glutamate

由图6可知, 基因 *ackA*、*tdcD* 缺失菌株的丙酮酸与谷氨酸积累量均高于 TRTH. 培养初期形成的丙酮酸在发酵后期被重新利用<sup>[2]</sup>. 在菌体生长阶段, 菌株 TRTHAT 的丙酮酸积累量最高为 0.23 g/L, 是菌株 TRTH 的 1.31 倍; 菌株 TRTHA 的丙酮酸积累量也高于菌株 TRTHT 的. 期间, 各菌株的谷氨酸生成速率较低, 稳定期时谷氨酸生成速率增大. 菌株 TRTHAT 的谷氨酸积累量为 8.58 g/L, 较菌株 TRTH 提高了 12.15%. 敲除 *pta* 或/和 *ackA* 基因会造成其他代谢副产物, 如丙酮酸、乳酸及谷氨酸等的积累<sup>[11]</sup>. 谷氨酸在细胞生长阶段用于菌体合成, 则其积累速率较低; 而在菌体稳定期, 由于用于细胞合成的谷氨酸降低及伴随色氨酸的合成, 谷氨酸的积累量大幅提高<sup>[13]</sup>.

2.3.5 葡萄糖消耗速率及糖酸转化率

基因缺失对葡萄糖消耗速率与糖酸转化率的影响如图7所示.

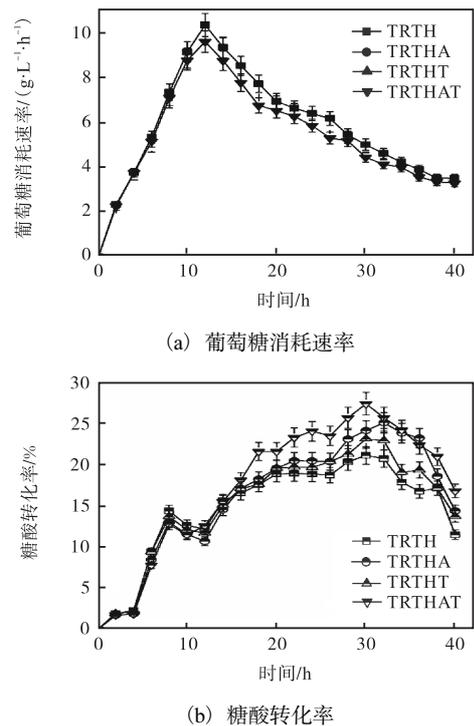


图7 基因缺失对葡萄糖消耗速率及糖酸转化率的影响

Fig. 7 Effect of gene deletion on the consumption rate and conversion rate of glucose

由图7可知: 培养初期, 随着菌体的生长及L-色氨酸的合成, 葡萄糖消耗速率及糖酸转化率逐渐提高; 在稳定期, 由于葡萄糖主要用于L-色氨酸合成, 则糖酸转化率维持在较高水平; 在发酵后期, 由于L-色氨酸合成速率的下降及菌株产酸能力的限制, 糖酸转化率逐渐降低. 在整个发酵过程中, 基因 *ackA* 或/

和 *tdcD* 缺失菌株的葡萄糖消耗速率低于菌株 TRTH; 而基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 缺失菌株的糖酸转化率高高于菌株 TRTH. 在 *L*-色氨酸发酵中, 菌株 TRTHA、TRTHT、TRTHAT 的糖酸转化率分别为 15.12%、14.98%、15.44%, 均高于菌株 TRTH(14.32%). 由于较低的乙酸积累量, 更多的葡萄糖参与目的产物的合成, 则提高了糖酸转化率<sup>[12]</sup>.

### 2.3.6 菌株 TRTH 与 TRTHAT 的 *L*-色氨酸合成途径代谢流分布

从菌株 TRTH 与 TRTHAT 生产 *L*-色氨酸的发酵过程可知, 在 28 h 后菌体生物量无明显变化, 则假设此阶段细胞处于拟稳态. 测定发酵后期(28 ~ 40 h)的葡萄糖、色氨酸、乙酸、乳酸、丙氨酸及谷氨酸的胞外浓度, 并计算其消耗或积累速率. 利用 MATLAB 软件计算利用菌株 TRTH 与 TRTHAT 发酵 *L*-色氨酸时, 发酵中后期 *L*-色氨酸生物合成途径的代谢流分布情况, 结果如图 8 所示, 括号内数值表示菌株 TRTHAT 的代谢流.

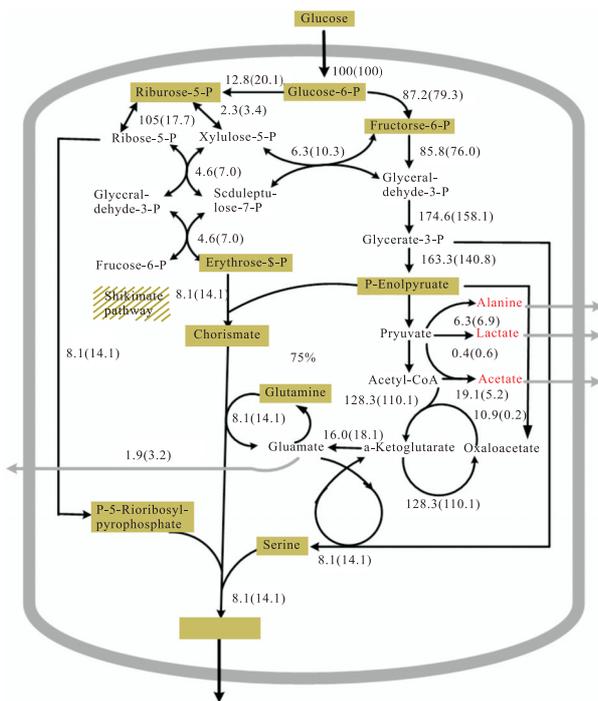


图 8 发酵中后期菌株 TRTH 与 TRTHAT 的 *L*-色氨酸合成途径的代谢流分布

Fig. 8 Metabolic flux distribution of TRTH and TRTHAT during the later fermentation period of *L*-tryptophan production

由图 8 可知, 基因 *ackA* 或/和 *tdcD* 缺失会改变菌株的代谢流分布. 与菌株 TRTH 相比, 菌株 TRTHAT 的糖酵解 (EMP) 途径的碳代谢流降低了 9.06%; 而磷酸戊糖 (HMP) 途径代谢流提高了

57.03%. 基因 *ackA* 或 *tdcD* 缺失后, 导致乙酸合成代谢流降低了 72.78%, 谷氨酸合成的代谢流提高了 13.13%. 菌株 TRTHAT 中更多的 PEP 与 4-磷酸赤藓糖 (E4P) 的代谢流进入莽草酸途径, 从而提高了其色氨酸合成代谢流. 菌株 TRTHAT 的色氨酸合成代谢流为 14.1%, 是菌株 TRTH 的 1.74 倍. 在菌株 TRTHAT 中, HMP 途径碳代谢流的增加会提高 E4P 的供应量, 则提高 *L*-色氨酸产量<sup>[2,6]</sup>. HMP 途径碳代谢流的提高会增加色氨酸合成所需的 NADPH 的合成<sup>[5]</sup>. 在菌株 TRTHAT 中, 由 PEP 合成丙酮酸的代谢流较低, 则 PEP 及 E4P 合成色氨酸的代谢流提高, 从而使菌株 TRTHAT 获得较高的 *L*-色氨酸产量<sup>[6,9]</sup>.

### 3 结 论

利用基因 *ackA-tdcD* 双缺菌株发酵生产 *L*-色氨酸, 可有效降低乙酸积累量, 使得 *L*-色氨酸产量及糖酸转化率提高, 这为 *L*-色氨酸的高效生产提供基础数据. 另外, 通过缺失乙酸激酶编码基因降低乙酸积累的策略, 可为以 *E. coli* 作为生产菌株的其他目的产物的菌株构建提供新的思路.

### 参考文献:

- [1] Liu Q, Cheng Y S, Xie X X, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of *L*-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114(2) : 549-554.
- [2] Wang J, Cheng L K, Wang J, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of *L*-tryptophan[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17) : 7587-7596.
- [3] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate : Sugar phosphotransferase system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 6(1) : 1-11.
- [4] Cheng L K, Wang J, Xu Q Y, et al. Effect of feeding strategy on *L*-tryptophan production by recombinant *Escherichia coli*[J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(4) : 1625-1634.
- [5] Báez-Viveros J L, Flores N, Juárez K, et al. Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce *L*-phenylalanine[J]. *Microbial Cell Factories*, 2007, 6(1) : 1-20.

(下转第 25 页)

- enzyme reaction of human preproinsulin for production of human insulin[J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2015, 25(10): 1742–1750.
- [10] Gary W. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2005, 67(2): 151–159.
- [11] Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, et al. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(10): 1598–1605.
- [12] 刘海峰. 重组胰岛素前体转化成人胰岛素和地特胰岛素的工艺研究[D]. 上海:华东理工大学, 2014.
- [13] 甘淋, 李娟, 何涛, 等. 几种蛋白质含量测定方法的比较研究[J]. *泸州医学院学报*, 2004, 27(6): 500–502.
- [14] Wu S, Zhu Y, Chen S, et al. Progress in fusion tags and its applications in protein soluble expression[J]. *Chemical Industry & Engineering Progress*, 2014, 33(4): 993–998.

责任编辑: 郎婧

(上接第20页)

- [6] Wang J, Huang J, Shi J M, et al. Fermentation characterization of an *L*-tryptophan producing *Escherichia coli* strain with inactivated phosphotransacetylase[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1219–1224.
- [7] 周丽, 田康明, 左志锐, 等. 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.
- [8] Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, et al. Cloning, characterization and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(10): 2878–2886.
- [9] 黄静, 史建明, 刘倩, 等. *pta* 基因敲除对 *L*-色氨酸发酵的影响[J]. *微生物学报*, 2011, 51(4): 480–487.
- [10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947–2948.
- [11] Zhao C G, Cheng L K, Wang J, et al. Impact of deletion of the genes encoding acetate kinase on production of *L*-tryptophan by *Escherichia coli*[J]. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(1): 261–269.
- [12] Castaño-Cerezo S, Pastor J M, Renilla S, et al. An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(1): 1–19.
- [13] Dodge T C, Gerstner J M. Optimization of the glucose feed rate profile for the production of tryptophan from recombinant *E. coli*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2002, 77(11): 1238–1245.

责任编辑: 郎婧