

## 不同碳源对大肠杆菌 *lpdA* 突变菌累积丙酮酸的影响

沈冬钱, 冯晓雨, 林东强, 姚善泾

浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州 310027

**摘要:** 为了利用大肠杆菌构建模式“细胞工厂”, 必须了解在构建过程中各种因素的影响。本研究选用敲除了 *lpdA* 基因的大肠杆菌作为模型细胞, 考察了该突变菌在合成培养基中利用葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖累积丙酮酸的能力。结果显示, 在初始糖浓度为 10 g/L 的情况下, *lpdA* 突变菌可以很好地利用葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖转化丙酮酸, 其得率分别达到了 0.884 g/g、0.802 g/g、0.817 g/g 和 0.808 g/g, 且在以葡萄糖、果糖和木糖发酵时, 丙酮酸的积累过程与细胞生长偶联。甘露糖发酵的情况则不同: 菌浓度很快达到平台期, 随后丙酮酸积累和甘露糖消耗都表现为线性变化。当在考察了不同的接种量对 *lpdA* 突变菌发酵葡萄糖的影响时发现, 大接种量能加快葡萄糖消耗速率、丙酮酸的积累速率和细胞生长速率, 但丙酮酸得率却明显下降。这些结果对构建以大肠杆菌为母体的模式“细胞工厂”有参考价值。

**关键词:** 大肠杆菌, 丙酮酸, *lpdA* 基因

## Effect of different carbon sources on pyruvic acid production by using *lpdA* gene knockout *Escherichia coli*

Dongqian Shen, Xiaoyu Feng, Dongqiang Lin, and Shanjing Yao

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

**Abstract:** We studied the ability of *lpdA* gene knockout *Escherichia coli* to ferment different sugars in mineral salts medium for the production of pyruvate. The sugars studied were glucose, fructose, xylose and mannose at a concentration of 10 g/L. At the same time, effect of inoculum size on *lpdA* fermentation with glucose was studied. The strain was able to use all sugars for biomass generation and pyruvate production. The *lpdA* knockout mutant converted glucose, fructose, xylose and mannose to pyruvate with yields of 0.884 g/g, 0.802 g/g, 0.817 g/g and 0.808 g/L, respectively. The pyruvate accumulation curve coupled with cell growth except for mannose as carbon source. When the inoculation size increased, the rate of glucose consumption, pyruvate accumulation and cell growth increased but lower pyruvate concentration. This study demonstrates that *E. coli lpdA* mutant has the potential to produce pyruvic acid from xylose and mannose.

**Keywords:** *Escherichia coli*, pyruvic acid, *lpdA* gene

利用代谢工程的手段改造细菌基因型, 从而控制菌体中心代谢通量, 以获得符合生物炼制要求的细胞工厂是实现从化石经济时代到生物经济时代转

变的必要条件。丙酮酸处于大肠杆菌代谢途径中承上启下的关键位置, 是糖酵解的产物和三羧酸循环的起始底物, 同时还是乳酸、乙酸、乙醇的前体物

Received: May 8, 2009; Accepted: July 14, 2009

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB7707805).

Corresponding author: Shanjing Yao. E-mail: yaosj@zju.edu.cn

国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2007CB7707805)资助。

质。为了达到大量积累代谢节点丙酮酸的目的,目前主要有以下几种手段:一是对细菌进行基因工程改造<sup>[1-2]</sup>;二是改进发酵策略<sup>[3]</sup>;三是同时使用以上2种手段<sup>[4]</sup>。Causey等<sup>[1]</sup>敲除了大肠杆菌一系列基因,得到了1株高效利用葡萄糖产丙酮酸的菌株TC44。然而,TC44代谢设计理念仅仅是1个字——“堵”:减弱ATP的合成(*atpFH*)、细胞的生长(*adhE*)、二氧化碳的生成(*sucA*)、消除乙酸的合成(*poxB:FRTackA*)和发酵产物(*focA-pflB*, *frdBC*, *ldhA*, *adhE*)的合成。这只是其中的一种手段,还应有其他的方法,特别譬如需要更加理性地通过调控手段来设计需要的细胞工厂。

研究报道表明<sup>[5]</sup>,胞内较低的NADH/NAD<sup>+</sup>比例有利于提高丙酮酸生产强度。同时,由丙酮酸合成乙醇、乳酸都需要消耗NADH,因此较低的NADH水平可以减少副产物乙醇和乳酸的合成。大肠杆菌NADH的合成主要来自糖酵解途径和TCA循环。而*lpdA*基因编码的硫辛酰胺脱氢酶(LPD)是丙酮酸脱氢酶复合体系(PDHc)、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体系(AKGDH)和甘氨酸裂解多酶体系(GDC)的组成成分。大肠杆菌中的PDHc是连接糖酵解途径和三羧酸循环的关键酶系,在其催化作用下丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶A<sup>[6]</sup>。通过以上分析,敲除大肠杆菌*lpdA*基因,既能“拦截”丙酮酸进入TCA循环,又能在NADH水平上调控乙醇、乳酸等副产物的合成,从而有利于丙酮酸积累。葡萄糖、木糖、果糖、甘露糖、阿拉伯糖和蔗糖都是发酵过程中常见的糖原。本实验所用到的大肠杆菌不能利用蔗糖发酵,同时为了基因操作方便,该菌株利用阿拉伯糖的基因*araB*被敲除了,因此也不能利用阿拉伯糖。从这一思路出发,本研究将主要考察*lpdA*基因敲除大肠杆菌在葡萄糖、木糖、果糖和甘露糖发酵中的积累情况,试图从不同碳源,特别是不同糖原的角度来分析敲除*lpdA*基因后大肠杆菌累积丙酮酸的规律,为深入了解该菌株代谢规律和产物积累做一些实验探讨,并为混合糖原发酵打下基础。同时,不同糖的使用也符合构建用于生物炼制的“细胞工厂”的需要。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 1100, 美国 Agilent 公司;

Ultrospec 3300 Pro 紫外/可见分光光度计, GE Healthcare 公司; SHpH-6 pH 控制-补料摇床, 上海国强生化装备有限公司; 所有生化试剂均为化学纯或分析纯。

### 1.2 菌种

*lpdA* 基因敲除大肠杆菌 *Escherichia coli* JW0112 (*lacI<sup>r</sup>rrnB<sub>T14</sub>lacZ<sub>WJ16</sub>hsdR514ara-BAD<sub>AH33</sub>ArhaBAD<sub>LD78</sub>AlpdA*) 菌株, 由日本奈良先端科学技术大学 Hirota Mori 教授赠予, 浙江大学生物工程研究所保藏。该菌株是利用 PCR 技术一步失活染色体上 *lpdA* 基因而构建的<sup>[7-9]</sup>。

### 1.3 培养基

#### 1.3.1 种子和平板培养基(g/L)

酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 琼脂 15(平板添加), pH 7.0。

#### 1.3.2 合成培养基

基本组成为 48 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/L NaCl, 30 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。每升合成培养基另加入经微孔膜过滤除菌的下列溶液: 1 mol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/L vitamin B1 各 1 mL 和 10 mL 微量元素溶液。其中每升微量元素溶液含: 0.55 g CaCl<sub>2</sub>, 1 g FeCl<sub>3</sub>, 0.1 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.17 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.043 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.06 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O。

#### 1.3.3 发酵培养基

合成培养基添加 10 g/L 的糖原。

### 1.4 培养方法

初级种子培养条件: 37°C 下, 200 r/min, 15 mL 试管中装液 3 mL, 培养 12 h。

次级种子培养条件: 37°C 下, 200 r/min, 250 mL 摇瓶中装液 50 mL, 培养 12 h。

摇瓶发酵条件: 37°C 下, 150 r/min, 500 mL 摇瓶中装液 100 mL, 通过往培养基中流加 2 mol/L NaOH 或者 2 mol/L HCl 将 pH 控制在 7.0, 间隔一定时间取样。

### 1.5 分析方法

#### 1.5.1 生物量的测定

采用浊度法, 以空白为参比, 测定发酵液在 600 nm 下的吸光度(如有必要, 可以稀释一定倍数)。

#### 1.5.2 糖浓度的测定

糖浓度采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)检测。

### 1.5.3 丙酮酸的测定

采用 aminex HPX-87H 色谱柱(美国 BIO-RAD 伯乐公司), 检测波长 210 nm, 流动相 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.4 mL/min, 柱温为室温。将培养液 8000 r/min 离心去细胞, 取上清液适当稀释后, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样, 根据丙酮酸浓度和峰面积的标准曲线, 分析丙酮酸浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *lpdA* 突变菌代谢分析

在大肠杆菌中, *lpdA* 基因编码的硫辛酰胺脱氢酶(Lipoamide dehydrogenase, LPD)是丙酮酸脱氢酶复合体(Pyruvate dehydrogenase complex, PDHc)、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶复合体( $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase complex,  $\alpha$ -KGDH)和甘氨酸裂解多酶体系(Glycine cleavage multi-enzyme, GCV; Glycine decarboxylase complex, GDC)的组成成分。*lpdA* 基因敲除大肠杆菌的主要代谢途径见图 1。

在有氧条件下, 大肠杆菌中的 PDHc 是连接糖酵解途径和三羧酸循环的关键酶, 在其催化作用下丙酮酸氧化脱羧生成乙酰辅酶 A。在葡萄糖基本培养基中进行有氧发酵时, PDHc 缺陷的 *E. coli* 要维持正常的生长繁殖活性, 就需要丙酮酸氧化酶(Pyruvate oxidase, PoxB), 该酶催化丙酮酸直接转化成乙酸和二氧化碳<sup>[10]</sup>。乙酸再经由乙酸激酶(Ack)和磷酸转乙酰基酶(Pta)或者乙酰辅酶 A 合成酶(Acs)催化合成乙酰辅酶 A(AcCoA), 从而进入三羧酸循环。PDHc 的失活导致这一途径中酶活上升, 用以提供足够多的乙酰辅酶 A 供菌体维持正常的生长繁殖。同时, PDHc 的失活也激活了催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)到草酰乙酸(OAA)的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Ppc)<sup>[11]</sup>。这些现象虽然都在一定程度上缓解了 PDHc 失活带来的影响, 但始终无法消除其影响, 该酶的缺陷会导致丙酮酸的积累<sup>[2,12]</sup>。

$\alpha$ -KGDH 是三羧酸循环的限速酶, 催化 $\alpha$ -酮戊二酸反应生成琥珀酰辅酶 A, 同时为电子传递链提供 NADH。之前的研究表明<sup>[11]</sup>,  $\alpha$ -KGDH 的失活阻断了正常的三羧酸循环, 使得乙醛酸途径酶活升高, 乙醛酸途径需要消耗乙酰辅酶 A。乙酰辅酶 A 与草

酰乙酸合成柠檬酸是 TCA 循环的第一步反应, 非正常的 TCA 循环需要消耗更多的乙酰辅酶 A, 产生更少的 NADH。

如图 2 所示, 果糖在大肠杆菌通过以下 3 种途径进入糖酵解途径: 1) 果糖经果糖激酶(Fructokinase)的催化<sup>[13]</sup>得到 6-磷酸果糖; 2) 果糖在果糖磷酸转移酶<sup>[14]</sup>作用下得到 1-磷酸果糖, 而后由 1-磷酸果糖激酶(Fructose-1-phosphate kinase, FPK)催化获得 1, 6-二磷酸果糖; 3) 果糖在果糖磷酸转移酶作用下得到 1-磷酸果糖, 而后由果糖二磷酸醛缩酶(Fructose-bisphosphate aldolase class I)和磷酸丙糖异构酶(Triosephosphate Isomerase, TPI)三步催化获得 1, 6-二磷酸果糖。

大肠杆菌具有编码木糖异构酶的 *xylA* 基因<sup>[15]</sup>和编码木酮糖激酶的 *xylB* 基因<sup>[16]</sup>, 在这 2 个酶的催化作用下, 木糖转化为 5-磷酸木酮糖, 进而由 5-磷酸核酮糖异构酶催化得到 5-磷酸核酮糖, 进入磷酸戊糖途径。

甘露糖在大肠杆菌中的代谢主要是在甘露糖磷酸转移酶的催化下生成 6-磷酸甘露糖, 而后在 6-磷酸甘露糖异构酶的作用下得到 6-磷酸果糖, 进入糖酵解途径。

从以上分析可知, 葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖能通过不同的途径进入大肠杆菌中心代谢循环, 并且都处于丙酮酸节点的上游, 都有作为碳源发酵积累丙酮酸的可能。菌株对不同碳源的适应性是利用粗糙混合底物发酵的前提, 具有考察的必要性。

### 2.2 不同糖原的发酵结果

之前的大量研究已经证实<sup>[1,5]</sup>, 野生型大肠杆菌无法大量积累处于代谢节点的丙酮酸。本工作也曾进行了野生型大肠杆菌发酵葡萄糖的实验, 其丙酮酸最高浓度约为 0.2 g/L(数据未显示)。分析图 3A 可以发现, 葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖都可以被 *lpdA* 菌株利用并积累大量丙酮酸, 在 10 g/L 的初始碳源浓度下, 葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖发酵的丙酮酸最高浓度分别达到了 8.4、8.3、7.8、6.78 g/L, 得率分别达到了 0.884 g/g 葡萄糖、0.802 g/g 果糖、0.817 g/g 木糖和 0.808 g/g 甘露糖(表 1)。达到了理论得率的 91%、82%、88%和 83%。*LpdA* 突变菌利

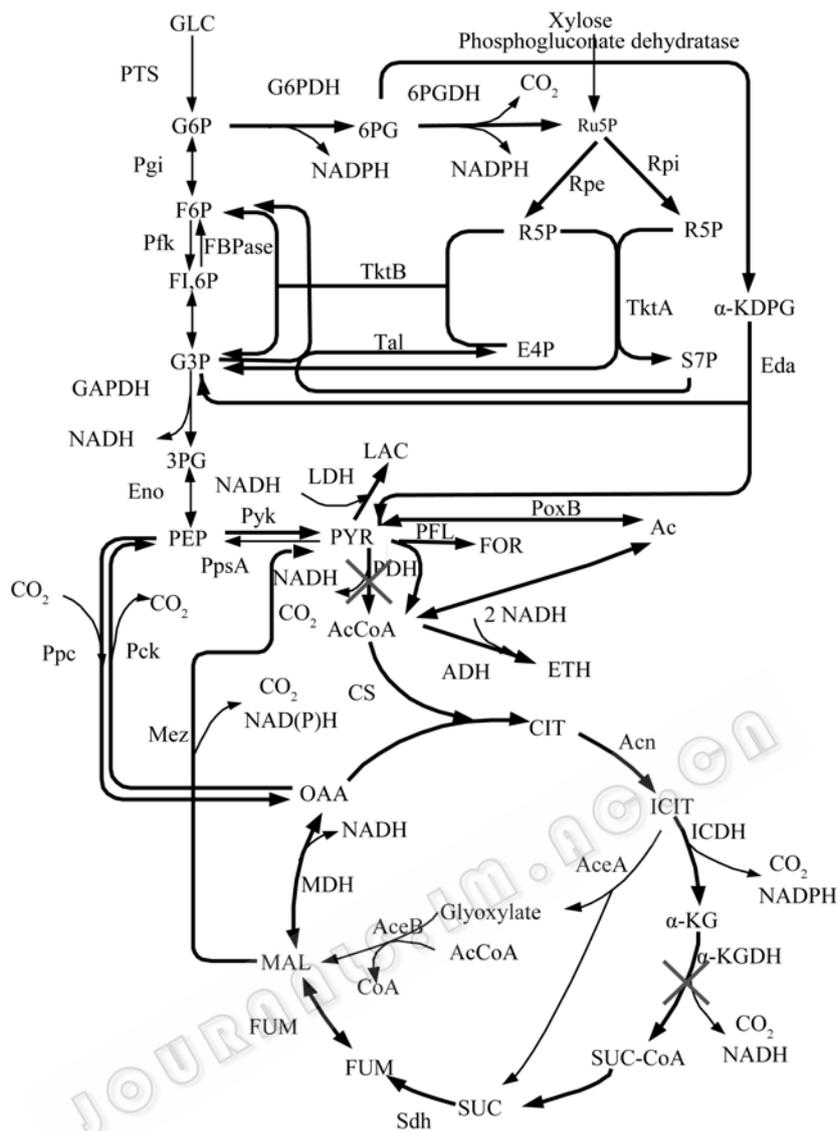


图 1 *lpdA* 基因敲除突变大肠杆菌的中心代谢途径

Fig. 1 Central metabolic pathways of *lpdA* gene knockout *E. coli*. 3PG: 3-phosphoglycerate; 6PG: 6-phosphogluconate; 6PGDH: 6-phosphogluconate dehydrogenase; Ac: acetate; AcCoA: acetyl coenzyme A; Acn: aconitase; ADH: alcohol dehydrogenase; CIT: citrate; CoA: coenzyme A; E4P: erythrose-4-phosphate; Eda: KDPG aldolase; Eno: enolase; ETH: ethanol; F1,6P: fructose-1,6-bisphosphate; F6P: fructose-6-phosphate; FBPase: fructose-1,6-bisphosphatase; Fum: fumarate; FUM: fumarate; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; G6P: glucose-6-phosphate; G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GLC: glucose; ICIT: isocitrate; ICDH: isocitrate dehydrogenase; LAC: lactic acid; LDH: lactate dehydrogenase; MAL: malate; MDH: malate dehydrogenase; Mez: malic enzyme; OAA: oxalacetic acid; Pck: pyruvate carboxykinase; PEP: phosphoenolpyruvate; Pfk: phosphofruktokisnase; PFL: pyruvate formate lyase; Pgi: phosphoglucose isomerase; PoxB: pyruvate oxidase; Ppc: phosphoenol pyruvate carboxylase; Pps: phosphoenolpyruvate synthase; PTS: phosphate transfer system; Pyk: pyruvate kinase; PYR: pyruvic acid; R5P: ribose-5-phosphate; Rpe: ribulose-5-phosphate epimerase; Rpi: ribulose-5-phosphate; Ru5P: ribulose-5-phosphate; S7P: sedoheptulose-7-phosphate; Sdh: succinate dehydrogenase; SUC: succinate; SUC-CoA: succinyl coenzyme A; Tal: transaldolase; Tkt: transketolase; X5P: xylulose-5phosphate; α-KG: α-ketoglutarate; α-KGDH: α-ketoglutarate dehydrogenase; α-KGPD: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate.

表 1 不同碳源发酵的得率比较

Table 1 Comparison of yields using different carbon sources

Carbon source	Glucose	Fructose	Xylose	Mannose
Yield(g/g)	0.884 ± 0.08	0.802 ± 0.07	0.817 ± 0.07	0.808 ± 0.08

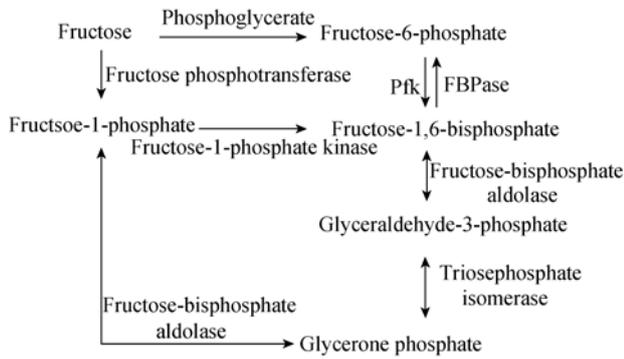


图 2 果糖在大肠杆菌中代谢示意图

Fig. 2 Fructose metabolism in *E. coli*.

用葡萄糖、果糖和木糖发酵过程中, 丙酮酸的积累都经历了以下 3 个阶段: 发酵初始较长的丙酮酸缓慢增加阶段, 随后进入丙酮酸快速积累阶段, 最后进入一个平台期。同时, 菌体生长也同样经历了 3 个阶段且时间上也具有一致性(图 3C), 这一结果说

明 *lpdA* 突变菌利用葡萄糖、果糖和木糖产丙酮酸过程为生长偶联过程。葡萄糖、果糖和木糖的发酵过程都是生长偶联过程, 但从不同的糖原发酵所需的时间及消耗速率上有较大差别(图 3B)。不同糖进入糖酵解途径的复杂程度以及该过程中限速酶的不同决定了糖的利用能力。葡萄糖消耗最为简单, 因而其发酵结束时间最早, 木糖进入糖酵解途径需要整个磷酸戊糖途径的协同作用, 最为复杂, 与发酵时间最长的结果相符。甘露糖进入糖酵解途径的过程也非常简单且不需要消耗 ATP, 因此甘露糖消耗速率在初期与葡萄糖消耗曲线几乎重叠, 后期由于葡萄糖发酵菌浓度的迅速增加使得葡萄糖消耗加快, 而甘露糖没有出现这一现象。值得注意的是, 在葡萄糖、果糖和木糖被完全消耗后, 丙酮酸并没有被作为碳源利用, 而是进入一个相对稳定期, 这就使

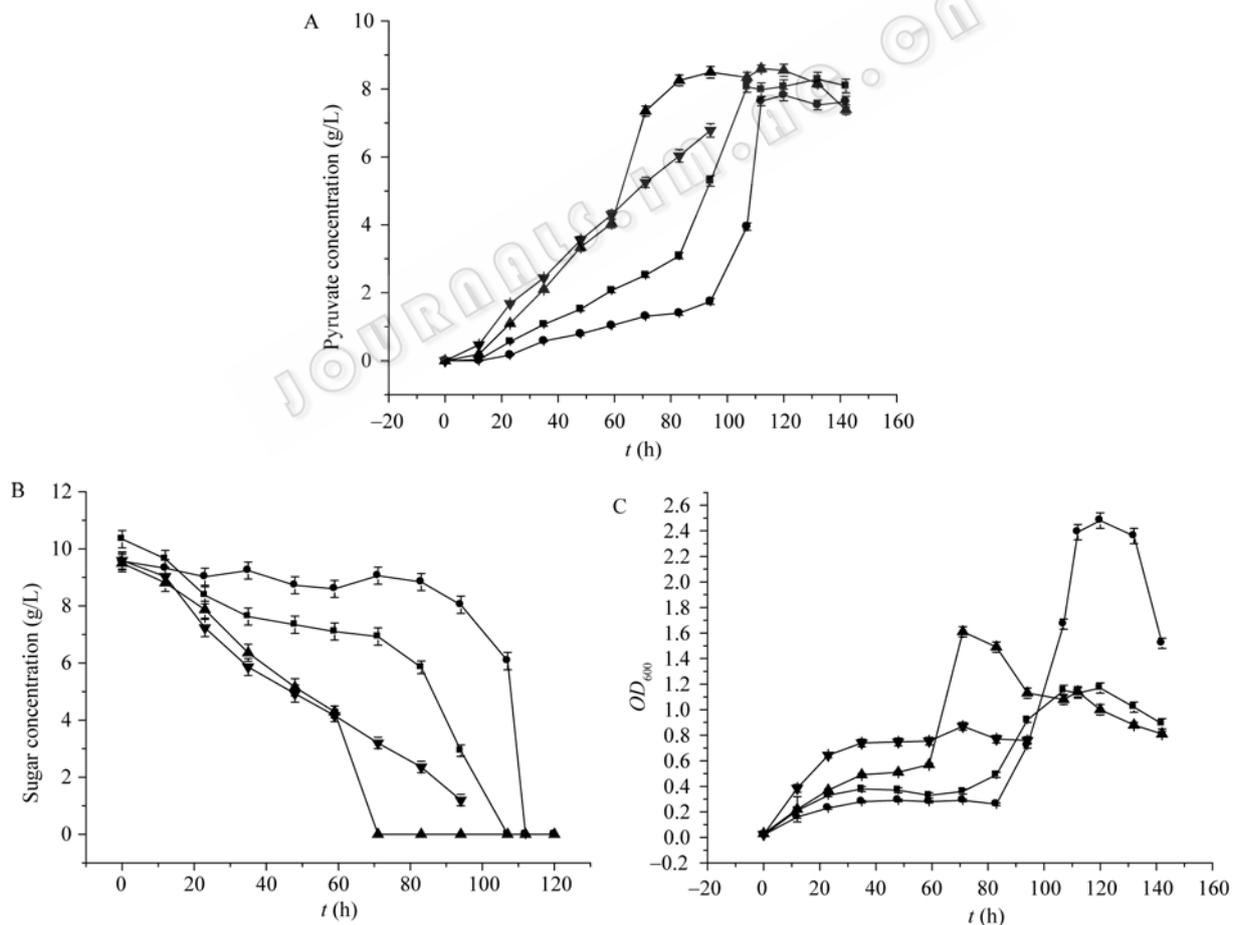


图 3 有氧发酵条件下不同糖原对发酵的影响

Fig. 3 Effect of different sugar sources on the fermentation of *lpdA* mutant under aerobic condition. (A) Pyruvate accumulation curves. (B) Sugar consumption curves. (C) Growth curves. ▲ Glucose; ■ Fructose; ● Xylose; ▼ Mannose.

得发酵生产丙酮酸的控制变得尤为简单。另外, *lpdA* 突变菌高效转化葡萄糖及木糖的能力, 一定程度上展示了其利用混合糖及纤维素降解液发酵的潜力。与以上几种糖发酵生长偶联不同的是, 甘露糖的发酵过程为部分生长偶联: 菌体浓度很快达到一个稳定期, 从甘露糖到丙酮酸的过程与酶催化转化过程相似(底物直线下降, 产物直线上升)。分析这种差别的原因可能有以下 2 个方面: 其一、甘露糖进入糖酵解途径的过程单一且不需要激酶的作用, 因而对 ATP 的需求较葡萄糖、果糖和木糖都少。在 *lpdA* 突变菌中, TCA 循环的入口(PDHc)和限速酶( $\alpha$ -KGDH)都失去了活性, TCA 循环大大削弱, 提供 ATP 的能力严重不足, 因此糖酵解过程中的能量消耗和生成都会显著地影响到菌体的发酵行为。其二、催化不同糖进入糖酵解途径的酶活性可能存在一定的差异, 造成了不同的糖消耗情况。

### 2.3 接种浓度对葡萄糖为碳源发酵的影响

然而不同糖发酵所需时间各不相同, 葡萄糖发酵所需时间最短(71 h), 甘露糖和果糖分别需要 96 h 和 107 h, 木糖发酵时间最长, 需要 112 h 丙酮酸浓度才能达到最大值。对于工业生产过程来说, 以上几个发酵周期都相对太长, 基于 *lpdA* 突变菌生产丙酮酸过程为生长偶联过程的考虑, 缩短前期菌体缓慢增长阶段所需要的时间可能可以提高发酵生产效率。因此, 考察了大接种量对葡萄糖发酵生产丙酮酸的影响。

初始  $OD_{600}$  等于 0.726 时的葡萄糖发酵情况如图 4 所示。正如预期的那样, 葡萄糖在 30 h 就被完全耗尽, 丙酮酸浓度也在此时达到最大值, 比初始  $OD_{600}$  为 0.03 时发酵时间缩短了 40 h。但是, 丙酮酸最高浓度只有 3.5 g/L, 与初始  $OD_{600}$  为 0.03 时的 8.4 g/L 相去甚远。同时, 在接种量大的时候, 丙酮酸积累没有出现一个平台期, 而是被作为碳源迅速消耗。

以上结果与 Li 等<sup>[11]</sup>报道的 *lpdA* 突变菌利用 LB 培养基加葡萄糖发酵结果非常相近: 在 LB 培养基加 10 g/L 葡萄糖发酵过程中, 菌体生长迅速, 葡萄糖被快速消耗, 丙酮酸也迅速积累至最大值 4 g/L, 之后丙酮酸被菌体作为碳源利用。

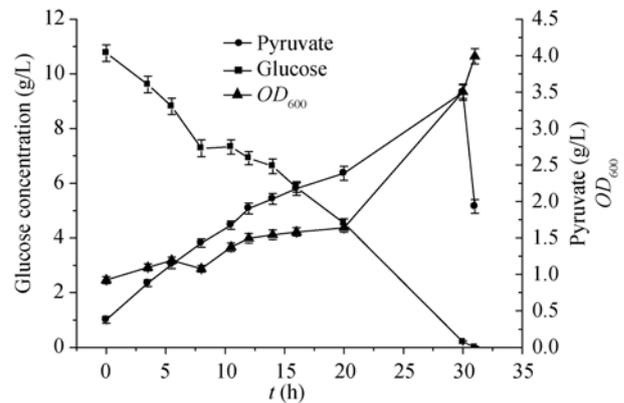


图 4 大接种量对葡萄糖发酵的影响

Fig. 4 Effect of large vaccine quantity on glucose fermentation.

通过对比发现, 接种量的大小影响到菌体的生长速率、菌体的最终浓度、丙酮酸最终浓度和丙酮酸的消耗。从图 3 可以看到, *lpdA* 突变菌在低接种量发酵过程中, 菌体也具有一个快速生长的阶段, 且在这一阶段积累了大量的丙酮酸, 这一结果表明菌体的快速生长并不会影响丙酮酸的积累。影响丙酮酸积累及消耗的因素可能是高浓度的菌体以及高浓度菌体带来的群体效应<sup>[17]</sup>。高浓度的菌体需要消耗大量的物质和能量, 进而影响到丙酮酸积累的最终浓度。群体效应(Quorum sensing)是一种日益受到关注的细菌群体交流调控机制, 细胞之间通过释放化学物质来达到相互交流的目的, 这些化学信号物质积累到一定量的时候, 细菌作为一个群体做出应答。高浓度的菌体或许就是在这种机制的调节下, 迅速消耗了前期积累的丙酮酸。高浓度的菌体在后期消耗丙酮酸的另一种可能是大肠杆菌基因表达水平在随着时间的推移<sup>[18]</sup>以及生长阶段的改变<sup>[19]</sup>而不断变化, 低接种量情况下较长时间的发酵使得大肠杆菌在基因表达水平上已经不能适应丙酮酸环境。

## 3 结论

对 *lpdA* 突变菌利用不同糖原进行分批发酵的研究结果表明, 葡萄糖、果糖、木糖和甘露糖都可以被 *lpdA* 突变菌在基本培养基中利用, 并积累大量丙酮酸, 得率分别达到了 0.884、0.802、0.817、0.808 g/g, 并且丙酮酸的积累在葡萄糖、果糖和木糖发酵过程

属于生长偶联型。甘露糖发酵产丙酮酸过程属于部分偶联型发酵。

加大接种量, 可以加速葡萄糖的消耗速率, 但是丙酮酸的积累量却显著下降。从丙酮酸的产量来看, 这一结果与日本学者 Yokota 等<sup>[12]</sup>研究大肠杆菌生产丙酮酸的结果相同。这是一个值得关注的现象, 尤其在把大肠杆菌作为模式“细胞工厂”推广到应用时, 更要考虑各种因素的影响, 譬如, 对大肠杆菌代谢调节的研究需要考虑到菌体的群体效应对细菌的调控等等, 这样才能更全面地了解细菌代谢调控特性, 以利于模式“细胞工厂”的构建和应用。

## REFERENCES

- [1] Causey TB, Shanmugam KT, Yomano LP, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(8): 2235–2240.
- [2] Tomar, Eiteman MA, Altman E. The effect of acetate pathway mutations on the production of pyruvate in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**: 76–82.
- [3] Zelić B, Gostović S, Vuorilehto K, *et al.* Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fed-batch to *in situ* product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **6**(85): 638–646.
- [4] Zelić B, Gerharz T, Bott M, *et al.* Fed-batch process for pyruvate production by recombinant *Escherichia coli* YYC202 strain. *Eng Life Sci*, 2003, **3**(7): 299–305.
- [5] Liu LM, Li Y, Li HZ, *et al.* Significant increase of glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by inhibition of oxidative phosphorylation. *FEMS Yeast Res*, 2006, **6**: 1117–1129.
- [6] Qualil MA, Haydon DJ, Guest JR. The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol*, 1994, **12**: 95–104.
- [7] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6640–6645.
- [8] Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, *et al.* Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (A complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive): unique resources for biological research. *DNA Res*, 2005, **12**: 291–299.
- [9] Baba T, Ara T, Hasegawa M, *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2006, msb410050-E1.
- [10] Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiol*, 2001, **147**: 1483–1498.
- [11] Li M, Pei Yee Ho, Yao SJ, *et al.* Effect of *lpdA* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by <sup>13</sup>C-labeling experiments. *J Biotech*, 2006, **122**: 254–266.
- [12] Yokota A, Shimizu H, Terasawa Y, *et al.* Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of *Escherichia coli* W1485. *App Microbiol Biotechnol*, 1994, **41**: 638–646.
- [13] Babul J. Phosphofructokinases from *Escherichia coli* purification and characterization of the nonallosteric isozyme. *J Biol Chem*, 1978, **253**(12): 4350–4355.
- [14] Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1993, **57**(3): 543–594.
- [15] Rosenfeld SA, Stevis PE, Ho NW. Cloning and characterization of the *xyl* genes from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1984, **194**(3): 410–415.
- [16] Inouye S, Nakazawa A, Nakazawa T. Molecular cloning of TOL genes *xylB* and *xylE* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1981, **145**(3): 1137–1143.
- [17] Surette MG, Miller MB, Bassler BL, *et al.* Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(4): 1639–1644.
- [18] Domka J, Lee J, Bansal T, *et al.* Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(2): 332–346.
- [19] Ito A, May T, Kawata K, *et al.* Significance of *rpoS* during maturation of *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol Biochem*, 2008, **99**(6): 1462–1471.