

大肠杆菌丝氨酸转运系统单基因敲除 对丝氨酸生产的影响

崔云凤¹, 石斌超¹, 李 晶², 赵志军², 史吉平², 张 霞^{1,*}

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832000;

2. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210)

摘要: 氨基酸转运系统改造是一种重要的氨基酸菌种选育方式。*sdaC*, *cycA*, *sstT* 和 *tdcC* 是目前报道的大肠杆菌中与 L-丝氨酸转运吸收相关的四个基因, 本研究以实验室前期构建的 L-丝氨酸工程菌 SWCH-05 为基础, 采用 Red 重组系统, 分别构建了 *sdaC*, *cycA*, *sstT* 和 *tdcC* 单基因敲除菌, 并通过补料分批发酵实验考察了转运吸收基因缺失对菌株产 L-丝氨酸的影响。发酵结果表明, *sdaC* 敲除菌 L-丝氨酸产量达到了 16.3 g/L, 与出发菌株相比提高了 43%, *cycA* 敲除菌 L-丝氨酸产量为 14.1 g/L, 与出发菌株相比提高了 25%, 而 *sstT* 和 *tdcC* 基因敲除菌的 L-丝氨酸产量均与对照菌相近。

关键词: 转运系统, L-丝氨酸, 大肠杆菌, 基因敲除

Effect of single-gene knockout of L-serine transport system on L-serine production in *Escherichia coli*

CUI Yun-feng¹, SHI Bin-chao¹, LI Jing², ZHAO Zhi-jun², SHI Ji-ping², ZHANG Xia^{1,*}

(1. College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. Shanghai Advanced Research Institute of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

Abstract: Transport system modification is an important method in strain improvement. It has been reported that the uptake of L-serine was regulated by four genes of *sdaC*, *cycA*, *sstT* and *tdcC* in *Escherichia coli*. In this study, the four single-gene knockout mutant strains of *sdaC*, *cycA*, *sstT* and *tdcC* were constructed, respectively. The fermentation results showed that the *sdaC* and *cycA* knockout mutants produced 16.3 g/L and 14.1 g/L L-serine, respectively, which were 43% and 25% higher than that of the control strain. However, the production of *sstT* and *tdcC* mutants were both similar to the control strain.

Key words: transport system; L-serine; *Escherichia coli*; gene knockout

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)14-0191-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.14.030

目前, L-丝氨酸(L-serine, L-Ser)已广泛应用于食品、化妆品、饲料、医药等行业^[1-2]。发酵法生产 L-Ser 具有原料廉价、易提取等优点, 其代谢工程育种研究获得了广泛关注^[3-5]。

氨基酸转运系统改造是新发展起来的一种氨基酸育种方式, 其通过提高胞内目的氨基酸的分泌速率或者降低胞外目的氨基酸的吸收速率, 可以提高菌株的氨基酸生产强度; 还可以使胞内目的氨基酸的浓度一直保持在较低水平, 进而减弱或规避各种复杂的反馈调控作用, 促进氨基酸的合成。近年来, 关于苏氨酸、赖氨酸和丙氨酸等氨基酸转运系统的研究表明, 氨基酸转运系统改造已经成为了氨基酸代谢工程策略的一种重要手段^[6-10]。

目前 L-Ser 转运系统的研究仍处于生化与分子鉴定的阶段, 但已经发现了数个与 L-Ser 转运相关的蛋白, 如: 转运蛋白 SdaC 被认为是专一性调控 L-Ser 的吸收^[11-12], 转运蛋白 CycA 同时参与调控细胞对 L-Ala、L-Gly 和 L-Ser 的吸收^[13]; 转运蛋白 SstT 同时调控 L-Thr 和 L-Ser 的吸收^[14]; 而透酶 TdcC 主要负责 L-Thr 的吸收, 但在厌氧条件下也参与 L-Ser 的吸收转运^[15-16]。此外, 对于 L-Ser 的分泌转运系统, 目前仅研究发现负责 L-Thr 分泌的转运蛋白 ThrE 同时也参与调控 L-Ser 的分泌^[17]。

本研究以实验室前期构建的 L-Ser 基因工程菌 SWCH-05 为出发菌株, 利用 Red 重组技术分别构建了 L-Ser 吸收转运蛋白编码基因 *sdaC*, *cycA*, *sstT* 和

收稿日期: 2016-01-04

作者简介: 崔云凤(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 氨基酸代谢工程, E-mail: cyfsdau@163.com。

* 通讯作者: 张霞(1964-), 女, 教授, 研究方向: 植物资源与遗传, E-mail: xiazh@shzu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31300048)。

tdcC 的单基因敲除菌,并通过发酵实验考察了 L-Ser 转运系统基因敲除对菌体生长及 L-Ser 生产的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 SWCH-01 是大肠杆菌模式菌株 *E.coli* W3110 的 *sdaA* 基因敲除菌;菌株 SWCH-05 是实验室前期诱变筛选获得的一株 *E.coli* SWCH-01 衍生菌株;质粒 pSC-05 是携带抗反馈调节基因 *serA^{fb}* (feedback inhibition-resistant) 和其它 3 个大肠杆菌丝氨酸合成途径关键酶基因 *serB*、*serC* 和 *pgk* 的低拷贝,具有 PR 和 PL 双启动子的原核表达质粒;SWCH-05/pSC-05 由实验室前期通过基因工程手段构建(数据另文发表)。敲除所需的工具质粒 pKD13, pKD46 和 pCP20 购自美国耶鲁大学大肠杆菌菌株库(*E.coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA)^[17], 本研究所用到的菌株和质粒具体见表 1; Primer STAR HS DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶(Mix) 均购自大连宝生物有限公司;DNA Ladder Mix 购自 Fementas 公司;氨苄青霉素、硫酸卡那霉素 购自上海捷倍思基因技术有限公司;质粒小量制备试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、PCR 清洁试剂盒 购自 AxyPrep 公司;L-Ser 标准品、异硫氰酸苯酯 购自 Sigma 公司;其他化学试剂 购于国药集团化学试剂有限公司;常规试剂 采用国产分析纯;引物合成和测序 由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

Gel Dox XR + 凝胶成像系统、S1000PCR 仪、电转仪 MicroPulser 美国 BIO-RAD 公司;DU730 型紫外分光光度计 德国 Beckman 公司;ZHWHY-2102C 恒温培养振荡器 上海智城仪器制造有限公司;Centrifuge5430 低温离心机 德国 Eppendorf 公司;MLS-3780 型高压蒸汽灭菌锅 日本三洋公司;高效液相色谱仪 RID-10A/SPD-20A 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 根据大肠杆菌 W3110 基因组序列,分别设计四对敲除引物 *sdaC* _p1 和 *sdaC* _p2, *cycA* _p1 和 *cycA* _p2, *sstT* _p1 和 *sstT* _p2, *tdcC* _p1 和

tdcC _p2, 其中下划线部分为目标基因上下游各 50 bp 的同源臂序列,以质粒 pKD13 DNA 为模板,分别扩增 1403 bp 目标基因打靶 DNA 片段。选取大肠杆菌 W3110 基因组中目标基因上游和下游的某段 DNA 序列作为鉴定目标基因敲除的引物。引物 k1 和 k2 分别为质粒 pKD13 中 Kan 基因内部序列。本研究所用引物的 DNA 序列如表 2 所示。

1.2.2 大肠杆菌基因的敲除 采用 Red 同源重组的方法分别敲除 *sdaC*、*cycA*、*sstT* 和 *tdcC* 四个基因,具体操作方法参照文献[19]。

1.2.3 培养基的配制 种子培养基为 LB 培养基: 10 g/L Typtone, 5 g/L Yeast extract, 10 g/L NaCl。发酵培养基组分包括: 3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.017 g/L CaCl₂·2H₂O, 8 g/L 葡萄糖和 3 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NaCl, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.07 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.11 g/L 柠檬酸钠, 0.2 g/L 酵母膏, 1.5 mL/L 微量元素液 1000×母液(7 g/L CoCl₂·6H₂O, 2.5 g/L CuSO₄·5H₂O, 25 g/L H₃BO₃, 16 g/L MnCl₂·4H₂O, 1.5 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 3 g/L ZnSO₄·7H₂O)。

1.2.4 发酵培养 种子培养: 挑取单菌落至装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃, 200 r/min 培养 8~10 h。发酵罐发酵培养: 以 10% (v/v) 的比例转接种子培养液至装有 2.5 L 发酵罐培养基中发酵。发酵初始温度为 35℃, 当菌体生长至对数生长期前期时, 升温至 38℃ 开始诱导培养产 L-Ser。当发酵液中初始葡萄糖基本耗尽时, 开始流加 600 g/L 的葡萄糖溶液, 并调控流速使发酵液中的葡萄糖浓度小于 5 g/L。发酵过程中, 通过流加浓氨水使培养基 pH 保持在 pH6.8~7.0。

1.2.5 测定方法 发酵液中的菌体密度以 600 nm 波长下分光光度计检测的吸光值 OD_{600nm} 表示, 细胞干重根据前期构建的经验公式获得(1 OD = 0.492 g/L CDW)。

发酵液中的葡萄糖浓度采用高效液相色谱测定^[20]。

本研究采用高效液相色谱异硫氰酸苯酯(PITC)

表 1 实验用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the experiment

菌株和质粒	相关特性	来源
<i>E.coli</i>		
SWCH-01	W3110($\Delta sdaA$)	Stock in lab
SWCH-05	SWCH-01 derivative	Stock in lab
SWCH-51	SWCH-05($\Delta sdaC$)	This study
SWCH-52	SWCH-05($\Delta cycA$)	This study
SWCH-53	SWCH-05($\Delta sstT$)	This study
SWCH-54	SWCH-05($\Delta tdcC$)	This study
Plasmid		
pSC	p15A replicon, Kan marker, lambda PR and PL promoter	[19]
pSC-05	pSC derivative, carrying <i>serA^{fb}</i> , <i>serB</i> , <i>serC</i> and <i>pgk</i>	Stock in lab
pKD13	Amp and Kan markers	[18]
pKD46	Amp marker, helper plasmid	[18]
pCP20	Amp and Chl markers, helper plasmid	[18]

表2 本研究使用的引物
Table 2 Primers used in the experiment

基因	引物	序列(5'-3')
<i>sdaC</i>	<i>sdaC</i> _p1	<u>GGCTGAACTGGCTAAAAGCTGAATTATTTGCATTCTCCAGGAGAAATAGATTCCGGGGATCCGTCGACC</u>
	<i>sdaC</i> _p2	<u>ACATCGCGTTAAAACGGAGGAAGCGCCGCCGAAAGCGGGCGGAAAAGGACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>
	<i>sdaC</i> _v1	GAAGTCGGTATTTCGCGCCATTGAAGAG
	<i>sdaC</i> _v2	GATCGGCTGCTGAACTGTACGGATAAG
<i>cycA</i>	<i>cycA</i> _p1	<u>GGCTGAAACGGTGAGTGGTTTCGCGTACCACCATTGCATCAACATCCAGCATTCGGGGATCCGTCGACC</u>
	<i>cycA</i> _p2	<u>TATAGCCCTGCCCTGCCATACCGGCATGATGTGCGCGGCATCGCCCGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>
	<i>cycA</i> _v1	ATAGCACCGAATCTGGCCTGCAATT
	<i>cycA</i> _v2	CTGGATGTTGAGGTCATTGAAGCTGAAC
<i>sstT</i>	<i>sstT</i> _p1	<u>TCGACAGAACGCACCAGGGATGTGCGACAACACAATGAAAGG ATCGAAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC</u>
	<i>sstT</i> _p2	<u>GTTTAAAGTTGAGAAAACCCCTTCGCGCTAGACGAAAAGGGTTAAACAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>
	<i>sstT</i> _v1	CTGGTGTTFATCGGTATCAAGATGCTG
	<i>sstT</i> _v2	CTGGAAGAATTTATCGACACCATCGTTGAG
<i>tdcC</i>	<i>tdcC</i> _p1	<u>CCAAAACAACCGGAAATTCATTCATCTCTTTTCTCATCCTGAGTTACGGAATTCCGGGGATCCGTCGACC</u>
	<i>tdcC</i> _p2	<u>CTCAAATCACCAGTTTCGTTGACGCTTAATTAATTCGTTGAGGATAGGATTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>
	<i>tdcC</i> _v1	GTCATCTTCGCCAGATTCAGCAGC
	<i>tdcC</i> _v2	CAAAGTAGCGCAACGTGCGACTAC
	K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
	K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC

注:下划线部分为目标基因上下游各 50 bp 的同源臂序列。

柱前衍生法检测发酵液中 L-丝氨酸的含量,具体衍生方法参照文献[21]。

分析条件:发酵液中的 L-Ser 浓度通过岛津 LC-20A测定。采用的色谱柱为:Agilent Extend C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。流动相为:(A) 0.05 mol/L 乙酸钠(pH 为 6.50 ± 0.05)和(B)甲醇:乙腈:水(20:60:20),流速为 1 mL/min。梯度洗脱程序为:0~12 min,流动相(B)浓度保持 7%;12~13 min 流动相(B)浓度由 7%升至 100%;流动相(B)浓度保持 100%至 18 min,18~19 min 流动相(B)浓度由 100%降至 7%,19~25 min 流动相(B)浓度保持 7%,回到初始条件。使用紫外检测器检测标样及样品中 L-Ser 在 254 nm 的吸收峰值,进样体积 10 μL,柱温 45 °C。

1.2.6 数据处理方法 每个实验重复三次,实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析,采用 Origin 7.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 *sdaC*, *cycA*, *sstT*, *tdcC* 单基因敲除菌的构建

将 *E.coli* SWCH-05 作为研究对象,在其基因组上分别敲除 L-Ser 转运吸收基因 *sdaC*, *cycA*, *sstT* 和 *tdcC*。以质粒 pKD13 DNA 为模板,通过引物 *sdaC*_p1 和 *sdaC*_p2 扩增得到打靶 PCR 片段 *sdaC*^{Δ50}-Kan-*sdaC*^{Δ50},将 PCR 片段转化至 *E.coli* SWCH-05/pKD46 的感受态细胞中,同源重组后在 Kan 抗性平板上初步筛选基因 *sdaC* 的敲除突变株。分别通过两对引物 *sdaC*_v1 和 k1, k2 和 *sdaC*_v2 对 *sdaC* 敲除突变菌进行菌落 PCR 鉴定。依据敲除原理,当 *sdaC* 基因敲除后,其基因组经 PCR 扩增后可分别获得 1218 bp 和 1299 bp 的 PCR 片段。DNA 凝胶电泳的结果与理论

值大小相符,表明基因 *sdaC* 已经被 Kan 基因所置换(图 1a,泳道 1~2)。基因 *cycA*, *sstT* 和 *tdcC* 的敲除方法与 *sdaC* 类同,分别通过其相应的两对鉴定引物进行菌落 PCR 鉴定后,发现其各自 DNA 凝胶电泳的结果与理论值大小相符,表明基因 *cycA*, *sstT* 和 *tdcC* 已分别被 Kan 基因所置换(图 1b, c, d 的泳道 1~2)。

将质粒 pCP20 转化至 *sdaC* 基因被 Kan 置换的菌株中,诱导 FLP 重组酶表达,消除其 Kan 抗性基因,利用引物 *sdaC*_v1 和 *sdaC*_v2 进行菌落 PCR 根据序列分析,Kan 基因消除后,PCR 扩增应获得 1406 bp 的 DNA 片段。DNA 凝胶电泳的结果与理论值相符(图 1a,泳道 3)。将 PCR 片段胶回收后连接至 pMD19-T 载体后送测序,测序结果表明 *sdaC* 基因敲除正确,命名 *sdaC* 敲除菌为 SWCH-51。利用同样的方法消除 *cycA*, *sstT* 和 *tdcC* 三个基因敲除菌中的 Kan 抗性基因,菌落 PCR 鉴定后, DNA 凝胶电泳的结果与理论值大小相符(图 1b, c, d 的泳道 3)。经测序证明 *cycA*, *sstT* 和 *tdcC* 基因敲除均正确,分别命名三个基因敲除菌为 SWCH-52、SWCH-53、SWCH-54。

2.2 L-丝氨酸基因工程菌的构建

将携带 L-丝氨酸合成途径关键酶基因的质粒 pSC-05 分别转化至大肠杆菌 L-丝氨酸吸收系统基因敲除菌 SWCH-51、SWCH-52、SWCH-53 和 SWCH-54 中构建 L-丝氨酸基因工程菌 SWCH-51/pSC-05、SWCH-52/pSC-05、SWCH-53/pSC-05、SWCH-54/pSC-05。

2.3 L-丝氨酸基因工程菌的补料分批发酵

为了考察 L-Ser 吸收系统基因敲除对菌体发酵产 L-Ser 的影响,在 5 L 发酵罐中分别对对照菌 SWCH-05/pSC-05 及构建的基因工程菌 SWCH-51/

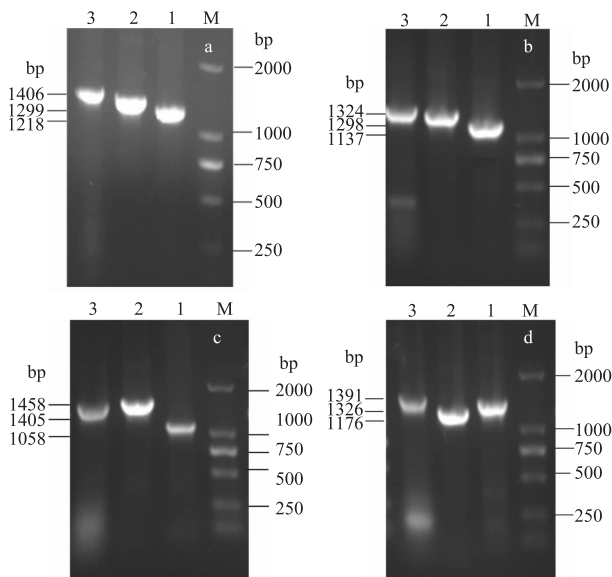


图1 大肠杆菌 *sdaC*、*cycA*、*sstT*、*tdcC* 基因敲除的 PCR 分析

Fig.1 Identification of the *sdaC*、*cycA*、*sstT*、*tdcC* knockout strain by PCR

注: M: Marker; (a) Lane 1: *sdaC*_v1→k1; Lane 2: k2→*sdaC*_v2; Lane3: *sdaC*_v1→*sdaC*_v2; (b) Lane 1: *cycA*_v1→k1; Lane2: k2→*cycA*_v2; Lane3: *cycA*_v1→*cycA*_v2; (c) Lane1: *sstT*_v1→k1; Lane2: k2→*sstT*_v2; Lane3: *sstT*_v1→*sstT*_v2; (d) Lane1: *tdcC*_v1→k1; Lane 2: k2→*tdcC*_v2; Lane3: *tdcC*_v1→*tdcC*_v2。

pSC-05、SWCH-52/pSC-05、SWCH-53/pSC-05 和 SWCH-54/pSC-05 进行了补料分批发酵。结果表明:与对照菌相比(图2),当敲除基因 *sdaC*、*sstT* 或 *tdcC* 时,菌体的生长未受到明显的影响;但当敲除基因 *cycA* 时,菌体的最高 OD_{600 nm} 达到 58,与对照菌相比提高了 28%,改善了菌体的生长情况(图3b)。这是因为 SdaC、CycA、SstT 和 TdcC 四个转运蛋白同时控制着 L-Ser 以及 L-Thr 和 L-Ala 等几种氨基酸的吸收,而氨基酸是菌体组成的基本单位,因此其基因的敲除必然会不同程度地影响菌体的生长。

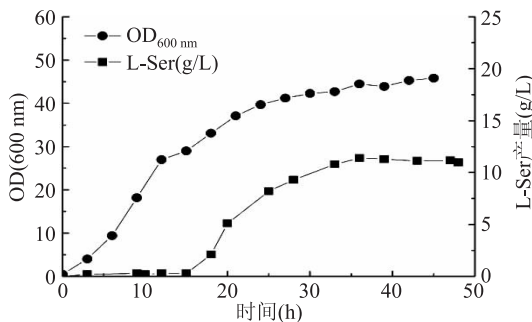


图2 菌株 SWCH-05/pSC-05 的补料分批发酵

Fig.2 Fed-batch fermentation of *E. coli* SWCH-05/pSC-05

在 L-Ser 生产方面,当敲除 *sstT* 或 *tdcC* 时,菌株发酵的 L-Ser 产量分别为 12.2 g/L 和 11.6 g/L,与对照菌 11.3 g/L 相近;当敲除基因 *cycA* 时,L-Ser 产量为 14.1 g/L,与对照菌相比提高了 25%;当敲除基因 *sdaC* 时,L-Ser 产量提高至 16.3 g/L,与对照菌相比

提高了 43%(图3a)。这可能是由于 *SdaC* 专一性调控 L-Ser 吸收,而其他三个转运蛋白同时调控着 2~3 种氨基酸的吸收,因此 *sdaC* 基因的敲除对菌株产 L-Ser 的影响更大。

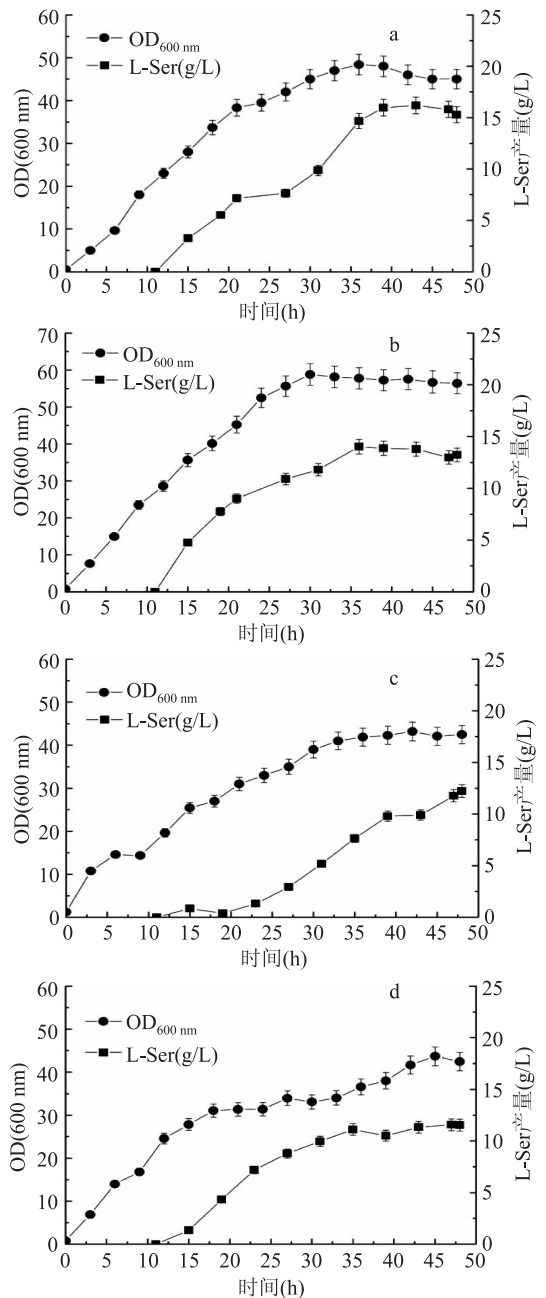


图3 菌株 BJ-02/pSC-05 的补料分批发酵

Fig.3 Fed-batch fermentation of *E. coli*

SWCH-51/pSC-05(a)、SWCH-52/pSC-05(b)、SWCH-53/pSC-05(c)、SWCH-54 pSC-05(d)

3 结论

本文首次考察了与 L-Ser 吸收相关的 4 个基因 *sdaC*、*cycA*、*sstT* 和 *tdcC* 的缺失突变对菌株发酵产 L-Ser 的影响。结果表明 *sdaC* 的敲除可以明显促进菌体积累 L-Ser;*cycA* 的敲除对菌体积累 L-Ser 的影响次之;而其它两个基因的敲除对 L-Ser 的产量基本没有影响。这为进一步考察 L-Ser 吸收转运系统的多基因缺失突变对菌体积累 L-Ser 的影响奠定了

基础。

本研究初步考察 L-Ser 转运系统基因敲除对菌株积累 L-Ser 的影响,未来仍可从以下几个方面进行深入的研究:a.L-Ser 转运基因的鉴定。本研究涉及的 *sdaC* 等四个基因主要是依据其生理生化特征发现与 L-Ser 转运相关,仍缺乏分子层次上的鉴定;此外仍需探索是否存在其它尚未鉴定的 L-Ser 转运系统基因。b.L-Ser 转运系统作用机制的研究。有些 L-Ser 转运系统蛋白同时调控几个氨基酸的吸收或分泌,作为菌体细胞基本单位的氨基酸必然会影响到菌体的正常生理代谢活动,这种情况下除考察其对 L-Ser 积累的影响外,还应该考察其对其它氨基酸转运的影响,进而探究菌体生理代谢活动的变化机制。c.L-Ser 转运蛋白间的协同效应。本研究考察了 *sdaC* 等四个转运蛋白的单基因缺失对菌株积累 L-Ser 的影响,仍可以通过构建其多基因敲除菌考察上述四个基因之间的协同效应。

参考文献

- [1] 刘岩,王慧,史吉平,等.微生物法生产 L-丝氨酸代谢工程研究进展[J].生物技术通报,2015,31(8):44-49.
- [2] 周芳,李洪军,杨复习,等.磷脂酰丝氨酸研究进展[J].食品工业科技,2008(5):297-300.
- [3] Gu P, Yang F, Su T, et al. Construction of an L-serine producing *Escherichia coli* via metabolic engineering[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(9): 1443-1450.
- [4] Xu G, Jin X, Guo W, et al. Characterization, modification, and overexpression of 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* for enhancing L-serine production[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 65(2): 929-935.
- [5] 贾慧慧,李晓静,陈涛,等.微生物发酵法生产 L-丝氨酸及 L-半胱氨酸研究进展[J].中国生物工程杂志,2014,34(5):100-106.
- [6] 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.
- [7] 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): 149.
- [8] Vrljic M, Sahn H, Eggeling L. A new type of transporter with a new type of cellular function: l-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 22(5): 815-826.
- [9] Hori H, Yoneyama H, Tobe R, et al. Inducible L-alanine exporter encoded by the novel gene *ygaW* (*alaE*) in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(12): 4027-4034.
- [10] 赵志军,陈晟,吴丹,等.大肠杆菌色氨酸转运系统单基因敲除对色氨酸生产的影响[J].生物工程学报,2011,27(12):1765-1772.
- [11] Shao Z Q, Lin R T, Newman E B. Sequencing and characterization of the *sdaC* gene and identification of the *sdaCB* operon in *Escherichia coli* K12[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 222(3): 901-907.
- [12] Hsieh J M, Besserer G M, Madej M G, et al. Bridging the gap: A GFP-based strategy for overexpression and purification of membrane proteins with intra and extracellular C-termini[J]. *Protein Science*, 2010, 19(4): 868-880.
- [13] Schneider F, Krämer R, Burkovski A. Identification and characterization of the main β -alanine uptake system in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(5): 576-582.
- [14] Kim Y M, Ogawa W, Tamai E, et al. Purification, reconstitution, and characterization of Na⁺/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biochemistry*, 2002, 132(1): 71-76.
- [15] Ogawa W, Kayahara T, Tsuda M, et al. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking the major serine transporter, and cloning of a serine transporter gene[J]. *Journal of Biochemistry*, 1997, 122(6): 1241-1245.
- [16] Na D, Park J H, Jang Y S, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for chemicals, materials, biofuels, and pharmaceuticals[M]. *Systems Metabolic Engineering*. Springer Netherlands, 2012: 117-149.
- [17] Simic P, Sahn H, Eggeling L. L-Threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18): 5317-5324.
- [18] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2(1): 1-11.
- [19] Zhao Z J, Zou C, Zhu Y X, et al. Development of L-tryptophan production strains by defined genetic modification in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(12): 1921-1929.
- [20] Wang D, Zhou J, Chen C, et al. R-acetoin accumulation and dissimilation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42(8): 1105-1115.
- [21] 杨智,阳利龙,祝文兵,等.异硫氰酸苯酯柱衍生化 RP-HPLC法测定人血浆中 10 种氨基酸的浓度[J].中国临床药理学与治疗学,2011,16(5):549-552.

一套《食品工业科技》在手，
纵观食品工业发展全貌