

pta 基因敲除对 L-色氨酸发酵的影响

黄静¹, 史建明¹, 刘倩¹, 徐庆阳¹, 谢希贤¹, 温廷益², 陈宁^{1*}

¹天津科技大学生物工程学院, 教育部工业微生物重点实验室, 天津 300457

²中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要:【目的】探究 *pta* 基因缺失对大肠杆菌发酵生产 L-色氨酸的影响。【方法】运用 Red 重组技术敲除 *pta* 基因, 构建 *pta* 缺失株 *E. coli* TRTH Δ *pta*。利用 30 L 发酵罐进行分批补料发酵试验, 考察重组菌 *E. coli* TRTH Δ *pta* 发酵生产 L-色氨酸过程中生物量、L-色氨酸产量、有机酸含量、发酵液中 NH₄⁺ 浓度及变化。建立了大肠杆菌合成 L-色氨酸的代谢流平衡模型, 应用 MATLAB 软件计算出 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵中后期代谢网络的代谢流分布。【结果】发酵结果显示, *pta* 缺失株能够以较长时间和较高比生长速率保持对数生长, 最终菌体生物量和 L-色氨酸产量分别提高了 52.7% 和 46.8%。有机酸含量分析结果表明, *pta* 缺失株乙酸含量显著降低, 只有 2.5 g/L, 仅为亲株的 19.5%; 丙酮酸和乳酸的含量有一定增加。多参数分析结果显示, *pta* 缺失株发酵过程中 NH₄⁺ 浓度较亲株降低 33.2%。*pta* 缺失株发酵生产 L-色氨酸的代谢流量分析结果表明, EMP 途径的代谢流量降低 7.4%, PP 途径的代谢流量增加 8.4%, TCA 循环的代谢流量降低 32.2%。【结论】*pta* 基因的缺失导致在发酵生产 L-色氨酸过程中代谢流发生变化, 乙酸含量的显著降低解除了乙酸对菌体生长和产物生成的抑制, 使得菌体生物量和 L-色氨酸产量大幅提高。

关键词: Red 重组技术, *pta* 基因, 基因敲除, 乙酸, L-色氨酸

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0480-08

作为人和动物必需氨基酸之一的 L-色氨酸广泛应用于医药、食品和饲料工业^[1]。目前利用微生物生产 L-色氨酸的方法主要有酶法、微生物转化法和微生物发酵法^[2], 其中微生物发酵法是大规模生产 L-色氨酸的首选技术, 现常用菌株有大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌。由于大肠杆菌具有遗传背景清楚、易培养、发酵周期短并能实现目的基因的高效表达等特性, 重组大肠杆菌得到广泛应用^[3]。但是在以葡萄糖为碳源的培养过程中, 大肠杆菌会生成并积累乙酸, 后者不仅抑制菌体生长, 而且降低外源基因

表达效率, 严重地影响大肠杆菌在高密度培养时的生产能力^[4]。在工业发酵过程中, 为了减少发酵过程中乙酸的积累, 通常采用葡萄糖流加发酵工艺, 严格控制发酵液中的葡萄糖浓度。但碳源流加工艺不能从根本上消除发酵过程中乙酸的产生, 同时还增加发酵过程控制的复杂性及成本支出。利用代谢工程技术构建 *pta* 缺失株, 能够阻断大肠杆菌培养过程中乙酸产生的主要通路, 降低乙酸的累积水平, 减少乙酸对菌体生长的抑制作用, 提高 L-色氨酸产量, 实现大肠杆菌的高密度培养。

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2008ZX09401-05); “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2008BAI63B01)

* 通信作者。Tel: +86-22-60272182; Fax: +86-22-60602298; E-mail: ningch@tust.edu.cn

作者简介: 黄静(1985-), 女, 硕士研究生, 专业方向为代谢控制发酵。E-mail: hhenry.kaka@163.com

收稿日期: 2010-11-03; **修回日期:** 2010-01-14

大肠杆菌产生乙酸的途径有两条,一是在丙酮酸氧化酶的作用下直接由丙酮酸产生乙酸(PoxB途径),但在大肠杆菌中此酶的活性很低,不足以产生大量的乙酸;另一条是在磷酸转乙酰基酶和乙酸激酶的作用下将乙酰 CoA 转化为乙酸(Pta-Ack途径),这是大肠杆菌产生乙酸的主要途径^[5],其中由 *pta* 基因编码的磷酸转乙酰基酶(Phosphate transacetylase,PTA)是该途径中的关键酶。本文以 *E. coli* TRTH 为出发菌,利用 Red 重组技术敲除 *pta* 基因,构建 *pta* 缺失株 *E. coli* TRTH Δ *pta*,并研究了 *pta* 缺失对细胞生长和 L-色氨酸发酵的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *E. coli* TRTH/pSV-709 (trpEDCBA)、*E. coli* DH5 α ,天津科技大学工业微生物菌种保藏室提供;质粒 pMD18-T vector 购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 引物:pKD3 含有氯霉素抗性基因,且在抗性基因两侧有 FRT 位点,在 Red 重组系统中作为抗性标记使用。根据 GenBank 提供的 *E. coli* K-12 W3110 基因序列信息,设计含有 56 bp 同源臂的一对寡核苷酸引物 P1、P2(划线部分为同源臂),用于从质粒 pKD3 上 PCR 扩增出含有氯霉素抗性基因及 FRT 位点的基因片段;在大肠杆菌染色体 *pta* 基因同源重组区域外侧,设计引物 P3、P4 用于检测重组菌株。P1: 5'-GCTGGCGGTGCTGTTTGTAAACCCGCCA
AATCGGCGGTAACGAAAGAGGATAAACCTTGAGCG
ATTGTGTAGGCTGGAG-3'; P2: 5'-TAGTGATTATTC
CGGTTTCAGATATCCGCAGCGCAAAGCTGCGGATGA
TGACCAGA TAACGGCTGACATGGGAATTAGC -3'; P3: 5'-GTTTCGGCAAATCTGTTTCATC-3'; P4: 5'-TGGT AAGTATGCAAAGTGGGATGG-3'。

1.1.3 主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶购于大连宝生物工程有限公司;PCR 引物由北京博迈德科技有限公司合成;1 kb marker 为 Fermentas 公司产品;L-阿拉伯糖购自天津艾勒科技发展有限公司;DNA 片段回收试剂盒、基因组 DNA 的提取试剂盒、质粒小样快速提取试剂盒购于北京天恩泽基因科技有限公司;IPTG、X-gal、溶菌酶、氨苄青霉素、氯霉素、四环素购于北京索莱宝公司;蛋

白胨、酵母粉为 Oxoid 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。MicroPulser Electroporator 购自 Bio-Rad 公司。

1.1.4 培养基:① LB 培养基,② 2-YT 培养基,③ SOC 培养基,④ 种子培养基,⑤ 发酵培养基。其中①②③培养基见参考文献[6],④⑤培养基见参考文献[1]。

1.2 PCR 片段的制备

以质粒 pKD3 为模板,P1、P2 为引物,进行 PCR 扩增,反应条件为:95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 延伸 10 min。用 *Dpn* I 酶作用 PCR 产物,并将 *Dpn* I 作用后的 PCR 产物用乙醇沉淀法进行回收。

1.3 含有 pKD46 电转感受态细胞的制备

pKD46 含有温度敏感型的复制起点 oriR101,在 30℃ 培养时可以正常复制,而高于 37℃ 时会自动丢失。在 pKD46 上还含有受 *P*_{araB} 启动子调控的 *exo*、*bet*、*gam* 基因,它们通过 L-阿拉伯糖诱导表达,并携带氨苄青霉素抗性基因作为筛选标记。挑取含有 pKD46 的 *E. coli* TRTH 单菌落于 5 mL 2-YT 液体培养基中,30℃ 培养 12 h,转接 2 mL 过夜培养的菌液至 100 mL 2-YT 培养基(氨苄青霉素的浓度为 100 μ g/mL),30℃ 培养至 OD_{600} = 0.2 - 0.3 时,加入 L-阿拉伯糖(终浓度 100 mmol/L),继续培养至 OD_{600} = 0.5 - 0.6,充分表达 pKD46 质粒上的 *Exo*、*Bet* 和 *Gam* 3 个蛋白,将菌液于 4℃ 预冷,9500 \times g,4℃ 离心 10 min,弃上清,用预冷的 10% 甘油洗涤 3 次,重悬于 600 μ L 10% 甘油,每管 50 μ L 分装,-80℃ 保存。

1.4 电转化

将同源臂引物扩增的氯霉素抗性基因片段与感受态细胞混合,于 1800 V,25 μ F,200 Ω 条件下电击,电击后迅速加入 1 mL SOC 培养基,120 r/min,37℃ 培养 1 - 2 h 之后涂布于含有氯霉素(25 μ g/mL)抗性的平板上,筛选阳性转化子。

1.5 抗性基因及 pCP20 质粒的消除

将 pCP20 电转入含氯霉素抗性的重组子,37℃ 复苏 1 h,涂布于氨苄青霉素(100 μ g/mL)抗性平板上。使用鉴定引物 P3、P4 对转化子进行菌落 PCR,将筛选到的阳性转化子接种于 LB 培养基中,42℃ 过夜培养,经划线分离,对每个单菌落进行氯霉素的抗性检测,挑选对氯霉素敏感的克隆,得到消除质粒

pCP20 的重组菌株。

1.6 摇瓶及发酵罐培养见参考文献[1]。

1.7 分析方法

菌体生物量、菌体比生长速率 μ 、葡萄糖浓度、L-色氨酸含量测定见参考文献[1];乙酸及乳酸浓度采用 BioProfile 300A Nova(美国 Nova Biomedical 公司)生化分析仪测定;丙酮酸及琥珀酸参照文献[7]进行测定;代谢流平衡模型的建立及代谢流量的计算参见文献[8-9]。利用 MATLAB 软件 linprog 函数求得代谢流分布。

2 结果

2.1 *pta* 基因缺失株的构建

以质粒 pKD3 为模板, P1、P2 为引物, 扩增出两端与 *pta* 基因上下游序列同源、中间为氯霉素抗性的片段。将扩增出的上游同源臂-氯霉素抗性基因-下游同源臂的 DNA 片段电转入含有质粒 pKD46 的 *E. coli* TRTH 感受态细胞中, 37°C 复苏 1-2 h, 涂布于氯霉素抗性平板。使用鉴定引物 P3、P4 对转化子进行菌落 PCR, 筛选阳性重组子。*pta* 基因的长度为 2488 bp, 而氯霉素抗性基因的长度为 1397 bp。

pCP20 含有温度敏感型的复制起点, 同时带有氨苄青霉素和氯霉素抗性。pCP20 上含有一个翻转酶重组酶 (Flippase recombination enzyme, FLP) 基因, FLP 重组酶可以与 FRT 位点结合, 在 FLP 重组酶的作用下, FRT 位点自身发生同源重组, 从而消除一个 FRT 位点及抗性基因, 重组酶 FLP 在 42°C 时诱导表达, 同时质粒也逐渐消失。将质粒 pCP20 电转入含氯霉素抗性的重组子, 37°C 复苏 1-2 h, 涂布于氨苄青霉素抗性平板上。使用鉴定引物 P3、P4 对转化子进行菌落 PCR, 将筛选到的阳性转化子接种于 LB 培养基中, 42°C 过夜培养, 经划线分离, 对每个单菌落进行氯霉素的抗性检测, 挑选对氯霉素敏感的克隆, 得到消除质粒 pCP20 的重组菌株 *E. coli* TRTH Δ *pta*。将重组子 *E. coli* TRTH Δ *pta* 使用鉴定引物 P3、P4 扩增出的 PCR 产物经博迈德公司测序, 测序结果经 DNAMAN 软件进行序列对比, 与理论一致。这表明我们已经成功获得 *E. coli* TRTH Δ *pta* 缺失突变株。

2.2 *E. coli* TRTH Δ *pta* 发酵生产 L-色氨酸

在 30 L 自动控制发酵罐上进行分批补料发酵,

每隔 2 h 测定生物量、L-色氨酸产量、及比生长速率等参数, 结果如图 1 所示。

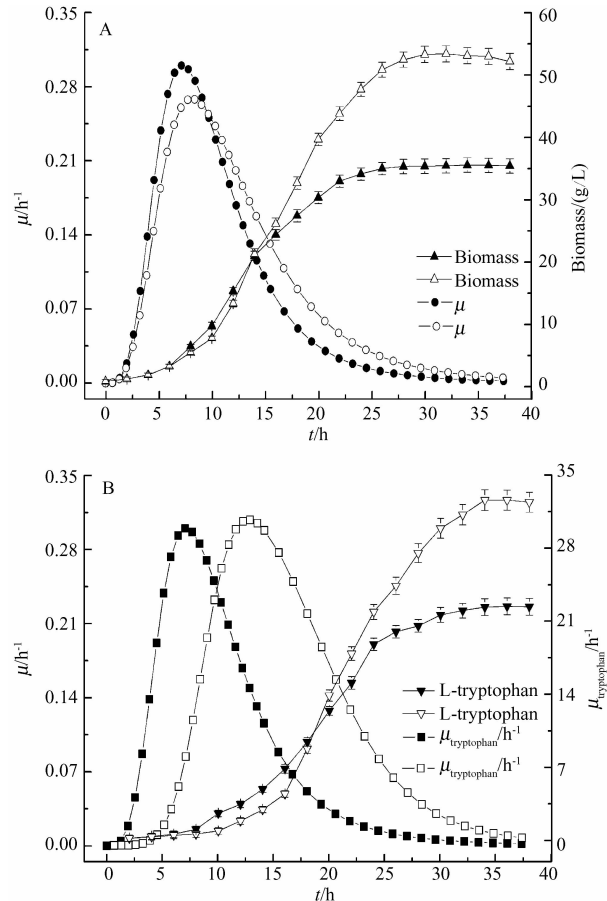


图 1 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵过程曲线

Fig. 1 The curve of L-tryptophan fermentation of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. A: Growth curve of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. B: L-tryptophan production curve of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. Filled symbols represent *E. coli* TRTH, open symbols represent *E. coli* TRTH Δ *pta*. Experiments were performed three times, and data were presented as the mean \pm SD. The same as below.

由图 1 可知, 发酵过程中, *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株在对数生长期存在显著差异。在对数生长期初期, *E. coli* TRTH 增长较快, 产酸水平较高; 对数生长期中后期, *pta* 突变株的比生长速率超过其亲株, 菌体迅速增殖, 产物大量合成; 24 h 后, *E. coli* TRTH 基本进入稳定期, 此时 *pta* 缺失株的比生长速率和比产酸速率虽然也明显下降, 但仍以一定速率增长。与 *E. coli* TRTH 相比, *pta* 突变株发酵过程中对数生长期延长, 对数生长期中后期保持较高的比生长速率和比产酸速率, 最终 *pta* 缺失株菌体生物量和 L-色氨酸产量分别提高了 52.7% 和 46.8%。

2.3 *E. coli* TRTH Δ *pta* 发酵过程中有机酸的积累

利用液相色谱法对 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵液的有机酸组成进行分析,结果如图 2 所示。

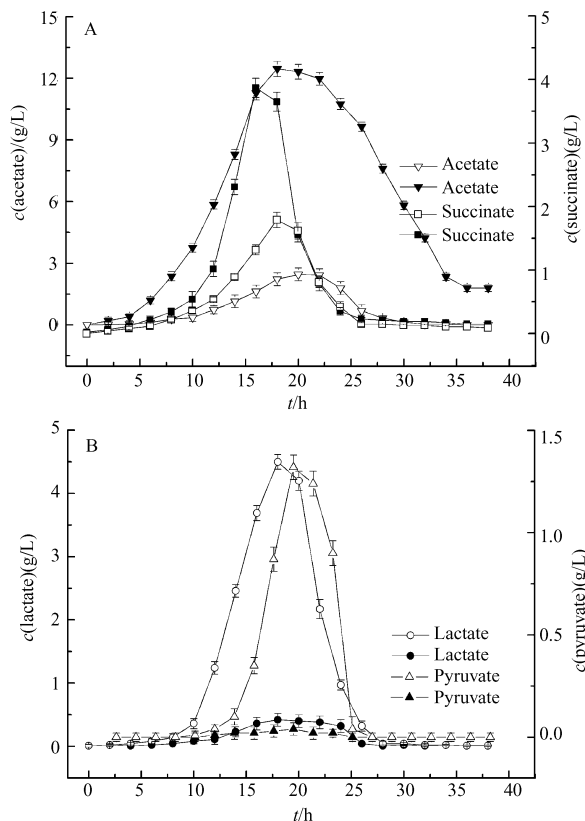


图2 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵生产 L-色氨酸过程中有机酸的累积

Fig. 2 Accumulation of organic acid during L-tryptophan fermentation of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. A: Acetate and succinate production curve of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. B: Lactate and pyruvate production curve of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant.

由图 2 可知, *E. coli* TRTH 发酵生产 L-色氨酸过程中, 大约从 2 h 开始产生乙酸, 随着比生长速率的增大, 乙酸迅速累积, 在 18 h 达到最大值 12.6 g/L, 18 h 后部分乙酸被菌体利用, 浓度有所下降; *pta* 缺失株大约从 6 h 才开始产生乙酸, 20 h 达到最大值 2.5 g/L, 仅为亲株的 19.5%, 随后乙酸被迅速消耗, 26 h 后发酵液中几乎未检测到乙酸。

E. coli TRTH 在整个发酵过程中乳酸的累积浓度很低, 最高只有 0.4 g/L; *pta* 缺失株从 8 h 开始产生乳酸, 18 h 达到最大值 4.5 g/L, 随后乳酸被迅速消耗, 24 h 后发酵液中未检测到乳酸。

2.4 *E. coli* TRTH Δ *pta* 发酵过程中离子浓度分析

利用 BioProfile 300A Nova 多参数分析仪对 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵生产 L-色氨酸过程中 PO_4^{3-} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ 离子进行检测, 结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出, *pta* 缺失株发酵过程中 NH_4^+ 累积浓度低于亲株, 最高只有 120.4 mmol/L, 降低了 33.2%。*E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵过程中 Na^+ , K^+ 和 PO_4^{3-} 离子的累积浓度无明显差异。

2.5 *pta* 缺失对代谢流量分布的影响

30 L 自控发酵罐 L-色氨酸发酵过程结果显示, 26 h 以后菌体量已没有明显变化, 认为此后细胞处于非生长期, 假设细胞内部的中间代谢物均处于拟稳态, 即其浓度变化速率为 0。根据代谢网络以及各步反应的化学计量平衡式, 代谢节点反应速率方程见表 1。从表 1 可以看出, 方程数为 20, 未知数为 25, 方程自由度为 5, 即需测定 5 个速率方可确定代谢网络中的流量分配。分别测定 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵中后期 (26–30 h) 发酵液中的葡萄糖、L-色氨酸、乙酸、乳酸及丙氨酸的胞外浓度, 计算各自的消耗或积累速率。利用 MATLAB 软件可计算 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵中后期代谢流分布, 结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出, *pta* 缺失株 L-色氨酸合成路径的代谢流增加了 7.0%。Glc6P 节点代谢流分配结果表明, EMP 途径的代谢流量降低 7.4%, PP 途径的代谢流增加 8.4%。Pyr 节点代谢流分配结果显示, TCA 循环的代谢流量降低 32.2%, 乳酸和丙氨酸支路代谢流分别增加 0.7% 和 0.8%, 乙酸支路代谢流减少 12.2%。

3 讨论

代谢工程是利用重组 DNA 技术通过操纵细胞的酶系、转运及调控功能、有目的地对生化反应的代谢网络进行修饰的技术。基因或基因簇的克隆、表达、修饰、敲除等基因操作均会导致细胞中心调控发生变化^[10]。本文利用 Red 重组系统成功敲除了大肠杆菌乙酸生物合成途径中的关键酶基因 *pta*, *pta* 缺失株发酵生产 L-色氨酸过程中, 乙酸含量显著降低, 解除了乙酸对菌体生长和产物生成的抑制, 使得菌体生物量和 L-色氨酸产量大幅提高。

由于大肠杆菌的氧化磷酸化和和三羧酸循环能力的有限,乙酰 CoA 不能被完全氧化为 CO_2 , 过剩的乙酰 CoA 经 Pta-Ack 途径生成乙酸^[11]。Chang^[12]指出, *pta* 基因敲除导致乙酰 CoA 过量积累, 过量的乙酰 CoA 将直接影响丙酮酸脱氢酶的活性, 造成丙酮酸的积累, 使得 PEP/Pyr 比值降低, 降低菌体对葡萄糖的吸收, EMP 途径代谢流减少; 过量积累的乙酰 CoA 进入 TCA 循环, 使得 TCA 循环代谢流增加。最终细胞能量供应不足, 葡萄糖吸收率降低, 致使细胞生长受阻, 菌体生物量下降。Sara^[11]在 *E. coli* BW25113 Δ *pta* 乙酰

CoA 节点分析中指出, 积累的乙酰 CoA 并没有直接进入 TCA 循环, 最终 EMP 途径和 TCA 循环的代谢流降低, PP 途径代谢流增强, 细胞能量供应充足, 菌体生物量增大。可见, *pta* 基因的敲除对于不同菌株的代谢流迁移是存在显著差异的。本文 *pta* 缺失株发酵生产 L-色氨酸的代谢流量分析结果表明, EMP 途径的代谢流量降低 7.4%, PP 途径的代谢流量增加 8.4%, TCA 循环的代谢流量降低 32.2%。EMP 途径流量减小, PP 途径流量的增大, 表明 *pta* 缺失株摄取的葡萄糖更多的用于菌体的生长, 因而菌体具有更强的生长能力。

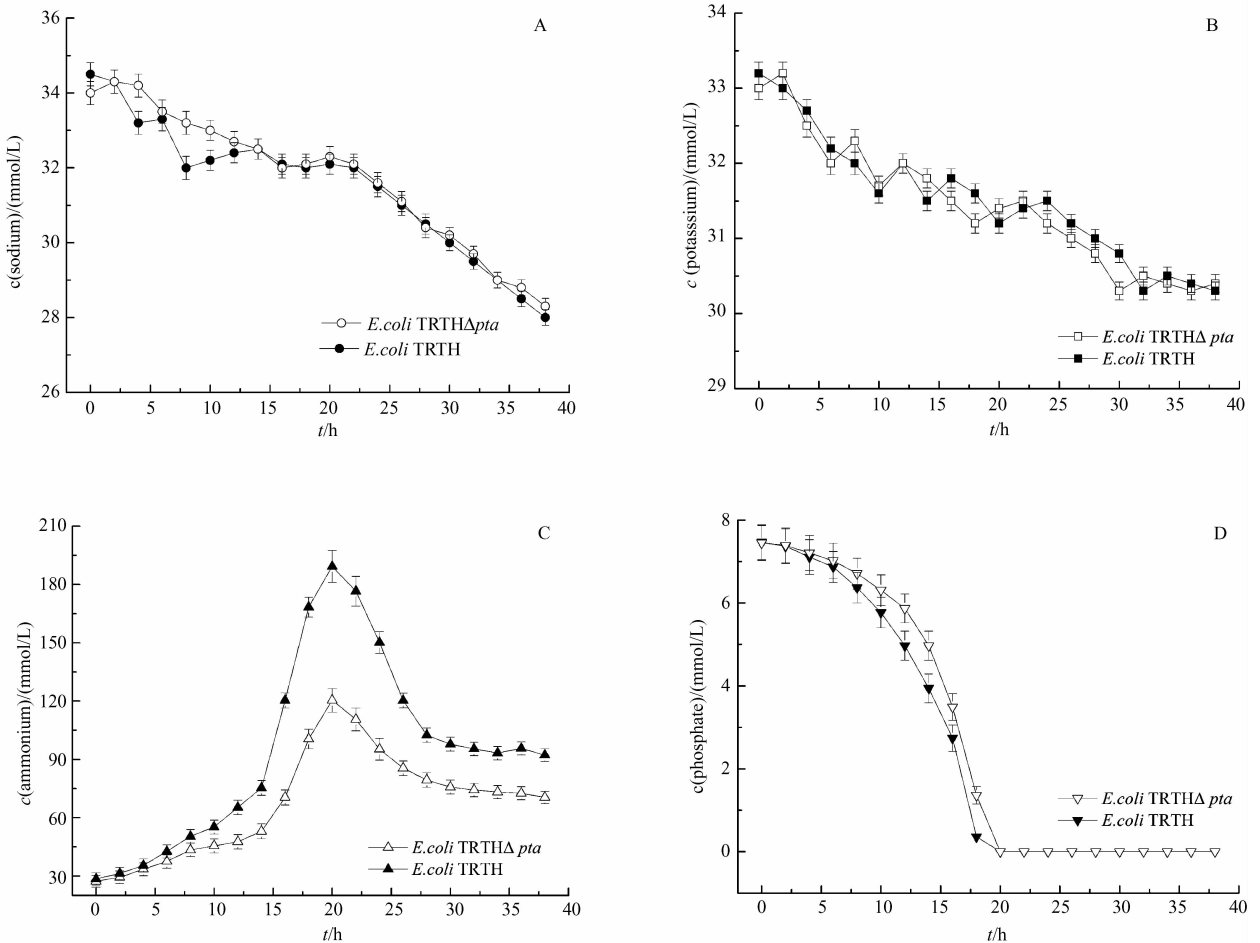


图3 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株发酵生产 L-色氨酸过程中离子浓度

Fig. 3 Concentration of sodium, potassium, ammonium and phosphate during L-tryptophan fermentation of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. A: Sodium concentration of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. B: Potassium concentration of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. C: Ammonium concentration of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant. D: Phosphate concentration of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant.

表 1 代谢节点反应速率方程

Table1 Reaction rate equation of metabolic nodes

Metabolic node	Reaction rate equation	Metabolic node	Reaction rate equation
Glc6P	$r1 - r2 - r11 = 0$	X5P	$r12 - r14 + r16 = 0$
F6P	$r2 - r3 + r15 - r16 = 0$	R5P	$r13 - r14 - r21 = 0$
GAP	$2r3 - r4 + r14 - r15 - r16 + r22 = 0$	S7P	$r14 - r15 = 0$
P3G	$r4 - r5 - r19 = 0$	E4P	$r15 + r16 - r17 = 0$
PEP	$r5 - r1 - r6 - r10 - 2r17 = 0$	Cho	$r17 - r22 = 0$
Pyr	$r1 + r6 - r7 + r22 - r23 - r25 = 0$	Glu	$r18 - r19 - r20 + r22 - r25 = 0$
AcCoA	$r7 - r8 - r24 = 0$	Gln	$r20 - r22 = 0$
α -KG	$r8 - r9 - r18 + r19 + r25 = 0$	PRPP	$r21 - r22 = 0$
OAA	$r9 - r8 + r10 = 0$	Ser	$r19 - r22 = 0$
Ru5P	$r11 - r12 - r13 = 0$	NADPH	$2r11 - r17 - r18 = 0$

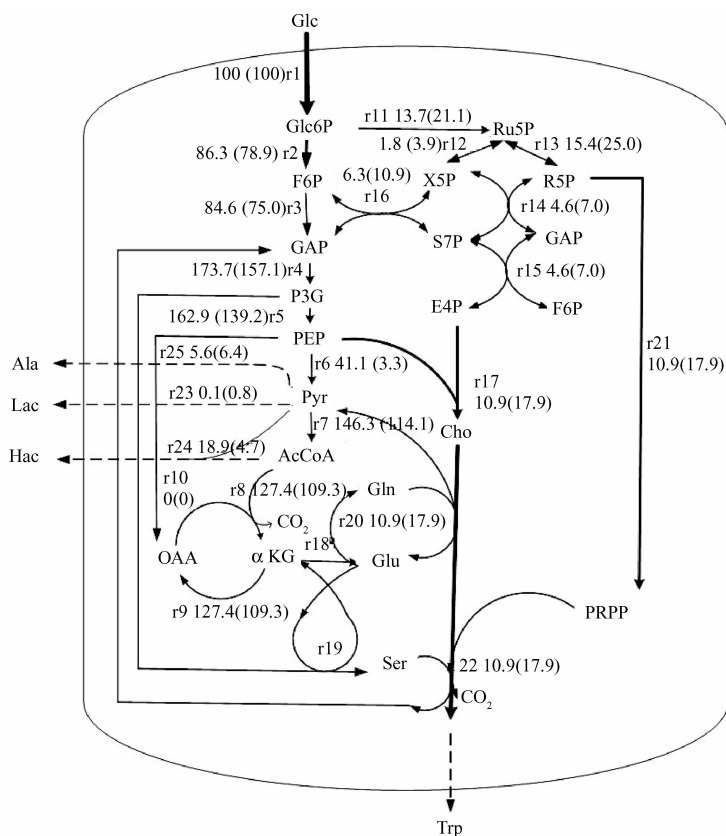
图 4 *E. coli* TRTH 及其 *pta* 缺失株 (括号内) 色氨酸合成代谢流分布

Fig. 4 Metabolic flux of L-tryptophan fermentation of *E. coli* TRTH and its *pta* mutant (values in brackets).

Luli GW^[13]指出,质子化的乙酸可以穿过细胞质膜进入胞内,在胞内解离成 CH_3COO^- 和 H^+ 。结果使 H^+ 内流,降低了胞内的 pH 值。大肠杆菌需要消耗 ATP 将 H^+ 泵到胞外来调节这种胞内 pH 值的降低,因此扰乱了细胞的正常代谢和生理活性。此

外,Buurman^[14]等对大肠杆菌的研究发现,在高浓度铵离子环境下,为了维持胞内 PH 的稳定,需要一种额外的运输系统(高亲和性的钾离子吸收系统, Kdp)负责铵离子的吸收和质子的泵出。由此可知,细胞环境中铵离子和乙酸浓度的增加必然降低细胞

对能量的利用率。*pta* 缺失株发酵过程中乙酸含量降低了 80.5%, NH_4^+ 累积浓度降低了 33.2%, 减少了 ATP 的消耗, 提高了能量利用率, 菌体生物量显著提高。

Schuster^[15] 对 L-色氨酸代谢网络优化结果表明, EMP 途径和 TCA 循环代谢流量减少, PP 途径代谢流量增加, 可为菌体提供充足的 NADPH 和 L-色氨酸生物合成前体物, 有望大大增加色氨酸合成的代谢流。但 W3110A 生产 L-色氨酸代谢流结果显示, PP 途径代谢流增加, L-色氨酸代谢流并未增强。发酵过程中苯丙氨酸和酪氨酸对 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶的反馈抑制, 大大降低了 DAHP 合成酶的活性, 使得大量碳流经 r16 (图 4 所示) 回流至 EMP 途径。同时, Schuster 还指出, 磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 的过度消耗也是 L-色氨酸代谢流减少的限制因素。本文 *E. coli* TRTH Δ *pta* 是酪氨酸和苯丙氨酸缺陷株, 对 DAHP 合成酶的反馈抑制已经解除, 因此与 Schuster 设计的理想 L-色氨酸代谢网络一致。PEP 节点分析结果表明, PEP 生成丙酮酸的代谢流量减少了 37.8%, PEP 生成 L-色氨酸的代谢流量增加了 7.0%。

本文利用 Red 重组系统敲除大肠杆菌 *pta* 基因, 并对 *pta* 缺失株的生长特性进行了初步研究。根据已有报导^[11], *pta* 基因位于 *ackA* 和 *yfcC* 基因之间。*ackA* 和 *pta* 两个基因位于一个操纵子内, *pta* 基因位于 *ackA* 基因的下游。本文只敲除了 *pta* 基因的编码序列, 因此并不影响 *ackA* 基因的转录和翻译, 同时序列分析表明, 敲除的 *pta* 基因的 ORF 内部并不存在邻近下游基因 *yfcC* 的启动子或终止子序列。可见, *pta* 基因敲除并不会影响其上下游基因的表达, *pta* 缺失株代谢特性的改变主要是由 *pta* 基因功能丧失所决定的。

目前, 在发酵工艺上主要通过补料策略限制细菌的比生长速率来降低乙酸的分泌水平, 利用代谢工程技术, 构建 *pta* 缺失株的基因工程菌可大大简化复杂的工艺操作, 降低生产成本。本文成功构建 *E. coli* TRTH Δ *pta*, 该工程菌的构建为工业化生产 L-色氨酸提供了理论依据并具有一定应用价值。

参考文献

[1] 程立坤, 黄静, 秦永锋, 徐庆阳, 谢希贤, 温廷益, 陈宁. 代谢副产物乙酸对 L-色氨酸发酵的影响. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2010, 37(2): 166-173.

- [2] Yanofsky C. Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 13: 10858-10878.
- [3] Eiteman MA, Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*, 2008, 24(11): 530-536.
- [4] Choi JH, Keumb KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Biomolecular Engineering*, 2006, 3(61): 876-885.
- [5] Shin S, Chang DE, Pan JG. Acetate consumption activity directly determines the level of acetate accumulation during *Escherichia coli* W3110 growth. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1127-1134.
- [6] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 1595.
- [7] 冯德明, 张洋, 赵慧明, 孙国昌, 孙培龙. 反相高效液相色谱法测定黄酒中的有机酸. 中国酿造 (*China Brewing*), 2009(3): 157-161.
- [8] Murarka A, James M, Clomburg, Gonzalez R. Metabolic flux analysis of wild-type *Escherichia coli* and mutants deficient in pyruvate-dissimilating enzymes during the fermentative metabolism of glucuronate. *Microbiology*, 2010, 156: 1860-1872.
- [9] 王健, 陈宁, 张蓓, 谭青乔, 张克旭. L-色氨酸生物合成的代谢流量分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43(4): 473-480.
- [10] 张蓓. 代谢工程. 天津: 天津大学出版社, 2003: 11.
- [11] Sara CC, Jose MP, Sergio R, Vicente B, Jose LI, Manuel C. An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8(54).
- [12] Chang DE, Shin S, Rhee JS, Pan JG. Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 1999, 21(181): 6656-6663.
- [13] Luli GW, Stroh WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 1990, 56(4): 1004-1011.
- [14] Buurman ET, Mattos MJ, Neijssel OM. Futile cycling of ammonium ions via the high affinity potassium uptake system (Kdp) of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*. 1991, 155: 391-395.

[15] Schmida JW, Maucha K, Reuss M, Gilles ED, Kremlingh A. Metabolic design based on a coupled gene expression-metabolic network model of tryptophan production in

Escherichia coli. *Metabolic Engineering*, 2004, 6: 363-377.

Effects of gene *pta* disruption on L-tryptophan fermentation

Jing Huang¹, Jianming Shi¹, Qian Liu¹, Qingyang Xu¹, Xixian Xie¹, Tingyi Wen², Ning Chen^{1*}

¹College of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Education Ministry, Tianjin 300457, China

²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [**Objective**] To study the effects of gene *pta* disruption on biosynthesis of L-tryptophan. [**Methods**] The *pta* gene of the L-tryptophan producing strain *E. coli* TRTH was disrupted by Red recombination technology and a *pta* mutant *E. coli* TRTH Δ *pta* was constructed. Fed-batch fermentation of *E. coli* TRTH Δ *pta* was carried out in 30-Liter fermentor to investigate the biomass, L-tryptophan production, organic acid content and the concentration of NH_4^+ , lactate, pyruvate and succinate. The metabolic flux balance model of L-tryptophan synthesis by *E. coli* was established. Based on this model, the practical metabolic flux distribution of *E. coli* and its *pta* mutant were determined with the linear program planted in MATLAB software. [**Results**] Compared with *E. coli* TRTH, the *pta* mutant was able to maintain higher growth rate at exponential phase, the final biomass and the L-tryptophan production were increased by 52.7% and 46.8% respectively. Meanwhile, the data analysis of organic acids accumulated during fed-batch culture showed that the concentration of acetate was decreased to 2.5 g/L, which was only 19.5% of that of the parental strain; as the decreased concentration of succinate, the accumulation of pyruvate and lactate was increased. The concentration of Na^+ , K^+ , PO_4^{3-} were consistent with *E. coli* TRTH during the fed-batch culture, the concentration of NH_4^+ was decreased by 33.2%. The metabolic flux analysis indicated that EMP pathway and TCA cycle were reduced by 7.4% and 32.2% respectively, but PP pathway was increased by 8.4% compared with *E. coli* TRTH during the middle and late period of the fed-batch culture. [**Conclusion**] In the process of L-tryptophan fermentation, *pta* gene deletion in *E. coli* TRTH led to change in metabolic flux and acetate content, which derepressed its inhibition on cell growth and production of L-tryptophan and finally made a substantial increase of bacterial biomass and L-tryptophan production.

Keywords: Red recombination, *pta* gene, gene knock-out, acetate, L-tryptophan

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Major scientific and technological special project for "significant new drugs creation" (2008ZX09401-05) and by the Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the Eleventh Five-year Plan Period(2008BAI63B01)

* Corresponding author. Tel: +86-22-60272182; Fax: +86-22-60602298; E-mail: ningch@tust.edu.cn

Received: 3 November 2010/ Revised: 14 January 2011