

高产 *L*-丙氨酸大肠杆菌细胞工厂的构建与发酵优化

聂玉朋¹, 郭亮², 刘立明², 刘佳², 徐慧¹, 姜国政³, 田延军^{1*}

(¹ 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省食品发酵工业研究设计院 济南 250014

² 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏无锡 214122

³ 烟台恒源生物股份有限公司 山东烟台 265709)

摘要 *L*-丙氨酸作为最小的手性化合物之一,被广泛应用于食品、医药和日化领域。目前,微生物法生产 *L*-丙氨酸存在发酵周期长,生产强度低等问题。为此,通过强化前体供给、启动子工程和转运工程等代谢工程策略,构建高产 *L*-丙氨酸的大肠杆菌细胞工厂。进一步通过生化工程策略优化 *L*-丙氨酸生产工艺,提高 *L*-丙氨酸大肠杆菌细胞工厂的生产性能。结果:过表达 *gapA* (3-磷酸甘油醛脱氢酶基因)强化前体丙酮酸供给,使 *L*-丙氨酸产量和转化率分别提高了 5.1%和 15.6%。启动子工程优化 *gapA* 表达,使 *L*-丙氨酸产量和转化率进一步提高到 18.3 g/L 和 0.55 g/g。过表达 *L*-丙氨酸外运蛋白(*AlaE*),增加 *L*-丙氨酸转运,使 *L*-丙氨酸产量提高到 20.4 g/L。生化工程策略优化培养基组分,得到最佳碳源为葡萄糖 40 g/L,最佳氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g/L。最佳发酵条件为:接种量 15%,10 h 转厌氧发酵和变速补料发酵。5 L 发酵罐发酵 36 h,大肠杆菌菌株 W-135 *L*-丙氨酸产量为 127.2 g/L,转化率为 0.83 g/g,生产强度为 3.53 g/L/h,比优化前分别提高了 64.3%,50.9%和 64.2%。本研究利用系统代谢工程和生化工程策略,构建了发酵周期短和发酵工艺简单的 *L*-丙氨酸高产菌株,为 *L*-丙氨酸的工业化生产提供了理论基础。

关键词 *L*-丙氨酸; 大肠杆菌; 代谢工程; 外排; 生化工程

文章编号 1009-7848(2024)06-0057-17 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.06.006

L-丙氨酸是最小的手性化合物之一,是美国食品和药品管理局批准的食品添加剂和营养补充剂,被广泛应用于食品、医药和日化领域^[1-3]。目前,利用工业生物技术生产 *L*-丙氨酸的方法主要为酶法^[4]和发酵法^[5]。由于酶法所用原料 *L*-天冬氨酸价格高,增加了 *L*-丙氨酸生产成本;发酵法使用可再生和廉价的葡萄糖作为原料,生产成本低,更适用于工业化生产^[6]。随着合成生物学的快速发展,微生物细胞工厂为氨基酸生产提供了重要策略^[7]。构建高产 *L*-丙氨酸的微生物细胞工厂,是提高 *L*-丙氨酸产量和进一步降低 *L*-丙氨酸生产成本的有效途径。

目前研究较多的产 *L*-丙氨酸的菌株有:氧化节杆菌^[8]、球形芽孢杆菌^[9]、梭状芽孢杆菌^[10]、重组谷氨酸棒状杆菌^[11-12]、重组大肠杆菌^[13]、重组乳酸乳球菌^[14]和运动发酵单胞菌^[15]。由于大肠杆菌具有遗传背景清晰,易于基因工程操作,培养基成分简

单等优点,已成为生产 *L*-丙氨酸的主要菌株^[16]。为构建合成 *L*-丙氨酸的大肠杆菌细胞工厂,在大肠杆菌中表达嗜热脂肪地芽孢杆菌来源的丙氨酸脱氢酶基因(*alaD*),构建大肠杆菌菌株 XZ132,可将糖酵解终产物丙酮酸转化为 *L*-丙氨酸,使 *L*-丙氨酸产量增加到 113.9 g/L^[7]。为解决 *L*-丙氨酸抑制菌体生长的问题,科研人员利用温度调节基因开关($\lambda pR-pL$),动态调控大肠杆菌菌体生长和 *L*-丙氨酸合成,使 *L*-丙氨酸产量增加到 67.2 g/L^[18]。此外,Smith 等^[9]将 *L*-丙氨酸发酵过程分为有氧和厌氧两阶段发酵,使 *L*-丙氨酸产量增加到 88 g/L,同时厌氧发酵减少能耗,降低了 *L*-丙氨酸的生产成本。

上述研究可为后续构建 *L*-丙氨酸微生物细胞工厂提供参考,然而,仍存在发酵周期长,产量低和生产成本高等问题。为解决上述问题,本研究以产 *L*-丙氨酸的工程菌株大肠杆菌 W-126 为研究对象,精细化调控 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*gapA*)表达,强化 *L*-丙氨酸前体供给;过表达 *L*-丙氨酸外运蛋白基因(*alaE*),促进 *L*-丙氨酸外排,获得工程菌株大肠杆菌 W-135。在此基础上,进一

收稿日期: 2023-06-20

基金项目: 泰山产业领军人才专项(鲁政办字<2019>190号)

第一作者: 聂玉朋,男,硕士生

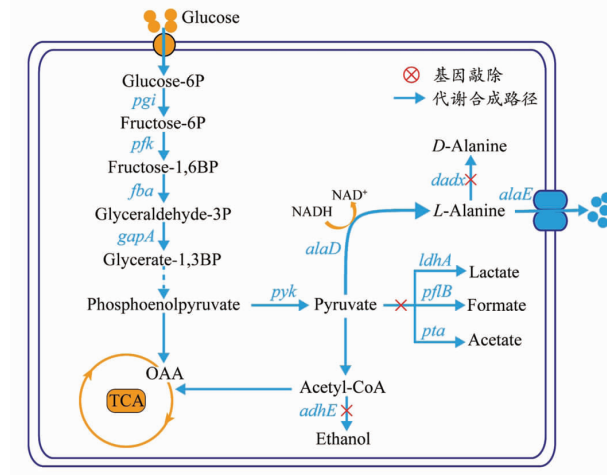
通信作者: 田延军 E-mail: tianyj16@163.com

步利用生化工程策略优化菌株大肠杆菌 W-135 发酵工艺,提高了 L-丙氨酸产量和转化率,为产 L-丙氨酸大肠杆菌的工业应用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒 本研究使用的菌株和质粒见表 1。其中,工程菌株大肠杆菌 W-126($\Delta adhE$, Δpta , $\Delta ldhA$, $\Delta pflB$, $\Delta dadx:alaD$)为 L-丙氨酸生产菌株,出发菌株为大肠杆菌 W3110,经过多轮诱变筛选和基因工程手段构建而成。大肠杆菌 JM109 用于重组质粒构建。



注: *pgi*: 磷酸己糖异构酶基因; *pfk*: 6-磷酸果糖激酶基因; *fba*: 果糖二磷酸醛缩酶基因; *gapA*: 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因; *pyk*: 丙酮酸激酶基因; *alaD*: 丙氨酸脱氢酶基因; *alaE*: L-丙氨酸外运蛋白基因; *adhE*: 乙醇脱氢酶基因; *ldhA*: 乳酸脱氢酶基因; *pflB*: 丙酮酸甲酸裂解酶基因; *pta*: 磷酸转乙酰基酶基因; *dadx*: 丙氨酸消旋酶基因。

图 1 大肠杆菌中 L-丙氨酸合成路径

Fig.1 Synthesis pathway of L-alanine in *Escherichia coli*

表 1 本研究所使用的菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

名称	相关特性	来源
质粒		
pTET	p15A ori, Cm ^r , P _{tac}	本研究构建
pTET- <i>gapA</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{tac} , <i>gapA</i>	本研究构建
pTET- <i>fba</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{tac} , <i>fba</i>	本研究构建
pTET- <i>pfk</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{tac} , <i>pfk</i>	本研究构建
pTET- <i>pyk</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{tac} , <i>pyk</i>	本研究构建
pTET- <i>pgi</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{tac} , <i>pgi</i>	本研究构建
P _{J23101} - <i>gapA</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{J23101} , <i>gapA</i>	本研究构建
P _{J23105} - <i>gapA</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{J23105} , <i>gapA</i>	本研究构建
P _{J23114} - <i>gapA</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{J23114} , <i>gapA</i>	本研究构建
pTET- <i>alaE</i>	p15A ori, Cm ^r , P _{J23105} , <i>gapA</i> , P _{tac} , <i>alaE</i>	本研究构建
菌株		
大肠杆菌 JM109	General cloning host	本研究室
大肠杆菌 W-126	L-Alanine producing strain	本研究室
大肠杆菌 W-127	大肠杆菌 W-126 (pTET- <i>pgi</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-128	大肠杆菌 W-126 (pTET- <i>pfk</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-129	大肠杆菌 W-126 (pTET- <i>pyk</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-130	大肠杆菌 W-126 (pTET- <i>gapA</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-131	大肠杆菌 W-126 (pTET- <i>fba</i>)	本研究构建

(续表 1)

名称	相关特性	来源
大肠杆菌 W-132	大肠杆菌 W-126 (P _{J23101} - <i>gapA</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-133	大肠杆菌 W-126 (P _{J23105} - <i>gapA</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-134	大肠杆菌 W-126 (P _{J23114} - <i>gapA</i>)	本研究构建
大肠杆菌 W-135	大肠杆菌 W-126 (pTET- <i>alaE</i>)	本研究构建

1.1.2 试剂与培养基 限制性内切酶、Prime Star 高保真酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker, 大连宝生物工程公司; ClonExpress II One step cloning kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒、氨苄青霉素、氯霉素, 上海生工生物工程技术有限公司; 丙酮酸、乙酸, Sigma 公司; *L*-丙氨酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 酵母浸粉, 安琪酵母有限公司; 酵母粉、蛋白胨, Oxoid 公司; 葡萄糖, 西王集团有限公司; PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成; 其它试剂来自国药集团化学试剂有限公司。

Luria-Bertan (LB) 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 值自然, 121 °C 灭菌 20 min (固体培养基另外添加 20 g/L 琼脂粉)。

摇瓶种子培养基: 葡萄糖 5 g/L, 胰蛋白胨 15 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min, 葡萄糖 115 °C 灭菌 15 min。

摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 50 g/L, NH₄Cl 20

g/L, Na₂HPO₄ 5 g/L, NaH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄ 1 g/L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min, 葡萄糖 115 °C 灭菌 15 min。

发酵培养基: 葡萄糖 40 g/L, (NH₄)₂SO₄ 25 g/L, Na₂HPO₄ 5 g/L, NaH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄ 1 g/L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min, 葡萄糖 115 °C 灭菌 15 min。

补料培养基: 葡萄糖 800 g/L, 115 °C 灭菌 15 min。

1.2 仪器与设备

PCR 仪、凝胶成像仪、核酸电泳仪, 美国伯乐 (Bio-Rad) 公司; U3000 高效液相色谱仪, 美国赛默飞公司; UVmini-1240 分光光度计, 日本岛津公司; BIOTECH-5BG 型 5 L 全自动搅拌式发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; M-100 生物分析仪, 深圳西尔曼科技有限公司; 立式自动压力蒸汽灭菌器, 上海博讯事业有限公司; 恒温调速摇床, 上海知楚仪器有限公司; 超声波细胞破碎仪, 南京先欧仪器制造公司。

1.3 方法

1.3.1 载体与引物

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列 (5'→3')
tac-F	GGTACCTTTCTCCTCTTTGGATC
tac-R	GAATTCGAGCTCCGTCGACAAG
pgi-F	CCAAAGAGGAGAAAGGTACCATGAAAAACATCAATCCAACGCAGACC
pgi-R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTAACCGCGCCACGCTTTATAG
pfk-F	CCAAAGAGGAGAAAGGTACCATGATTAAGAAAATCGGTGTGTTGACAAGC
pfk-R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTAATACAGTTTTTTTCGCGCAGTCCAG
gapA-F	CCAAAGAGGAGAAAGGTACCATGACTATCAAAAGTAGGTATCAACGGTTTTTGG
gapA-R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTATTGAGATGTGAGCGATCAGGTC
fba-F	CCAAAGAGGAGAAAGGTACCATGACAGATATTGCCAGTTGCTT
fba-R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTCAGGCAATAGTAATTTTGCTATCGAGATAAACG
pyk-F	CCAAAGAGGAGAAAGGTACCATGAAAAAGACCAAAATTGTTTGCACCAT
pyk-R	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTTACAGGACGTGAACAGATGCGG
alaE-Z-F	TCTTTGGATCCCATTATACGAGCCGATGATTAATTGTCAAGAGTCCGGCCCAAGCTTGT

(续表 2)

引物	序列(5'→3')
alaE-Z-R	GAGTAAGGATCTCCAGGCATCAAAT
alaE-F	TCGTATAATGGGATCCAAAGAGGAGAAAGGTACCATGTTCTCACCGCAGTCACG
alaE-R	GATGCCTGGAGATCCTTACTCTCAGGCTTTTACCTGCTGGT
J101-F	TAATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTAATAATTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGT
J101-R	CTAGCTCAGTCCTAGGTATTATGCTAGCGGATCCAAAGAGGAGAAAGGTACCATG
J105-F	CTAGCTCAGTCCTAGGTACTATGCTAGCGGATCCAAAGAGGAGAAAGGTACCATG
J105-R	ATAGTACCTAGGACTGAGCTAGCCGTAAATTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGT
J114-F	CTAGCTCAGTCCTAGGTACAATGCTAGCGGATCCAAAGAGGAGAAAGGTACCATG
J114-R	ATTGTACCTAGGACTGAGCTAGCCATAAATTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGT

1.3.2 质粒及重组菌株的构建 利用同源重组进行基因整合。以 *gapA* 过表达为例,以 pTET 质粒为模板,tac-R/tac-F 为引物,聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)扩增线性载体,PCR 条件:94 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 10 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 000 bp/min,72 °C 终延伸 5 min,4 °C 保存 10 min,切胶回收后获得线性化载体片段。以大肠杆菌 W-126 基因组为模板,同源臂引物 gapA-F/gapA-R PCR 扩增 *gapA* 基因,胶回收后获得目的基因产物。将线性化载体片段和目的基因片段利用同源重组酶进行连接,37 °C 反应 30 min,立即于冰上冷却,将 100 μ L 的 JM109 感受态细胞置于冰上解冻,取 10 μ L 重组产物反应液加入感受态细胞中,缓慢吹打混匀,冰上预冷 30 min,42 °C 热激 90 s 后立即冰上孵育 10 min,添加 900 μ L LB 培养基,37 °C、200 r/min 振荡培养 1 h 后离心去上清液,剩余菌液涂布于含 30 μ g/mL 氯霉素抗生素平板上进行修复培养,菌落 PCR 验证成功后,挑取单菌落送于天霖生物科技(无锡)有限公司测序。测序成功后得到质粒 pTET-*gapA*,将质粒 pTET-*gapA* 化转入大肠杆菌 W126 感受态细胞中,得到重组大肠杆菌 W-130。

1.3.3 启动子替换 分别以 J101-F/J101-R, J105-F/J105-R, J114-F/J114-R 为引物,pTET-*gapA* 质粒为模板,全质粒 PCR 替换 P_{lac} 启动子,胶回收得到目的片段,同源重组使目的片段自连,将质粒导入 JM109 感受态细胞中,挑选氯霉素抗生素平板长出的单菌落送测序,测序成功后得到质粒 $P_{J23101-gapA}$ 、 $P_{J23105-gapA}$ 和 $P_{J23114-gapA}$,将质粒化转入大肠杆菌 W126 感受态细胞中,得到菌株大肠杆菌 W-132、大肠杆菌 W-133 和大肠杆菌 W-134。

1.3.4 菌株活化 平板培养:取保存于-80 °C 装有菌液的甘油管,用接种环取菌液三区划线于 LB 固体培养基中,在培养箱中 37 °C 倒置培养 24 h。

斜面培养:用接种环挑取单菌落,划线于 LB 斜面培养基中,在培养箱中 37 °C 培养 24 h。

1.3.5 种子液的制备 一级种子培养方法:从斜面刮取一环菌体接种于 50 mL/500 mL 装液量的种子培养基中,37 °C、200 r/min 培养 12 h。

二级种子培养方法:将一级种子液按照 10% 接种量接种于 50 mL/500 mL 装液量的种子培养基中,37 °C、200 r/min 培养 8 h。

1.3.6 摇瓶发酵方法 以 10% 的接种量接种于 50 mL/500 mL 装液量的摇瓶发酵培养基中,37 °C、200 r/min 发酵 48 h。

1.3.7 发酵罐发酵方法 5 L 发酵罐培养方法:5 L 发酵罐装液量为 2 L,将二级种子液以 10% 接种量转接至液体发酵培养基中,整个发酵过程控制温度为 37 °C,使用氨水自动控制 pH=7.0,发酵初糖质量浓度为 40 g/L,当残糖质量浓度降至 20 g/L,一次性补加 40 g/L 的葡萄糖。有氧发酵过程:5 L 发酵罐通气量为 3~7 L/min、搅拌速率为 500~700 r/min,控制溶氧在 20%~40%。厌氧发酵过程:发酵至 6 h,停止通气,将转速降至 200 r/min,转为厌氧发酵,发酵至 36 h 结束。

1.4 分析检测方法

1.4.1 细胞浓度测定 取 1 mL 样品稀释一定倍数,使用紫外分光光度计在波长 600 nm 条件下测定 OD_{600nm},使显示值在 0.2~0.8 之间。

1.4.2 葡萄糖浓度测定 取 1 mL 样品 12 000 r/min 离心 10 min,取上清用去离子水稀释一定倍数,使葡萄糖质量浓度在 0~2 g/L 之间,使用 M-

100 生物分析仪测定葡萄糖浓度。

1.4.3 氨基酸检测方法 取 1 mL 样品 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清用超纯水稀释至氨基酸含量在 0~1 g/L 之间, 邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)柱前衍生法测定氨基酸含量^[20]。

1.4.4 有机酸检测方法 高效液相色谱法(HPLC)测定丙酮酸和乙酸的含量^[21]。

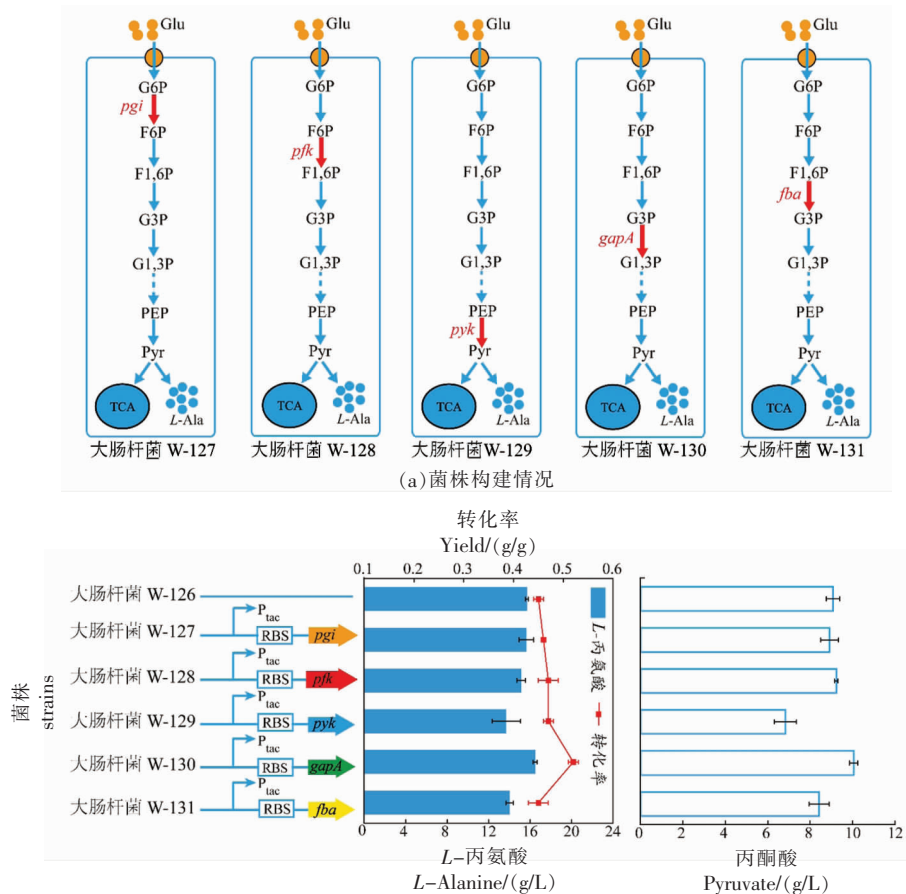
2 结果与分析

2.1 强化 L-丙氨酸前体供给

丙酮酸是糖酵解路径的终产物,也是合成 L-丙氨酸的前体,为提高 L-丙氨酸产量,利用代谢工程策略,过表达糖酵解路径酶,强化 L-丙氨酸前体供给。为此,在大肠杆菌 W-126 中,分别过表达磷酸己糖异构酶基因(*pgi*)、6-磷酸果糖激酶基因(*pfk*)和丙酮酸激酶基因(*pyk*)、NAD⁺依赖的 3-

磷酸甘油醛脱氢酶基因(*gapA*)以及果糖二磷酸醛缩酶基因(*fba*),得到工程菌株大肠杆菌 W-127(*pgi*)、大肠杆菌 W-128(*pfk*)、大肠杆菌 W-129(*pyk*)、大肠杆菌 W-130(*gapA*)和大肠杆菌 W-131(*fba*)(图 2a)。

为了研究强化前体供给对 L-丙氨酸生产的影响,比较了出发菌株和工程菌株的发酵性能。如图 2 所示,可以得出如下结论:1)相对于出发菌株大肠杆菌 W-126,过表达 *gapA* 使 L-丙氨酸产量提高了 5.1%,而过表达 *pgi*、*pfk*、*pyk* 和 *fba*,分别使 L-丙氨酸产量降低 0.38%,3.5%,12.7%和 10.6%(图 2b),表明过表达 *gapA* 有利于 L-丙氨酸产量提升;2)过表达 *pgi*、*pfk*、*pyk* 和 *gapA*,使 L-丙氨酸的糖酸转化率分别提高 2.2%,4.4%,4.4%和 15.6%,达到 0.46,0.47,0.47 和 0.52 g/g,表明过表达 *gapA* 有利于提高 L-丙氨酸糖酸转化率,而



(b) 工程菌株 L-丙氨酸产量、得率及丙酮酸积累情况

图 2 重组菌株的构建与评估

Fig.2 Construction and evaluation of recombinant strains

过表达 *pgi*、*pfk*、*pyk* 对 *L*-丙氨酸的糖酸转化率没有明显的提升;3) 相对于出发菌株大肠杆菌 W-126, 过表达 *pfk* (OD_{600nm} 8.32) 和 *pyk* (8.72), 使 OD_{600nm} 分别下降了 15.1% 与 11.0%, 表明过表达 *pfk* 和 *pyk* 不利于菌体生长(图 3b)。综上所述, 过表达 *gapA*, 不仅增加了 *L*-丙氨酸产量, 还提高了糖酸转化率, 选择菌株大肠杆菌 W-130 进行下一步研究。此外, 在本研究中也发现, 过表达 *gapA*,

使前体丙酮酸的积累量也增加了 10.7%, 说明过表达 *gapA* 基因增加了前体丙酮酸的供给, 但增加的丙酮酸无法有效转化为 *L*-丙氨酸, 可能是 P_{tac} 启动子控制的 *gapA* 基因的表达水平过高, 造成代谢流不平衡, 导致糖酵解途径积累的丙酮酸不能及时转化为 *L*-丙氨酸。为此, 需要进一步优化 *gapA* 的表达水平, 平衡代谢流的分布, 促进丙酮酸转化。

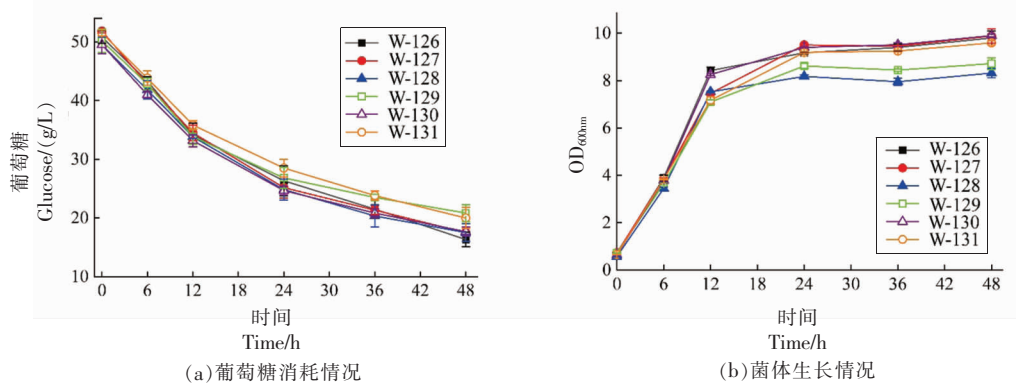


图3 葡萄糖消耗和菌体生长情况

Fig.3 Glucose consumption and bacterial growth

2.2 启动子工程优化 *gapA* 表达

为了平衡代谢流分布, 进一步提高 *L*-丙氨酸的产量和转化率, 利用启动子工程优化 *gapA* 的表达水平。为此, 选用高表达、中表达和低表达的 P_{J23101} 、 P_{J23105} 和 P_{J23114} 启动子, 分别替换大肠杆菌 W-130 菌株控制 *gapA* 表达的 P_{tac} 启动子^[22], 获得工程菌株大肠杆菌 W-132 (P_{J23101})、大肠杆菌 W-133 (P_{J23105}) 和大肠杆菌 W-134 (P_{J23114}) (图 4a)。

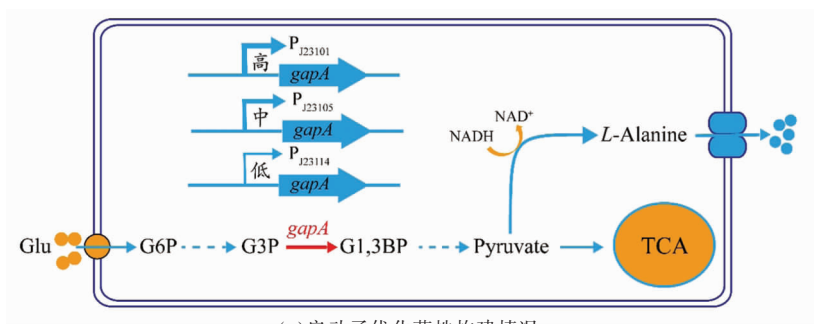
为了研究优化 *gapA* 表达对 *L*-丙氨酸产量和丙酮酸积累的影响, 比较了出发菌株和工程菌株的发酵性能。如图 4 所示, 可以得出如下结论: 1) 当 *gapA* 表达水平从低水平增加到中水平时, *L*-丙氨酸的产量增加了 10.2%, 从 16.6 g/L 增加到 18.3 g/L, *L*-丙氨酸的转化率提升了 10.0%, 从 0.50 g/g 增加到 0.55 g/g, 丙酮酸的积累量从 8.2 g/L 增加到 10.7 g/L; 2) 当 *gapA* 的表达水平从中表达增加到高表达时, *L*-丙氨酸的产量无明显变化, *L*-丙氨酸的转化率降低了 7.3%, 从 0.55 g/g 降低到 0.51 g/g, 丙酮酸的积累量从 10.7 g/L 降低到 9.8 g/L; 3) 替换不同强度的启动子后, 菌体生长和耗糖情况

均无明显变化(图 5a 与 5b); 4) 当 *gapA* 为中表达水平时, 相较于大肠杆菌 W-130, *L*-丙氨酸的产量和转化率分别增加了 7.3% 和 5.8%。综上所述, 精细化调控 *gapA* 表达, 可以提高 *L*-丙氨酸产量和转化率, 然而, 大肠杆菌 W-133 仍然积累 10.7 g/L 的丙酮酸, 因此, 需要进一步优化, 提高 *L*-丙氨酸大肠杆菌细胞工厂的生产性能。

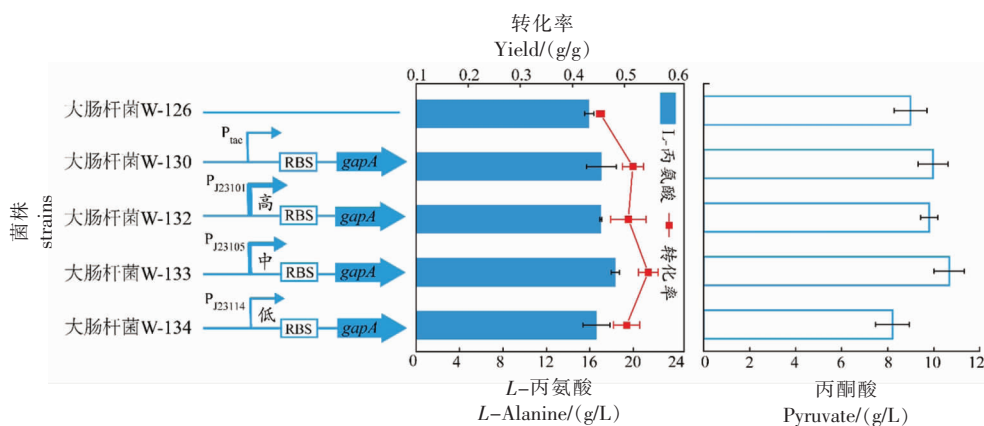
2.3 转运工程促进 *L*-丙氨酸生产

尽管通过强化 *L*-丙氨酸合成路径, 提高了 *L*-丙氨酸产量, 但仍存在着丙酮酸大量积累无法被转化的问题。在发酵生产中, 胞内 *L*-丙氨酸含量过高会导致细胞活性受到抑制^[23], 影响 *L*-丙氨酸的生产, 同时胞内过多的 *L*-丙氨酸也可能会抑制丙酮酸的转化。为了减少 *L*-丙氨酸的胞内积累, 促进丙酮酸转化为 *L*-丙氨酸, 在大肠杆菌 W-133 的 P_{J23105} -*gapA* 质粒上引入 *L*-丙氨酸外运蛋白基因 (*alaE*), 得到质粒 pTET-*alaE* (图 6), 将 pTET-*alaE* 导入大肠杆菌 W-126 中得到菌株大肠杆菌 W-135 (图 7a)。

为了研究 *alaE* 过表达对丙酮酸积累及 *L*-丙



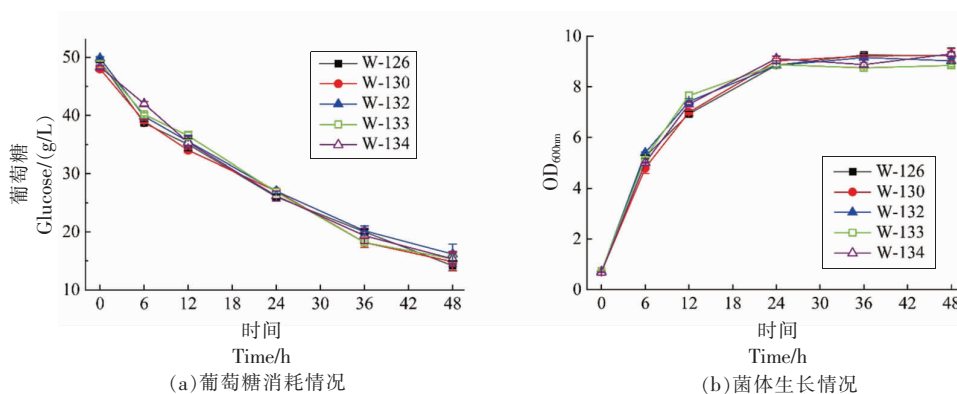
(a) 启动子优化菌株构建情况



(b) 工程菌株 L-丙氨酸产量、得率及丙酮酸积累情况

图 4 启动子优化菌株的构建与评估

Fig.4 Construction and evaluation of promoter optimized strain



(a) 葡萄糖消耗情况

(b) 菌体生长情况

图 5 葡萄糖消耗和菌体生长情况

Fig.5 Glucose consumption and bacterial growth

氨酸生产的影响,比较了菌株大肠杆菌 W-133 和 大肠杆菌 W-135 的发酵性能。结果如图 7b 所示, 可以得出如下结论:1) 相对于菌株大肠杆菌 W- 133,过表达 *alaE* 使 OD_{600nm} 提高了 3.0%,表明促 进 L-丙氨酸外排有利于细胞生长;2)过表达 *alaE* 使 L-丙氨酸产量提高了 10.9%,达 20.4 g/L;3)过

表达 *alaE* 菌株积累了 8.3 g/L 丙酮酸,较菌株大 肠杆菌 W-133 降低了 21.0%。综上所述,过表达 *alaE*,不仅增加了 L-丙氨酸的产量,还改善了细胞 生长,丙酮酸积累量也有所下降,表明过表达 *alaE* 可以促进丙酮酸转化为 L-丙氨酸,减轻胞内 L-丙 氨酸积累对细胞活性的抑制。

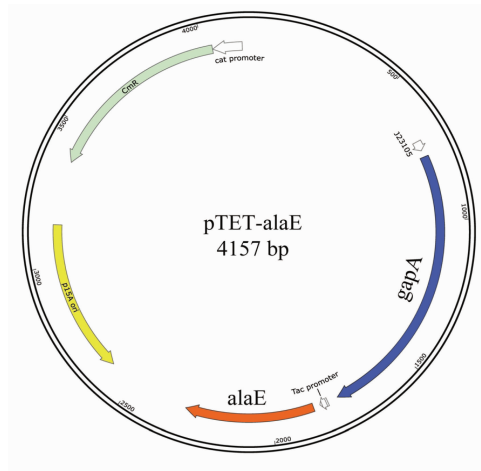


图6 pTET-alaE 质粒图谱

Fig.6 Plasmid mapping of pTET-alaE

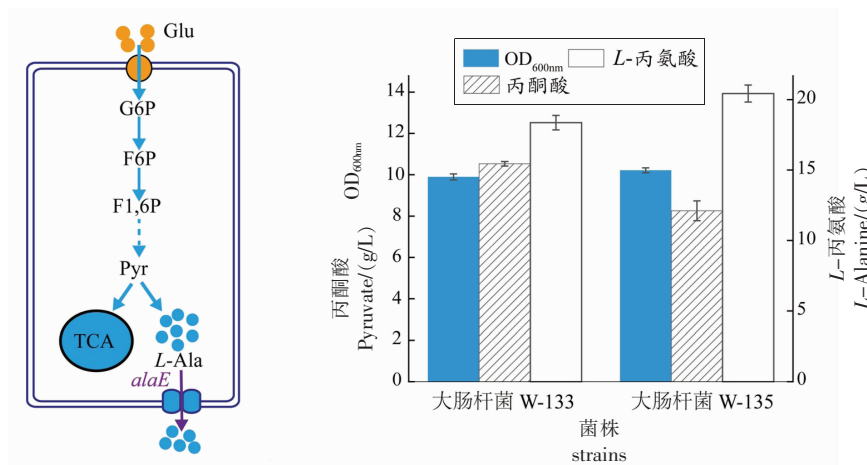


图7 重组菌株的构建与评估

Fig.7 Construction and evaluation of recombinant strains

2.4 发酵培养基优化

在上述研究中,通过代谢工程改造构建了L-丙氨酸生产菌株大肠杆菌W-135,为了进一步提高L-丙氨酸产量,通过单因素实验对L-丙氨酸生产菌株发酵培养基碳氮源种类及浓度进行优化,并在5L发酵罐上进行放大生产试验。

2.4.1 碳源的优化 为了选择合适的碳源,以摇瓶发酵培养基为基础,分别添加50 g/L的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、淀粉和木聚糖作为碳源,研究不同碳源对L-丙氨酸产量的影响。如图8a所示,可以得出如下结论:1)以葡萄糖作为碳源时,L-丙氨酸产量最高,达20.3 g/L,此时菌体生长较好,OD_{600nm}为9.6;2)以可溶性淀粉作为碳源时,L-丙氨酸产量只有0.7 g/L,OD_{600nm}为5.7,可能是菌株

大肠杆菌W-135不含淀粉水解酶,不能将淀粉水解为可利用的葡萄糖。因此,生产L-丙氨酸的最佳碳源为葡萄糖。

为了研究不同葡萄糖添加量对L-丙氨酸生产的影响,在摇瓶发酵培养基中添加不同工作浓度的葡萄糖(10,20,30,40,50,60 g/L)。如图8b所示,可以得出如下结论:1)随着葡萄糖浓度的增加,菌体OD_{600nm}逐渐增加,当添加40 g/L葡萄糖时,L-丙氨酸产量最高,达20.9 g/L,此时菌体OD_{600nm}为9.5;2)当葡萄糖添加量大于40 g/L时,随着糖浓度增加,OD_{600nm}虽略有增长,但L-丙氨酸产量开始下降。综上,在10~40 g/L葡萄糖质量浓度范围内,L-丙氨酸的产量与OD_{600nm}呈正相关,超过这个范围,葡萄糖浓度提高有利于菌体生

长但不利于L-丙氨酸的生产,因此,最佳葡萄糖添加量为40 g/L。

2.4.2 氮源的优化 为选择合适的氮源,以40 g/L的葡萄糖为碳源,分别以20 g/L的酵母浸粉、玉米浆、蛋白胨、牛肉膏、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和尿素作为唯一氮源,研究不同氮源对菌体生长和L-丙氨酸产量的影响。如图8c所示,可以得出如下结论:1)以酵母浸粉为唯一氮源时,菌体 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 最高,为11.3,但L-丙氨酸产量仅为1.6 g/L;2)以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为唯一氮源时,L-丙氨酸的产量最高,为23.5 g/L,此时菌体 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为9.9。综上,有机氮源有利于菌体生长,但不利于L-丙氨酸生产,无机氮源为速效氮源,有利于菌体前期的快速生长^[24],且以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源,可为L-丙

氨酸合成提供 NH_4^+ ,有利于丙酮酸转化为L-丙氨酸。因此,生产L-丙氨酸的最佳氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

为了研究不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量对L-丙氨酸生产的影响,在摇瓶发酵培养基中使用了不同工作浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L)。如图8d所示,可以得出如下结论:1)添加5~25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增加,L-丙氨酸产量逐渐增加,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度为25 g/L时,L-丙氨酸产量最高为26.1 g/L,此时菌体 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为10.3;2)随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度继续增加,L-丙氨酸产量和菌体 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 都略有下降,可能是因为继续提高 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度,会导致发酵液中 NH_4^+ 过多,从而抑制菌体的生长和产物的合成^[25]。因此,最佳 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为25 g/L。

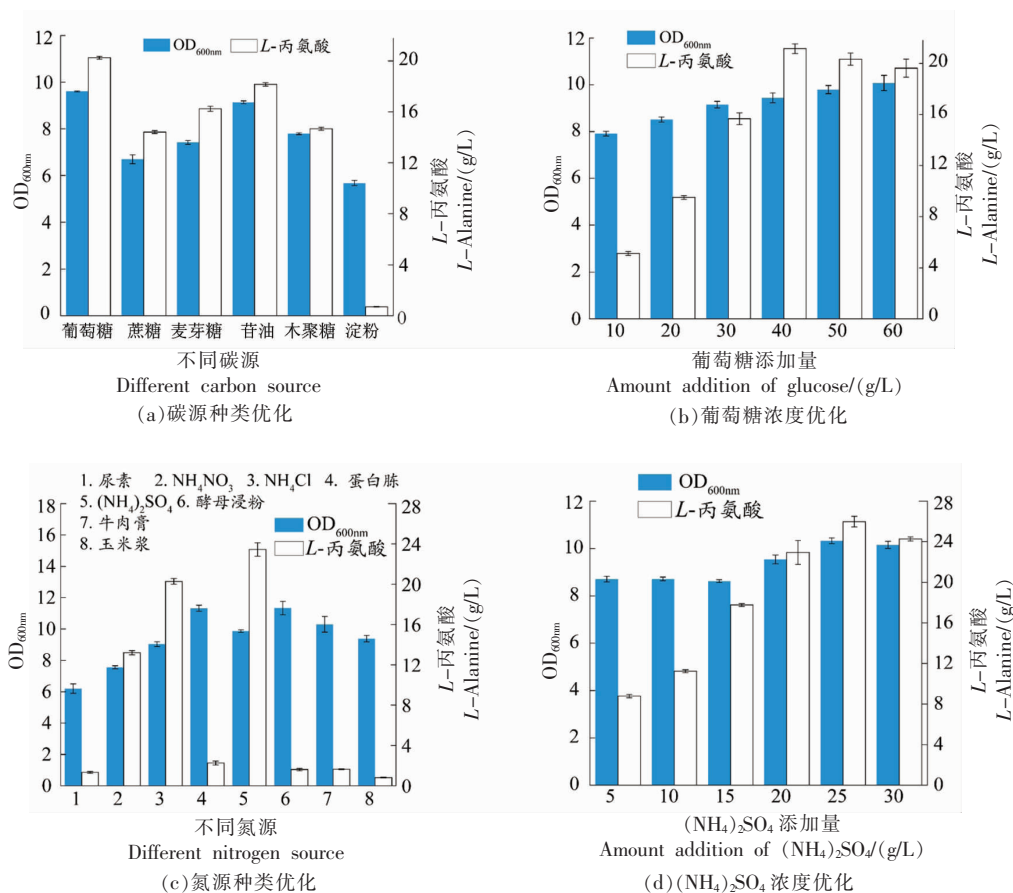


图8 大肠杆菌W-135发酵培养基优化

Fig.8 Optimization of fermentation medium for *Escherichia coli* W-135

2.4.3 5 L发酵罐放大生产 为了验证菌株大肠杆菌W-135生产L-丙氨酸的能力,分别以葡萄糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为碳源和氮源,在5 L发酵罐上

进行发酵验证。接种量10%,发酵初糖质量浓度为40 g/L,当残糖质量浓度降至20 g/L时,一次性补加40 g/L的葡萄糖,全程有氧发酵。如图9所示,

可以得出如下结论:1)由图 9b 可知,6~24 h 为 *L*-丙氨酸合成快速增长期(比合成速率 ≥ 1),24 h 后 *L*-丙氨酸合成速率放缓,发酵至 36 h,*L*-丙氨酸比合成速率近乎为 0,且耗糖速率缓慢,达到发酵终点,发酵结束;2)发酵 36 h,*L*-丙氨酸产量、糖酸转化率和生产强度分别为 77.4 g/L、0.55 g/g 和 2.15

g/L/h;3)测定发酵液副产物乙酸和丙酮酸积累情况,发现发酵液中最高积累了 9.6 g/L 乙酸和 22.2 g/L 丙酮酸。综上所述,菌株大肠杆菌 W-135 在 5 L 罐上发酵周期短,36 h 即可结束发酵,但存在乙酸和前体丙酮酸积累过多、转化率和生产强度低等问题。

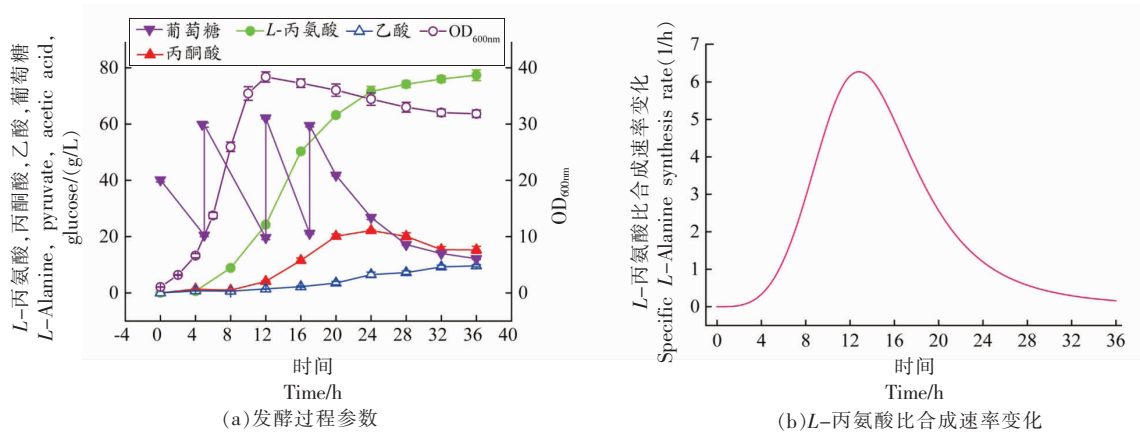


图 9 大肠杆菌 W-135 在 5 L 罐中的补料分批发酵

Fig.9 Fed-batch fermentation of *E.coli* W-135 in 5 L bioreactor

2.5 发酵条件优化

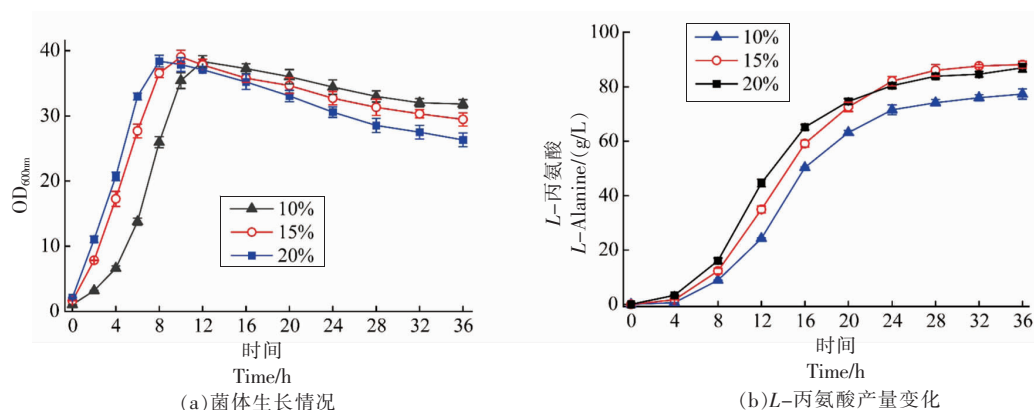
在上述研究中发现,*L*-丙氨酸生产菌株大肠杆菌 W-135 存在着转化率和生产强度低,乙酸和丙酮酸积累过多的问题。为促进丙酮酸转化,提高 *L*-丙氨酸产量和转化率,减少副产物积累,本研究利用生化工程策略,对接种量、发酵方式、转厌氧时间和补料方式等发酵条件进行优化。

2.5.1 接种量对 *L*-丙氨酸积累的影响 在发酵过程中,不同的接种量影响着菌体的生长和代谢,接种量太小,会延长菌体生长的延滞期,导致菌体生长缓慢,发酵周期延长,提高生产成本;接种量太大,会导致发酵前期菌体快速生长,后期细胞提早衰老,影响产物的合成^[26];不同接种量还会影响糖酸转化率和丙酮酸的积累^[27]。为了提高 *L*-丙氨酸产量和转化率,促进丙酮酸转化,在 5 L 发酵罐中对初始接种量进行优化,分析 10%,15%和 20%接种量对菌体生长和 *L*-丙氨酸合成的影响。

如图 10 所示,可以得出如下结论:1)接种量为 10%,15%和 20%时菌体生长至稳定期的时间分别在 12,10 h 和 8 h 左右,最大 OD_{600nm} 分别是 38.2,39.1 和 38.4 (图 10a 与表 3),不同接种量对

菌体生长的最大 OD_{600nm} 影响不大,但增大接种量可以使菌体快速生长至稳定期;2)当接种量为 15%时,*L*-丙氨酸产量和转化率分别为 88.2 g/L 和 0.56 g/g,较 10%接种量分别提高了 14.0%和 1.8%;3)接种量增加至 20%,*L*-丙氨酸后期合成速率开始下降,产量和转化率较 15%接种量分别降低了 1.4%和 5.4%,可能是增大接种量后,衰老菌体过多,同时接入了过多的代谢废物,影响了菌体活性和 *L*-丙氨酸的合成(表 3)。综上所述,接种量为 15%时,可以有效提高 *L*-丙氨酸产量,但对转化率提升不大,发酵液中仍积累了大量丙酮酸无法被转化。

2.5.2 有氧发酵和两阶段厌氧发酵对 *L*-丙氨酸生产的影响 大肠杆菌是兼性厌氧菌,在有氧和厌氧条件下都可以通过糖酵解途径催化葡萄糖合成丙酮酸,为了研究有氧发酵和两阶段厌氧发酵对前体丙酮酸的积累以及 *L*-丙氨酸合成的影响,分别进行全程有氧发酵和 6 h 转厌氧发酵。如图 11 所示,可以得出如下结论:1)6 h 转厌氧后菌体 OD_{600nm} 不再上升,有氧发酵和 6 h 转厌氧发酵最大 OD_{600nm} 分别为 39.1 和 29.6,厌氧阶段不利于菌体

图 10 不同接种量对菌体生长(a)和 *L*-丙氨酸生产(b)的影响Fig.10 Effects of different inoculum size on bacterial growth (a) and *L*-alanine production (b)表 3 不同接种量对 *L*-丙氨酸生产的影响Table 3 Effects of different inoculum size on *L*-alanine production

发酵参数	接种量/%			变化值/%	
	10(A)	15(B)	20(C)	(B/A-1) ×100	(C/B-1) ×100
最大 OD _{600nm}	38.2 ± 0.91	39.1 ± 1.01	38.4 ± 0.90	2.4	-1.8
<i>L</i> -丙氨酸/(g/L)	77.4 ± 1.90	88.2 ± 1.25	87.0 ± 1.56	14.0	-1.4
乙酸/(g/L)	9.61 ± 0.39	7.52 ± 0.20	9.81 ± 0.16	-21.7	30.5
丙酮酸/(g/L)	22.2 ± 0.31	20.8 ± 0.35	20.2 ± 0.25	-6.3	-2.9
总葡萄糖消耗/(g/L)	142.1 ± 3.5	156.9 ± 4.2	161.4 ± 3.1	10.4	2.9
糖酸转化率/(g/g)	0.55	0.56	0.53	1.8	-5.4
生产强度/(g/L/h)	2.15	2.45	2.42	14.0	-1.2

生长(图 11a 与表 4);2)6 h 转厌氧发酵 *L*-丙氨酸产量和糖酸转化率分别为 98.4 g/L 和 0.77 g/g, 相比于全程有氧发酵, *L*-丙氨酸产量和糖酸转化率分别提升了 11.6% 和 37.5% (表 4);3)分析糖耗情况, 两阶段厌氧发酵比全程有氧发酵耗糖降低了 18% (表 4), 可能是在有氧条件下, 葡萄糖会额外用于菌体生长和有氧呼吸产能, 而厌氧条件下菌体停止生长, 因此有氧发酵比两阶段厌氧发酵消耗更多的葡萄糖用于生长和产能, 从而降低了糖酸转化率;4)分析副产物乙酸积累情况, 发现转厌氧发酵乙酸积累量降低了 66.8%;5)分析前体丙酮酸的积累情况, 发现转厌氧发酵后, 最高积累了 2.97 g/L 丙酮酸(图 11d 与表 4), 相比全程有氧发酵丙酮酸的积累量降低了 85.7%, 可能在厌氧条件下可为 *L*-丙氨酸合成提供充足的辅因子, 有利于催化丙酮酸转化为 *L*-丙氨酸, 提高 *L*-丙氨酸产量和糖酸转化率。综上所述, 两阶段厌氧发酵

促进了丙酮酸的转化, 将丙酮酸积累量降至 2.97 g/L, 同时降低了副产物乙酸的积累, 提高了 *L*-丙氨酸产量和转化率。

2.5.3 不同有氧转厌氧时间对 *L*-丙氨酸生产的影响 两阶段厌氧发酵有利于提高 *L*-丙氨酸的产量和糖酸转化率, 为了得到最佳的有氧转厌氧时间, 进一步提高糖酸转化率和生产强度, 对有氧转厌氧时间进行优化, 有氧转厌氧时间分别为 4, 6, 8 h 和 10 h。如图 12 所示, 可以得出如下结论: 1)随着转厌氧时间推延, 菌体最大 OD_{600nm} 逐渐上升, 分别在 20, 30, 35 和 40 左右(图 12a 与表 5); 2)随着转厌氧时间推延, *L*-丙氨酸产量逐渐升高, 发酵 10 h, OD_{600nm} 达到最大值 40 左右时转厌氧, *L*-丙氨酸的产量和糖酸转化率最高, 分别为 115.8 g/L 和 0.78 g/g (图 12b 与表 5)。综上所述, 延长有氧阶段的培养时间可以提高菌体量, 在有氧阶段培养 10 h 后转厌氧, 有利于厌氧发酵阶段 *L*-丙

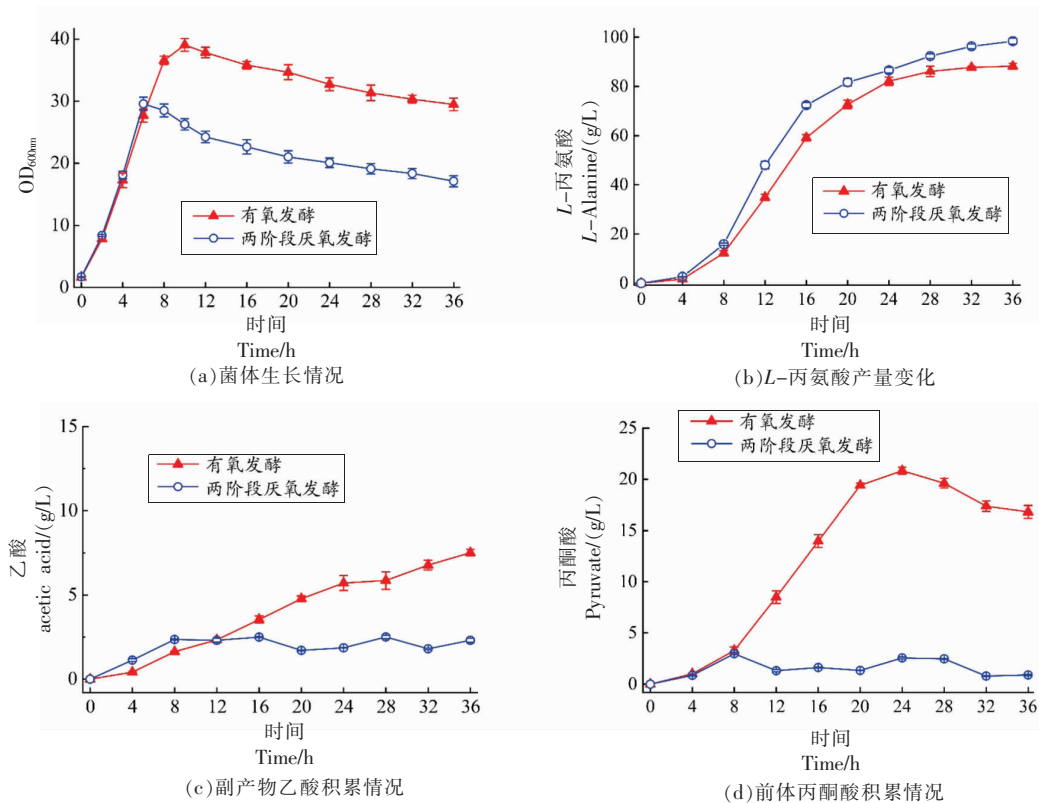


图 11 有氧发酵和两阶段厌氧发酵

Fig.11 Aerobic fermentation and two-stage anaerobic fermentation

表 4 有氧发酵和两阶段厌氧发酵对 L-丙氨酸生产的影响

Table 4 Effects of aerobic fermentation and two-stage anaerobic fermentation on L-alanine production

发酵参数	发酵方式		变化值/% (B/A-1) × 100
	有氧发酵(A)	两阶段厌氧发酵(B)	
最大 OD _{600nm}	39.1 ± 1.01	29.6 ± 1.06	-24.3
L-丙氨酸/(g/L)	88.2 ± 1.25	98.4 ± 1.21	11.6
乙酸/(g/L)	7.52 ± 0.20	2.50 ± 0.03	-66.8
丙酮酸/(g/L)	20.8 ± 0.35	2.97 ± 0.11	-85.7
总葡萄糖消耗/(g/L)	156.9 ± 4.2	128.6 ± 2.8	-18.0
糖酸转化率/(g/g)	0.56	0.77	37.5
生产强度/(g/L/h)	2.45	2.73	11.4

氨酸的快速积累,提高 L-丙氨酸产量。

2.5.4 不同补料方式对 L-丙氨酸合成的影响 采用间歇补料的方式,一次性向培养基中加入大量葡萄糖,对发酵环境的扰动较大,会影响菌体活性^[28],为了解决这个问题,对补料方式进行了调整。在发酵过程中,糖耗速率是一个变化的过程,发酵前期菌体生长处于延滞期,耗糖速率较慢,随着菌体生长至对数期以及产物合成速率的加快,

耗糖速率逐渐加快,到了发酵后期,菌体活性降低,耗糖速率逐渐变缓慢。

为了将糖浓度稳定在一定的范围内,通过 Logistic 函数进行非线性曲线拟合,计算出间歇补料发酵不同时期的比耗糖速率,如图 13a 所示,发酵过程中比耗糖速率是一个先增加后减缓的过程,在 8 h 比耗糖速率达到最大。根据发酵过程中比耗糖速率的变化,计算出不同时期的补糖速率

表 5 不同有氧转厌氧时间对 L-丙氨酸生产的影响

Table 5 Effects of different aerobic to anaerobic time on L-alanine production

发酵参数	转厌氧时间/h				变化值/%		
	4(A)	6(B)	8(C)	10(D)	(A/B-1) × 100	(C/B-1) × 100	(D/B-1) × 100
转厌氧时 OD _{600nm}	19.9 ± 0.71	29.6 ± 1.06	35.0 ± 0.72	40.5 ± 0.89	-32.8	18.2	36.8
L-丙氨酸/(g/L)	84.5 ± 2.18	98.4 ± 1.21	108.2 ± 2.23	115.8 ± 2.1	-14.1	10.0	17.7
乙酸/(g/L)	1.98 ± 0.28	2.50 ± 0.03	2.42 ± 0.17	2.58 ± 0.21	-20.8	-3.2	3.2
丙酮酸/(g/L)	2.14 ± 0.32	2.97 ± 0.11	1.48 ± 0.29	1.23 ± 0.25	-27.9	-50.2	-58.6
总葡萄糖消耗/(g/L)	112.8 ± 3.5	128.6 ± 2.8	139.8 ± 3.2	148.1 ± 4.1	-12.3	8.7	15.2
糖酸转化率/(g/g)	0.75	0.77	0.77	0.78	-2.6	0.0	1.3
生产强度/(g/L/h)	2.35	2.73	3.01	3.22	-13.9	10.3	17.9

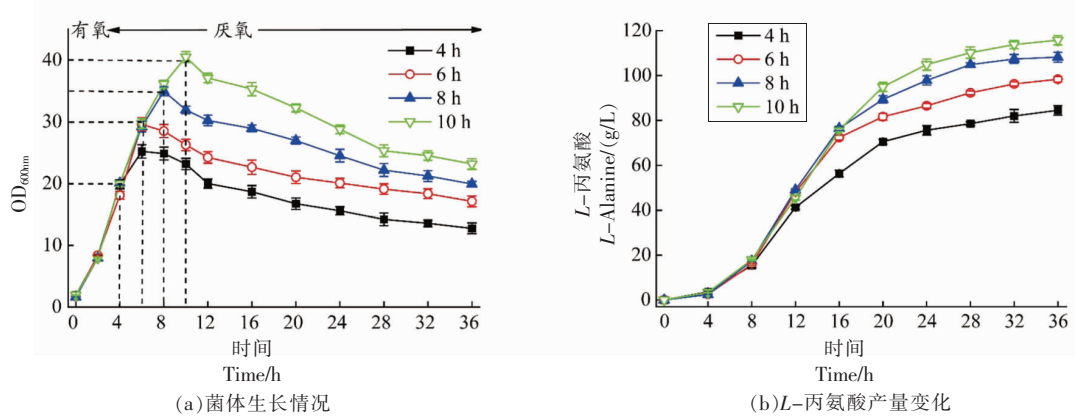


图 12 不同有氧转厌氧时间对菌体生长(a)和 L-丙氨酸生产(b)的影响

Fig.12 Effects of different aerobic to anaerobic time on bacterial growth (a) and L-alanine production (b)

(图 13b),通过变速补料,根据摇瓶碳源浓度优化结果,将葡萄糖浓度控制在 40~50 g/L 范围内(图 15)。两种补料方式的发酵验证结果如图 14,可以得出如下结论:1) 变速补料发酵菌体最大 OD_{600nm} 为 43.2,较间歇补料发酵提高了 9.4% (图 14a 与表 6);2) 变速补料发酵 L-丙氨酸产量和糖酸转化

率分别为 127.2 g/L 和 0.83 g/g,较间歇补料发酵分别提高了 7.5%和 6.4%(表 6)。综上,变速补料发酵进一步提高了糖酸转化率,可维持发酵环境稳态,减少对菌体活性的影响,有利于提高 L-丙氨酸产量和转化率。

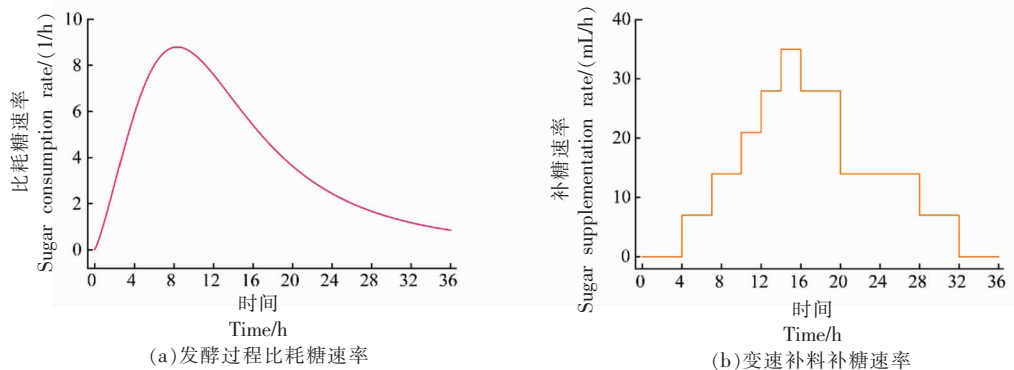


图 13 发酵过程比耗糖速率(a)和补糖速率(b)

Fig.13 Specific sugar consumption rate (a) and sugar supplementation rate (b) during fermentation

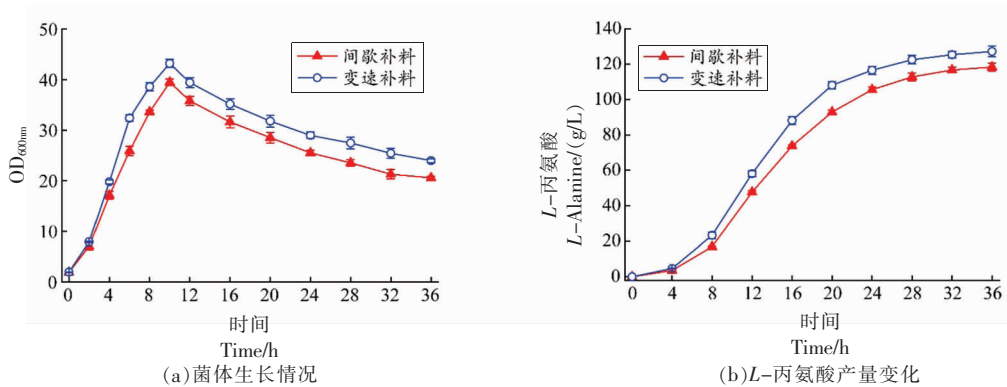
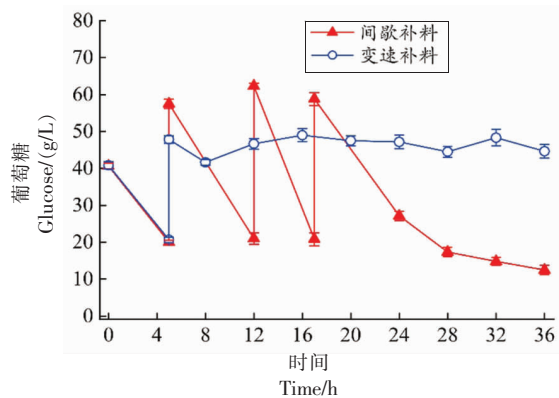
图 14 不同补料方式 OD_{600nm} (a)和产量(b)对比Fig.14 Comparison of OD_{600nm} (a) and titer (b) for different feeding methods

图 15 不同补料方式葡萄糖对比

Fig.15 Glucose comparison of different feeding methods

表 6 不同补料方式对 L-丙氨酸生产的影响

Table 6 Effects of different feeding methods on L-alanine production

发酵参数	补料方式		变化值/% (B/A-1) ×100
	间歇补料(A)	变速补料(B)	
最大 OD _{600nm}	39.5 ± 0.38	43.2 ± 0.8	9.4
L-丙氨酸/(g/L)	118.3 ± 2.2	127.2 ± 3.0	7.5
乙酸/(g/L)	2.26 ± 0.18	1.96 ± 0.11	-13.3
丙酮酸/(g/L)	1.52 ± 0.23	1.15 ± 0.13	-24.3
总葡萄糖消耗/(g/L)	152.3 ± 4.1	154.2 ± 5.2	1.2
糖酸转化率/(g/g)	0.78	0.83	6.4
生产强度/(g/L/h)	3.29	3.53	7.3

3 结论

本研究通过强化 L-丙氨酸合成路径酶,发现过表达 *gapA*,有利于增加前体丙酮酸供给,提高 L-丙氨酸产量和转化率;启动子工程优化 *gapA* 表达,发现 *gapA* 中表达为最佳表达水平;转运工程

强化 *alaE* 表达,促进了 L-丙氨酸外排和丙酮酸的转化,减轻了 L-丙氨酸胞内积累对菌体生长的抑制,得到了菌株大肠杆菌 W-135,摇瓶产量达 20.4 g/L。通过生物工程策略优化发酵培养基成分、接种量、发酵方式、转厌氧时间和补料方式,使前体

丙酮酸和副产物乙酸积累量分别降低了94.8%和79.6%,L-丙氨酸产量和转化率达127.2 g/L和0.83 g/g,分别比优化前提高了64.3%和50.9%。

本研究通过强化前体供给、启动子工程和转运工程等代谢工程策略,构建了发酵周期短的L-丙氨酸高产菌株。通过生化工程策略优化L-丙氨酸发酵工艺,解决了副产物乙酸和前体丙酮酸积累过多、转化率和生产强度低等问题。本研究用厌氧发酵工艺生产L-丙氨酸,可减少能耗,降低L-丙氨酸生产成本;本研究运用非线性曲线拟合方法,来计算不同时期补糖速率,实现了精准补料,可以维持发酵环境稳态,为后续L-丙氨酸的工业化生产提供了参考。

参 考 文 献

- [1] ZHOU L, DENG C, CUI W J, et al. Efficient L-alanine production by a thermo-regulated switch in *Escherichia coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(2): 324-337.
- [2] SMITH G M, LEE S A, REILLY K C, et al. Fed-batch two-phase production of alanine by a metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(20): 1695-1700.
- [3] SHARMA A, NODA M, SUGIYAMA M, et al. Metabolic engineering of *Pediococcus acidilactici* BD16 for heterologous expression of synthetic *alaD* gene cassette and L-alanine production in the recombinant strain using fed-batch fermentation [J]. Foods, 2021, 10(8): 1-16.
- [4] 徐慧, 崔颖, 王珊珊, 等. L-丙氨酸转化菌发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 177-182.
XU H, CUI Y, WANG S S, et al. Fermentation conditions optimization of L-alanine-producing bacteria[J]. Food Research and Development, 2021, 42(7): 177-182.
- [5] 付刚, 付相敏, 刘枣, 等. 大肠杆菌 JH-B2 产 L-丙氨酸发酵工艺的研究[J]. 湖北工业大学学报, 2017, 32(1): 116-120.
FU G, FU X M, LIU Z, et al. Research on fermentation process of *Escherichia coli* JH-B2 to produce L-alanine[J]. Journal of Hubei University of Technology, 2017, 32(1): 116-120.
- [6] LIU P P, XU H T, ZHANG X L. Metabolic engineering of microorganisms for L-alanine production [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(2): 1-7.
- [7] 汤晓玲, 张慧敏, 柳志强, 等. 非天然氨基酸细胞工厂的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1295-1306.
TANG X L, ZHANG H M, LIU Z Q, et al. Construction and application of microbial cell factories for unnatural amino acids [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(4): 1295-1306.
- [8] HASHIMOTO S I, KATSUMATA R. L-alanine fermentation by an alanine racemase-deficient mutant of the DL-alanine hyperproducing bacterium *Arthrobacter oxydans* HAP-1[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(4): 385-390.
- [9] OHASHIMA T, SODA K. Purification and properties of alanine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*[J]. FEBS Journal, 2010, 100(1): 29-39.
- [10] JÓHANN R, ANDERSON R, SVENSSON B H. alanine as an end product during fermentation of monosaccharides by *Clostridium* strain P2[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1995, 68(4): 273-280.
- [11] YAMAMOTO S, GUNJI W, SUZUKI H, et al. Overexpression of genes encoding glycolytic enzymes in *Corynebacterium glutamicum* enhances glucose metabolism and alanine production under oxygen deprivation conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4447-4457.
- [12] TORU J, MIHO F, EIJI M, et al. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(1): 159-165.
- [13] LEE M, SMITH G M, EITEMAN M A, et al. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli aceF IdhA* mutants expressing the *Bacillus sphaericus alaD* gene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 56-60.
- [14] HOLS P, KLEEREBEZEM M, SCHANCK A, et al. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(6): 588-592.
- [15] UHLENBUSCH I, SAHM H, SPRENGER G A. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zy-*

- momonas mobilis* and excretion of *L*-alanine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(5): 1360-1366.
- [16] 聂玉朋, 徐慧, 姚明静, 等. *L*-丙氨酸的应用及生产现状概述[J]. 中国酿造, 2021, 40(11): 26-30.
NIE Y P, XU H, YAO M J, et al. Application and production status of *L*-alanine[J]. China Brewing, 2021, 40(11): 26-30.
- [17] ZHANG X, JANTAMA K, MOORE J, et al. Production of *L*-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 355-366.
- [18] 周丽, 邓璨, 崔文璟, 等. 温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 *L*-丙氨酸[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2272-2281.
ZHOU L, DENG C, CUI W J, et al. *L*-alanine production in recombinant *Escherichia coli* with thermo-regulated genetic switch[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2272-2281.
- [19] SMITH G, LEE S, REILLY K, et al. Fed-batch two-phase production of alanine by a metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(20): 1695-1700.
- [20] 赵磊. 大肠杆菌 *L*-苏氨酸生产菌代谢工程改造优化[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
ZHAO L. Metabolic engineering modification of an *Escherichia coli L*-threonine production strain [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [21] 唐文秀, 王学明, 郭亮, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产琥珀酸[J]. 化工进展, 2022, 41(2): 938-950.
TANG W X, WANG X M, GUO L, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce succinic acid[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2022, 41(2): 938-950.
- [22] GUO L, DIAO W W, GAO C, et al. Engineering *Escherichia coli* lifespan for enhancing chemical production[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 307-318.
- [23] KIM S, IHARA K, KATSUBE S, et al. Characterization of the *L*-alanine exporter AlaE of *Escherichia coli* and its potential role in protecting cells from a toxic α -level accumulation of *L*-alanine and its derivatives[J]. Microbiology Open, 2015, 4(4): 632-643.
- [24] 刘佳, 徐继嗣, 罗秋玲, 等. 不透明红球菌生产谷氨酸氧化酶发酵过程优化[J]. 过程工程学报, 2017, 17(4): 814-820.
LIU J, XU J S, LUO Q L, et al. Optimization of fermentation process for production of glutamic acid oxidase from *Rhodococcus opacus*[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2017, 17(4): 814-820.
- [25] 黄静, 史建明, 霍文婷, 等. NH_4^+ 对 *L*-色氨酸发酵的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(3): 55-60.
HUANG J, SHI J M, HUO W T, et al. The effects of NH_4^+ on *L*-tryptophan fermentation[J]. China Biotechnology, 2011, 31(3): 55-60.
- [26] 张义馨, 张杨平, 周锦敏, 等. 接种量对螺旋霉素发酵生产的影响[J]. 发酵科技通讯, 2016, 45(2): 110-113.
ZHANG Y X, ZHANG Y P, ZHOU J M, et al. The effects of inoculum volume on spiramycin fermentation[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2016, 45(2): 110-113.
- [27] 陈修来, 王元彩, 董晓翔, 等. 代谢工程改造酿酒酵母生产 *L*-苹果酸[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(2): 72-80.
CHEN X L, WANG Y C, DONG X X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for *L*-malic acid production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(2): 72-80.
- [28] 周立树. 裂殖壶菌发酵产 DHA 的优化及发酵补料方式的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
ZHOU L S. Optimization of DHA production by *Schizochytrium* sp. and the studies on feeding strategy in fermentation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.

Construction and Fermentation Process Optimization of the *Escherichia coli* Cell Factory with High-titer Production of *L*-alanine

Nie Yupeng¹, Guo Liang², Liu Liming², Liu Jia², Xu Hui¹, Jiang Guozheng³, Tian Yanjun^{*}

(¹Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Shandong Food Ferment Industry Research & Design

Institute, Jinan 250014

²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

³Yantai Hengyuan Biological Co., Ltd., Yantai 265709, Shandong)

Abstract *L*-alanine is one of the smallest chiral compounds and has been widely used in food, medicine, and daily chemical fields. Microbial production of *L*-alanine has problems such as long fermentation period and low productivity. In this study, metabolic engineering strategies such as strengthen precursors supply, promoter engineering and transporter engineering was used to construct an *Escherichia coli* cell factory with high-titer production of *L*-alanine. The production process of *L*-alanine was optimized by biochemical engineering strategies to improve the production performance of the *Escherichia coli* cell factory with production of *L*-alanine. Results: Overexpression of *gapA* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene) enhanced precursor supply, increased the titer of *L*-alanine and the conversion of glucose by 5.1% and 15.6%, respectively. Through the optimization of *gapA* expression by promoter engineering, the titer of *L*-alanine and the conversion of glucose reached 18.3 g/L and 0.55 g/g, respectively. Overexpression of *L*-alanine transporter (AlaE) enhanced *L*-alanine transport, the titer of *L*-alanine reached 20.4 g/L. The composition of culture medium was optimized by biochemical engineering strategy, the best carbon source was glucose 40 g/L and the best nitrogen source was (NH₄)₂SO₄ 25 g/L. The optimum fermentation conditions were as follows: inoculum size: 15%, fermentation mode: 10 h conversion to anaerobic fermentation and feeding mode: variable speed feed. After 36 h fermentation in a 5 L bioreactor, the constructed strain *E. coli* W-135 produced 127.2 g/L of *L*-alanine, with a yield of 0.83 g/g glucose and a productivity of 3.53 g/L/h, which were 64.3%, 50.9% and 64.2% higher than those before optimization, respectively. In this study, a *L*-alanine high-titer strain with short fermentation period and simple fermentation process was constructed by using the strategy of system metabolic engineering and biochemical engineering, which provided a theoretical basis for the industrial production of *L*-alanine.

Keywords *L*-alanine; *Escherichia coli*; metabolic engineering; efflux; biochemical engineering