

代谢工程改造大肠杆菌生产 O-乙酰-L-高丝氨酸

黄良刚, 高峰, 许诺然, 周俊平, 牛坤, 张博, 柳志强*, 郑裕国

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

黄良刚, 高峰, 许诺然, 周俊平, 牛坤, 张博, 柳志强, 郑裕国. 代谢工程改造大肠杆菌生产 O-乙酰-L-高丝氨酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 256-270.

HUANG Lianggang, GAO Feng, XU Nuoran, ZHOU Junping, NIU Kun, ZHANG Bo, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of O-acetyl-L-homoserine[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 256-270.

摘要: O-乙酰-L-高丝氨酸(O-acetyl-L-homoserine, OAH)是一种平台化合物, 可用于生产 L-蛋氨酸和其他有价值的化合物, 但产量低和转化率低等问题限制了其工业化生产和应用。为了解决这一问题, 本研究以前期构建的 L-高丝氨酸宿主大肠杆菌 HS33 为底盘, 采用系统代谢工程策略构建了一株高产 OAH 的菌株。首先, 强化磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)积累、丙酮酸利用以及 OAH 合成途径(过表达 *aspB*、*aspA*、*thrA*^{C1034T}), 获得积累 13.37 g/L OAH 的初始菌株; 随后, 整合筛选的辅因子供应基因解决还原力和能量供应问题, 将产量提升至 15.79 g/L; 之后, 进一步强化乙酸回用途径, 改善乙酰辅酶 A 供应, 结合多源乙酰基转移酶 MetX 表达使得改造获得的工程菌株 OAH28 的 OAH 产量提升至 17.49 g/L。最终, 在 5 L 发酵罐中进行生产性能测试, 工程菌株 OAH 产量达到 47.12 g/L, 葡萄糖转化率为 32%, 生产强度为 0.59 g/(L·h)。上述研究结果为 OAH 的代谢工程改造实现产量提升提供了一定的理论基础, 也为工业化生产提供了有效的借鉴和参考。

关键词: 大肠杆菌; O-乙酰-L-高丝氨酸; 代谢工程; 乙酸回用; 辅因子工程

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400).

*Corresponding author. E-mail: microlu@zjut.edu.cn

Received: 2024-03-08; Accepted: 2024-05-07

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of O-acetyl-L-homoserine

HUANG Lianggang, GAO Feng, XU Nuoran, ZHOU Junping, NIU Kun, ZHANG Bo, LIU Zhiqiang*, ZHENG Yuguo

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: O-acetyl-L-homoserine (OAH) is a promising platform compound for the production of L-methionine and other valuable compounds, while its low yield and low conversion rate limit the industrial application. To solve these problems, we constructed a strain for high OAH production with the previously constructed L-homoserine producer *Escherichia coli* HS33 as the chassis by systematic metabolic engineering. Firstly, PEP accumulation, pyruvate utilization, and OAH synthesis pathway (overexpressing *aspB*, *aspA*, and *thrA*^{C1034T}) were enhanced to obtain an initial strain accumulating 13.37 g/L OAH. Subsequently, the co-factor synthesis genes were integrated to supply reducing power and energy, which increased the yield to 15.79 g/L. The OAH yield of the engineered strain OAH28 was further increased to 17.49 g/L by strengthening the acetic acid reuse pathway, improving the supply of acetyl-CoA, and regulating the expression of MetX from different sources. Finally, in a 5 L fermenter, OAH28 achieved an OAH titer of 47.12 g/L, with a glucose conversion rate of 32% and productivity of 0.59 g/(L·h). The results lay a foundation for increasing the OAH production by metabolic engineering and give insights into the industrial production of OAH.

Keywords: *Escherichia coli*; O-acetyl-L-homoserine; metabolic engineering; acetic acid reuse; co-factor engineering

O-乙酰-L-高丝氨酸(O-acetyl-L-homoserine, OAH)是一种乙酰化且含有酯基的非必需氨基酸,不参与蛋白质合成,但 OAH 是细胞代谢过程中重要的含硫化合物合成前体,如 L-甲硫氨酸(L-methionine, L-Met)、S-腺苷甲硫氨酸^[1]。此外, OAH 作为重要的平台化合物,在 L-高丝氨酸(L-homoserine, L-HS)、 γ -丁内酯等重要化学品的合成中具有潜在应用价值^[2]。目前国内外 OAH 的生产方法主要分为化学合成法和生物合成法。近年来,由于石化行业造成的严重环境问题,以工程菌株利用可再生资源可持续生产 OAH 在行业内受到了普遍关注。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)因其具有清晰的

遗传背景和成熟的 CRISPR/Cas9 基因编辑工具,常用作氨基酸生产的工业底盘细胞^[3]。经系统的代谢工程改造,大肠杆菌可以高效生产 L-HS,其是 OAH 合成的关键碳骨架前体,因此以 L-HS 生产菌株出发改造大肠杆菌来生产 OAH 可以保证充足的前体供应^[4]。需要指出的是,大肠杆菌中缺少内源性高丝氨酸乙酰转移酶(L-homoserine acetyltransferase, MetX),野生型菌株无法有效合成 OAH。常见的棒杆菌属、节杆菌属和芽孢杆菌等微生物中存在天然的高丝氨酸乙酰基转移酶,如谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[5]、迈氏钩端螺旋菌(*Leptospira meyeri*)^[6],这为 OAH 在大肠杆菌

中的异源重构奠定了基础。Wei 等^[7]通过敲除 OAH 降解与竞争代谢途径中的基因, 消除副产物的积累, 增加草酰乙酸的供应并促进前体物质 L-HS 的合成, 增强 OAH 途径碳通量; 然后对来自 *L. meyeri* 的 MetX 进行酶工程改造, 并过表达乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-CoA synthetase, ACS)和丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH), 使工程菌的 OAH 产量在摇瓶中达到 12.1 g/L, 7.5 L 发酵罐中达到 62.7 g/L; 本课题组前期也筛选了蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)来源的 *metX_{bc}/metA*, 用于重建大肠杆菌 W3110 中 OAH 的初始生物合成途径, 结合降解和竞争途径的破坏和中心碳代谢的碳流重分配, 在摇瓶水平积累 8.29 g/L OAH。该工程菌株在补料分批发酵过程中产生了 24.33 g/L 的 OAH, 转化率为 0.23 g/g 葡萄糖^[4]。

为了实现 OAH 的高效积累, 其合成前体 L-HS 的供应是关键。L-HS 可以通过 2 条途径合成, 分别是天冬氨酸转氨酶 AspC 参与的三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)还原型支路(AspC 途径)和天冬氨酸氨裂解酶 AspA 参与的 TCA 氧化型支路(AspA 途径)。理论上, AspC 途径每消耗 1 mol 葡萄糖, 可固定 2 mol CO₂, 同时生成 2 mol L-HS, 但该途径也伴随着 6 mol 的 NADPH 消耗^[8]。NADPH 是胞内重要的辅因子, 当以 AspC 途径为主合成途径时, 易导致胞内还原力失衡, 影响细胞的生长与生产。在大肠杆菌生产 L-HS 的研究中, 提高胞内 NADPH 水平是提高目标产物产量的有效手段, 所以优化 NADPH 的供应对于 OAH 合成也具有重要意义^[9]。此外, 合成途径多个节点如葡萄糖激酶 Glk 和天冬氨酸激酶 LysC 等需要消耗 ATP (图 1), 这对菌株的能量供应又提出了要求。充足的能量供应, 一方面可维持自身生长, 另一方面则为 OAH 的合成提供能量保障。相

关研究也表明, 大肠杆菌生产 L-HS 时会积累乙酸^[10], 导致代谢分流, 从而降低工程菌株生产 OAH 的糖酸转化率。Lin 等^[11]发现大肠杆菌可以将乙酸盐作为碳源进行回收利用, 生成了更多的乙酰辅酶 A, 提高了细胞对乙酸盐耐受性以及碳源的利用率。

在前期研究中, 本团队通过系统代谢工程改造获得了一株高产 L-高丝氨酸的生产菌株 HS33^[5], 具有很好的 OAH 合成潜能。本研究以 HS33 为研究对象, 通过对 OAH 合成途径的丙酮酸(pyruvic acid, PYR)、草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA)和天冬氨酸(aspartic acid, ASP)节点的平衡强化, 筛选并整合辅因子供应基因, 解决胞内 NADPH 及 ATP 的供应问题, 进一步强化前体物质乙酰辅酶 A 的供应, 在多源 MetX 多拷贝表达的基础上获得一株高产的 OAH 工程菌株 OAH23 (图 1)。该菌株在 5 L 发酵罐中 OAH 产量为 47.12 g/L, 为后续的 OAH 的工业化生产提供了技术和理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

以本课题组构建并保藏的 *E. coli* HS33^[5] 为出发菌株, 构建系列基因工程重组菌用于生产 OAH。 *E. coli* W3110 和 DH5 α 分别用于目的片段扩增和 DNA 克隆。基因编辑质粒 pCas 和 pTarget 均购于 addgene, 其编号分别为#62225 和#62226, 基因组整合型编辑皆由上述 2 个质粒完成。其余质粒和菌株均由本实验室构建和保存。本研究所使用的主要菌株见表 1。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0。其对应的固体培养基是在液体培养基的基础上添加: 琼脂糖 20.0。灭菌条件为 115 °C、30 min 或 121 °C、20 min。

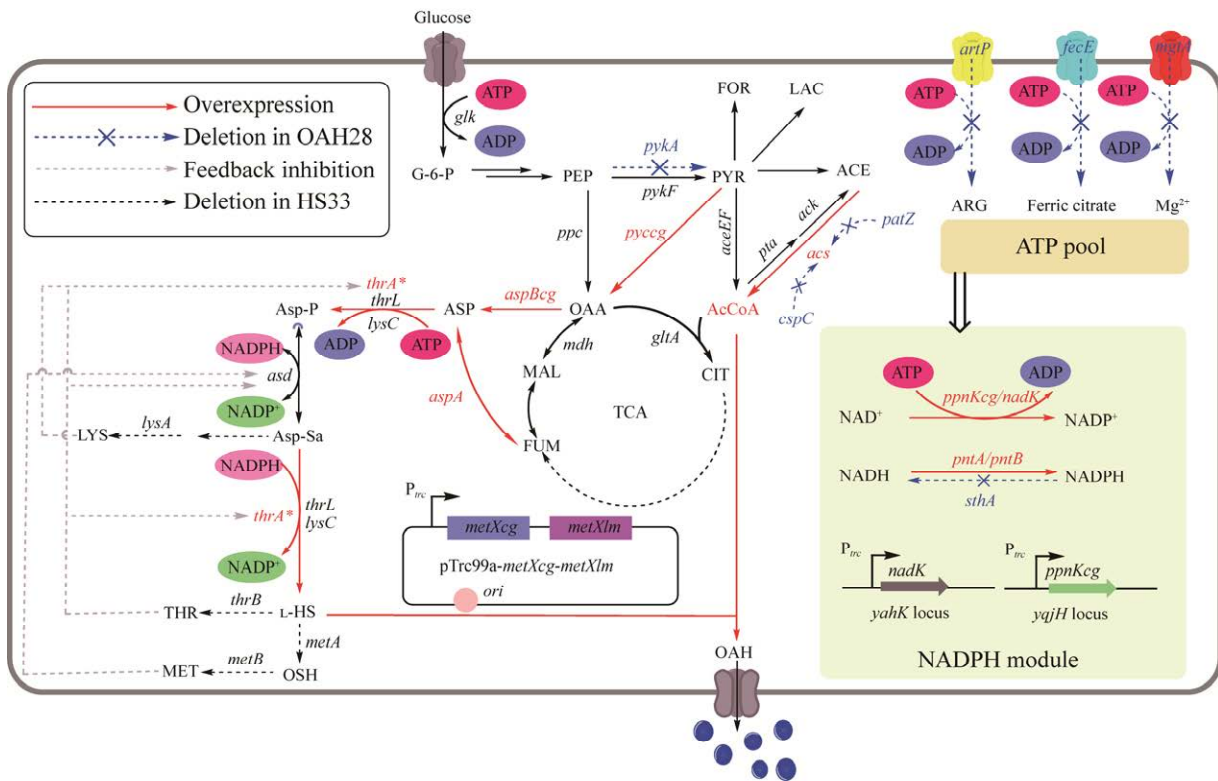


图 1 O-乙酰-L-高丝氨酸的合成途径及改造策略 ACE: 乙酸; ASP: 天冬氨酸; Asp-P: 天冬氨酸磷酸; Asp-Sa: 天冬氨酸半醛; ARG: 精氨酸; CIT: 柠檬酸; MET: L-甲硫氨酸; FOR: 甲酸; FUM: 富马酸; G-6-P: 葡萄糖-6-磷酸; LAC: 乳酸; L-HS: L-高丝氨酸; LYS: L-赖氨酸; MAL: 苹果酸; OAH: O-乙酰高丝氨酸; OAA: 草酰乙酸; OSH: O-琥珀酰高丝氨酸; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; PYR: 丙酮酸; TCA: 三羧酸循环; THR: 苏氨酸。

Figure 1 Synthesis pathway of O-acetyl-L-homoserine and modification strategies in this study. ACE: Acetic acid; ASP: Aspartic acid; Asp-P: Aspartic acid phosphate; Asp-Sa: Aspartic acid semialdehyde; ARG: Arginine; CIT: Citric acid; MET: L-methionine; FOR: Formic acid; FUM: Fumaric acid; G-6-P: Glucose-6-phosphate; LAC: Lactic acid; L-HS: L-homoserine; LYS: L-lysine; MAL: Malic acid; OAH: O-acetyl-L-homoserine; OAA: Oxaloacetic acid; OSH: O-succinyl-homoserine; PEP: Phosphoenolpyruvate; PYR: Pyruvic acid; TCA: Tricarboxylic acid cycle; THR: L-threonine.

摇瓶发酵培养基(g/L): 一水合葡萄糖 40, 硫酸铵 4.24, 酵母粉 6.82, 磷酸二氢钾 1, 碳酸钙 25, 无水硫酸镁 2, 七水硫酸亚铁 0.015, 七水硫酸锰 0.025, 一水硫酸锌 0.005, L-苏氨酸 20, L-赖氨酸 5, L-甲硫氨酸 2.5。其中 CaCO₃ 需要单独灭菌(115 °C, 30 min)。

培养基中抗生素浓度(mg/L): 硫酸卡那霉素 50, 盐酸壮观霉素 50。

5 L 罐发酵培养基(g/L): 一水合葡萄糖 15, 硫酸铵 17, 酵母粉 5, 磷酸二氢钾 1, 无水硫酸镁 2, 七水硫酸亚铁 0.015, 七水硫酸锰 0.025, 一水硫酸锌 0.005, L-苏氨酸 0.4, L-甲硫氨酸 0.2, L-赖氨酸 0.1, 消泡剂 0.1%, 灭菌条件为 115 °C、30 min。

5 L 罐补料培养基(g/L): 一水合葡萄糖 500, 硫酸铵 10, 酵母粉 5, 磷酸二氢钾 12.5, 无水硫

表 1 本研究使用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Description	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	General cloning host	Lab store
<i>E. coli</i> W3110	Wild type, F-, λ -, <i>IN</i> (<i>rrnD-rrnE</i>)1, <i>rph</i> -1	<i>Escherichia coli</i> Genetic Stock Center
HS33	<i>E. coli</i> Δ IJB* Trc-metL Δ lysA Δ lacI::Trc-rhtA Trc-rhtA Trc-eamA Δ iclR Δ ptsG Δ galR Trc-glk Trc-gltB	[5]
HS34	HS33, <i>metI</i> ^{rec}	This study
OAH1	HS34, pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH2	OAH1, Δ pykA/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH3	OAH1, pTrc99a(K)- <i>metXcg-pyc</i>	This study
OAH4	OAH1, pTrc99a(K)- <i>metXcg-aspB-aspA</i>	This study
OAH5	OAH1, Δ yaY::Trc- <i>thrA</i> ^{C1034T} - <i>metXcg</i>	This study
OAH6	OAH2, Δ yaY::Trc- <i>thrA</i> ^{C1034T} - <i>aspB-aspA-pyc</i> /pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH7	OAH6, Δ sthA/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH8	OAH6, Δ sthA::pntA-pntB/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH9	OAH6, Δ yahK:: <i>nadK</i> /pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH10	OAH6, Δ yqjH:: <i>ppnK</i> /pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH11	OAH6, Δ artP/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH12	OAH6, Δ mgTA/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH13	OAH6, Δ fecE/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH14	OAH8, Δ yahK:: <i>nadK</i> /pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH15	OAH14, Δ yqjH:: <i>ppnK</i> /pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH16	OAH15, Δ artP/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH17	OAH16, Δ mgTA/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH18	OAH17, Δ fecE/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH19	OAH18, Δ patZ/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH20	OAH19, Δ cspC/pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH21	OAH20, Trc- <i>acs</i> /pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	This study
OAH22	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXlm</i>	This study
OAH23	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXlsp</i>	This study
OAH24	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXlsa</i>	This study
OAH25	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXce</i>	This study
OAH26	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXch</i>	This study
OAH27	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXlb</i>	This study
OAH28	OAH21/pTrc99a(K)- <i>metXcg-metXlm</i>	This study

酸镁 2, 七水合硫酸亚铁 0.015, 七水合硫酸锰 0.025, 一水和硫酸锌 0.005, L-苏氨酸(L-threonine, L-Thr) 4, L-甲硫氨酸(L-methionine, L-Met) 0.5, L-赖氨酸(L-lysine, L-Lys) 1, 灭菌条件为 115 °C、

30 min。

1.3 OAH 工程菌株的发酵培养条件

1.3.1 种子液培养

一级种子液: 挑取 LB 平板上的单菌落接

种至装有 3 mL 液体 LB 培养基的试管中, 并加入相应的抗生素进行培养作为一级种子液。一级种子液的培养条件为 37 °C、180 r/min 振荡培养 10–12 h。

二级种子液: 按照 2% (体积比) 接种量将一级种子液接种于含 200 mL LB 的 500 mL 摇瓶中, 根据需要在摇瓶中添加终浓度为 50 mg/L 卡那霉素, 在 37 °C、180 r/min 条件下将菌体培养至对数期, 约 8 h。

1.3.2 发酵培养

摇瓶发酵: 吸取 2.5 mL 一级种子液到含 50 mL 摇瓶发酵培养基的 500 mL 摇瓶中, 然后加入 0.75 g 无菌碳酸钙固体, 根据需要在摇瓶中添加终浓度为 50 mg/L 卡那霉素, 每组设置 3 个平行。将接种后的摇瓶置于 30 °C、150 r/min 的摇床中振荡培养 72 h。

5 L 发酵罐分批补料发酵: 以 10% 的接种量将二级种子液接种至装液量为 2 L 的 5 L 发酵罐中, 初始培养条件为: 温度 31 °C, 通气比为 2 vvm (通气量/装液量), 转速 300 r/min, pH 6.80。发酵过程以 50% 氨水控制 pH。待菌体好氧浓度降至 10% 时启动溶氧联动控制, 溶氧联动阈值设定为 5%, 即当溶氧高于 15% 时开始补料。培养过程中添加终浓度为 50 mg/L 的卡那霉素。定时取样检测菌体生长情况和残糖、有机酸和 OAH 等含量。

1.4 基因编辑

采用 CRISPR-Cas9 系统对大肠杆菌进行基因敲除和敲入。根据靶基因序列分别设计 20 bp 前导序列和目标基因左右两翼的 500 bp 同源臂。根据 pCas 和 pTarget 使用流程^[12]进行标准化操作。

1.5 重组质粒的构建

根据靶基因序列, 分别设计扩增线性化 pTarget 与目的基因的引物对: LF/LR 和 TF/TR。

以质粒和细菌基因组 DNA 为模板, 分别扩增线性化质粒和目的基因。经过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。获得目的片段后, 在扩增产物中加入 1 μL 的限制性内切酶 *Dpn* I, 5 μL 的限制性内切酶 *Dpn* I buffer, 于 37 °C 消化 60 min。取消化后的片段进行 DNA 纯化回收, 并用 NanoDropTM One 测定片段浓度和纯度。将目的基因与线性化质粒载体进行一步克隆, 其配比按公式计算: 线性化质粒载体(μg)=序列长度×0.02 (μg); DNA 片段(μg)=序列长度×0.04 (μg)。根据回收的浓度计算纯化后载体与片段的添加量 V1、V2, 一步克隆条件为: 37 °C 30 min。随后将一步克隆产物转化至制备好的 *E. coli* DH5α 感受态中, 待平板长出单菌落后, 进行菌落 PCR 和测序验证。测序结果正确后挑取正确的单菌落接种于 10 mL LB 试管中, 37 °C、180 r/min 过夜培养, 根据质粒提取手册提取重组质粒。本研究用到的质粒见表 2 引物信息已提交至国家微生物科学数据中心(登录号: NMDCX0000285)。

1.6 分析方法

对发酵液进行离心处理, 沉淀用来测量细胞密度, 上清液用来测量葡萄糖、氨基酸和有机酸的浓度。生物量(OD_{600})由 Ultrospec 3100 分光光度计检测。葡萄糖浓度测定采用葡萄糖检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。氨基酸浓度测定采用 SykamS-433D 氨基酸分析仪。有机酸采用赛默飞世尔科技(中国)有限公司超高压液相色谱仪测定; 色谱柱为 Aminex[®] HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 0.25 μm), (洗脱程序: 紫外检测器检测波长 200 nm, 进样量 20 μL, 柱温 60 °C, 流速 0.6 mL/min, 流动相 8 mmol/L H₂SO₄)。分别采用 NADP⁺/NADPH 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)和 ATP 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

司)检测细胞内的 NADPH 和 ATP 的含量。

1.7 数据处理

本次实验中每组实验数据均由 3 次重复实验得到, 实验获得的数据用平均值±标准差(mean±SD)表示。采用 Origin 2018 进行图表绘制。

表 2 本研究所用到的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Genotype	Sources
pTrc99a(K)	pTrc99a (replace Amp ^R with Kan ^R)	Lab store
pTrc99a-D(bs)AB(cg)C(cg)	pTrc99a(K)-D(bs)AB(bs), contains gene <i>panD</i> from <i>B. subtilis</i> , contains genes <i>pyc</i> , <i>aspB</i> from <i>C. glutamicum</i> , contains gene <i>aspA</i> from <i>E. coli</i>	Lab store
pTrc99a(K)- <i>metXcg</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	This study
pTrc- <i>metXcg-pykA</i>	pTrc99a(K)- <i>metXcg</i> contains gene <i>pykA</i> from <i>E. coli</i>	This study
pTrc- <i>metXcg-pyc</i>	pTrc99a(K)- <i>metXcg</i> contains gene <i>pyc</i> from <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	This study
pTrc- <i>metXcg-aspB-aspA</i>	pTrc99a(K)- <i>metXcg</i> contains genes <i>aspB</i> , <i>aspA</i> from pTrc99a-D(bs)AB(cg)C(cg)	This study
pTrc- <i>metXcg-aspB-aspA-pyc</i>	pTrc99a(K)- <i>metXcg</i> contains genes <i>aspB</i> , <i>aspA</i> , <i>pyc</i> from pTrc99a-D(bs)AB(cg)C(cg)	This study
pTarget- $\Delta ygaY::Trc-thrA^{C1034T}$	pMB1aadAsgRNA- <i>ygaY::Trc-thrA^{C1034T}</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta ygaY::Trc-thrA^{C1034T}$ - <i>aspB-aspA-pyc</i>	pMB1aadAsgRNA- <i>ygaY::Trc-thrA^{C1034T}</i> - <i>aspB-aspA-pyc</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta artP$	pMB1aadAsgRNA- <i>artP</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta fecE$	pMB1aadAsgRNA- <i>fecE</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta mgtA$	pMB1aadAsgRNA- <i>mgtA</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta yqjH$	pMB1aadAsgRNA- <i>yqjH</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta yahK$	pMB1aadAsgRNA- <i>yahK</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta sthA$	pMB1aadAsgRNA- <i>sthA</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta yqjH::Trc-ppnK$	pMB1aadAsgRNA- <i>yqjH::Trc-ppnK</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta yahK::Trc-nadK$	pMB1aadAsgRNA- <i>yahK::Trc-nadK</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta sthA::Trc-pntAB$	pMB1aadAsgRNA- <i>sthA::Trc-pntAB</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta patZ$	pMB1aadAsgRNA- <i>patZ</i> , SD ^R	This study
pTarget- $\Delta cspC$	pMB1aadAsgRNA- <i>cspC</i> , SD ^R	This study
pTrc99a(K)- <i>metXlm</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>Leptospira meyeri</i>	This study
pTrc99a(K)- <i>metXlsp</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>Leptospira</i> sp.	This study
pTrc99a(K)- <i>metXlsa</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>Leptospira santarosai</i>	This study
pTrc99a(K)- <i>metXce</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314	This study
pTrc99a(K)- <i>metXch</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>Corynebacterium humireducens</i> NBRC 106098=DSM 45392	This study
pTrc99a(K)- <i>metXlb</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>Leptospira interrogans</i> serovar <i>Bataviae</i> str. HAI135	This study
pTrc99a(K)- <i>metXcg-metXlm</i>	pTrc99a(K), Kan ^R , contains <i>metX</i> from <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 and <i>L. meyeri</i>	This study

2 结果与分析

2.1 OAH 生物合成途径的构建与强化

以实验室前期构建的 HS33 为出发菌株, 将 *metI* 基因回补, 恢复其 L-甲硫氨酸内运能力, 改善细胞生长, 获得 HS34 菌株。在该菌株中

用 pTrc99a 质粒导入谷氨酸棒杆菌来源的 *metX* (OAH1), 其摇瓶 OAH 产量达 9.81 g/L (图 2), 说明其具有良好的 OAH 生产潜能。OAH 合成过程中, L-HS 和乙酰辅酶 A 两个前体可竞争性利用丙酮酸, 且丙酮酸仅需一步反应即可合成乙酰辅酶 A, 具有更高效的拉动力, 可能导致碳流分配不平衡, 因此需要对丙酮酸的积累进行弱化。磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 通过丙酮酸激酶 (*pykA* 和 *pykF* 编码) 催化合成丙酮酸 (pyruvic acid, PYR)。Li 等^[4] 敲除基因 *pykA* 后 OAH 积累达到 8.29 g/L, 在此基础上进一步敲除 *pykF*, 目标产物产量下降至 6.43 g/L, 说明完全阻断 PYR 合成途径不利于 OAH 积累。因此在 OAH1 基础上敲除 *pykA*, OAH 产量达到 11.25 g/L (OAH2), 比对照组提升了 14.7%, 乙酸含量从原来 3.68 g/L 降低至 2.91 g/L (图 2), 说明削弱 PYR 合成可以减少杂酸的积累, 同时也可重新分配 PYR/PEP 节点的碳通量, 从而利于 OAH 的合成。

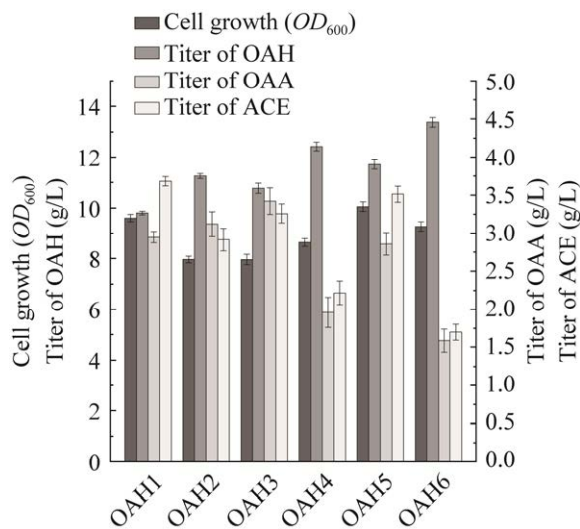


图 2 OAH 主合成途径强化对工程菌株生产及有机酸积累的影响

Figure 2 Effects of main synthetic pathway enhancement on OAH production and organic acid accumulation of the engineered strains.

OAA 作为 TCA 循环的中间体, 是 ASP 合成的关键前体。研究表明谷氨酸棒杆菌来源的丙酮酸羧化酶 PYC 能够将 1 分子 PYR 转化为 OAA, 同时可固定 1 分子 CO_2 , 具有原子经济性, 因此过表达 *pyc* 得到菌株 OAH3。该菌株 OAH 的产量比对照 (OAH1) 提升了 9.8%, 达到 10.77 g/L。此外, OAA 的含量也提升至 3.42 g/L, 乙酸积累量降低至 3.26 g/L (图 2), 但该工程菌株的最大生长 OD_{600} 降至 7.96, 可能是 PEP 被竞争用于合成 OAA 降低了 PYR 的供应, 从而导致菌体量下降。随后, 进一步测试了强化 ASP 合成途径对 OAH 积累的影响, 该途径可分别由 AspC 和/或 AspA 参与^[13]。通过在 OAH1 中组合表达谷氨酸棒杆菌来源的 *aspB* (*aspC* 同源基因) 与内源性 *aspA* 基因使得菌株 OAH4 产量比对照提升了 26.4%, 达到 12.40 g/L。由于 OAA 到 ASP 合成途径的增强, 菌株 OAH4 的 OAA 含量降低至 1.96 g/L (图 2), 乙酸含量也进一步减少了 1.46 g/L, 说明过表达 *aspB* 和 *aspA* 增强了 OAH 主代谢途径, 将更多的碳流拉向目标产物合成, 而用于菌体生长的碳流相对减少, 导致 OAH4 菌体量比对照下降 10.0%。ASP 合成 L-HS 需要天冬氨酸激酶, 天冬氨酸半醛脱氢酶和高丝氨酸脱氢酶参与, 其中由 *thrA* 所编码的天冬氨酸激酶被证明为 L-HS 合成途径的关键限速基因。为进一步将碳流从 ASP 拉向 L-HS, 将 P_{trc} 驱动的解除反馈抑制的 *thrA*^{C1034T} 整合至 OAH1 的假基因位点 *ygaY* 上, 构建了菌株 OAH5。该菌株的发酵结果显示, 过表达 *thrA*^{C1034T} 将 OAH 产量提升至 11.72 g/L, 提升了 19.5%, 并且菌株的生物量相对于对照菌株没有明显变化。

将测试的有效位点 (*aspB*, *aspA*, *pyc*, *thrA*^{C1034T}) 以 P_{trc} 启动子驱动串联整合至 OAH2 的假基因位点 *ygaY* 上, 获得 OAH6 菌株。发酵结果显示

这些位点的组合强化可将 OAH 产量提升至 13.37 g/L, 与对照组相比, 尽管细胞生长略有下降, 但 OAH 的产量增加了 36.3%。有机酸含量检测显示, 工程菌株 OAH6 的 OAA 含量降低至 1.59 g/L, 乙酸积累 1.70 g/L (图 2), 表明同时组合强化各节点, 可以有效拉动代谢碳流, 减少中间代谢副产物的生成, 从而获得性能良好的 OAH 出发菌株。

2.2 NADPH 与 ATP 协同供应改善底盘菌合成 OAH

在 OAH 合成代谢途径中, 关键前体 L-HS 的合成依赖于 NADPH 和 ATP 的供应。围绕 NADPH 供应问题, 在 OAH6 菌株中分别构建了 *sthA* 敲除以及在该位点整合由 P_{irc} 启动子驱动的 *pntAB* 基因的菌株 OAH7 和 OAH8; 发酵结果显示, 与 OAH6 相比, OAH7 的产量提升了 5.8%, 达到 14.15 g/L, 而 OAH8 的产量提升更为显著, 为 14.50 g/L; 对其胞内的还原力进行检测, OAH7 的 NADH 浓度从 0.29 $\mu\text{mol/L}$ 降

低至 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 而 NADPH 浓度无显著变化; OAH8 中的 NADPH 浓度从 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 提升至 0.20 $\mu\text{mol/L}$, 同时 NADH/NADPH 的值降低 52.9%。以上结果验证了转氢酶系统重构可有效提升胞内 NADPH 含量, 为细胞积累 OAH 提供正向驱动力。为进一步改善胞内还原力供应, 拟对 NADPH 进行开源节流。研究表明, 大肠杆菌基因组存在 80 个编码消耗 NADPH 酶的基因, 其中部分基因的敲除不会影响细胞的生长^[14], 如 *yahK*、*yqjH*。此外, 大肠杆菌中由 *nadK* 基因编码的 NAD 激酶是胞内唯一一种能够利用 ATP 作为磷酸供体将 NAD^+ 磷酸化 NADP^+ 的酶; 谷氨酸棒杆菌的 *ppnK* 与 *nadK* 具有相同作用。因此, 在 OAH6 的基础上, 分别在 *yahK* 与 *yqjH* 基因位点整合 *nadK* 与 *ppnK*, 获得的 OAH9 和 OAH10 产量分别提升至 14.37 g/L 和 14.46 g/L, 但细胞生长对比底盘菌株 OAH6 分别降低了 5.2% 与 5.0% (图 3A、3B)。

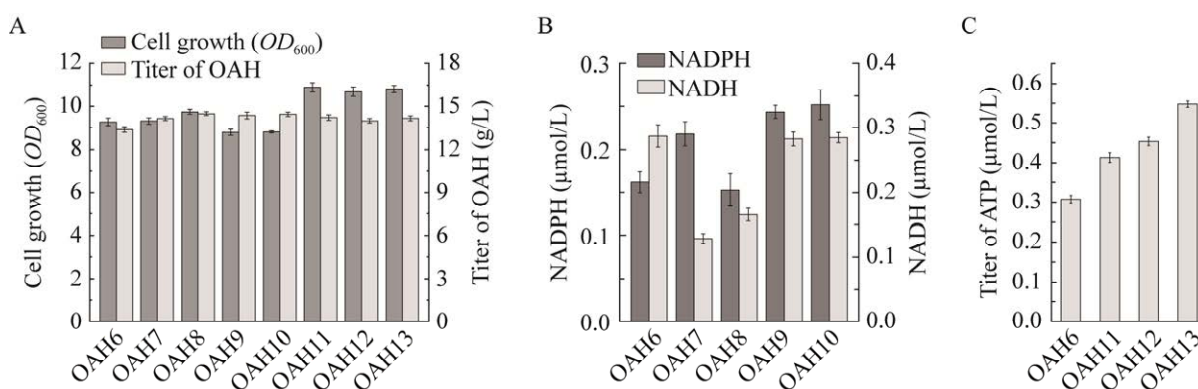


图 3 胞内 NADPH 和 ATP 消耗/供应基因筛选 A: NADPH 和 ATP 消耗/供应基因敲除或表达对工程菌株生长和生产的影响; B: 工程菌株胞内 NADPH/NADH 含量检测; C: 工程菌株胞内 ATP 含量检测。

Figure 3 Screening of intracellular NADPH and ATP depletion/supply genes. A: Effects of enhancing NADPH and ATP supply on the growth and production of the engineered strains; B: Detection of the intracellular NADPH/NADH content of the engineered strains; C: Detection of intracellular ATP level of the engineered strain.

在上述的改造过程中,一方面因为引入了 ATP 消耗基因供应还原力,另一方面 OAH 合成途径中部分催化过程也涉及 ATP 消耗,如葡萄糖的磷酸化等。有研究表明,在大肠杆菌中存在 400 个编码消耗 ATP 酶的基因,抑制其中 19 个基因,可以增加 4-羟基苯乙酸的产量^[14]。基于先前的研究,选取 *artP*、*mgtA* 和 *fecE* 进行敲除,获得的 OAH11、OAH12 与 OAH13 较于出发菌株 OAH6 菌体量分别提升了 13.5%、12.7%与 11.4%,胞内 ATP 水平从 0.31 $\mu\text{mol/L}$ 分别提升至 0.51、0.58 和 0.54 $\mu\text{mol/L}$ (图 3A、3C),相应地,OAH11、OAH12 与 OAH13 中 OAH 的积累量分别达到 14.22、14.17 和 13.98 g/L,上述结果说明减少 ATP 消耗有助于改善工程菌株的生长性能,从而提高 OAH 的合成能力。

基于还原力和 ATP 供应位点的筛选,在 OAH8 中逐步叠加上述基因工程改造位点,得到系列工程菌株 OAH14、OAH15、OAH16、OAH17 和 OAH18。在有效位点的整合过程中,OAH 的含量呈现逐步增加的趋势,OAH18 达

到了 15.79 g/L,比 OAH8 增加 1.29 g/L。当仅叠加还原力供应相关的基因工程改造时(菌株 OAH8、OAH14 和 OAH15),细胞生长会受到部分抑制, OD_{600} 值下降 4.4%,但对 OAH 的积累无显著负面影响。重组菌株 OAH15 胞内 NADH 浓度没有发生显著性变化,NADPH 浓度从 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 提升至 0.25 $\mu\text{mol/L}$ (图 4),推测是 NAD 激酶途径需要与细胞生长竞争 ATP,不仅影响细胞生长,还限制了 NAD^+ 转化为 NADP^+ 。当限制胞内 ATP 消耗时,重组菌株 OAH16、OAH17 和 OAH18 的生物量得到缓解,较出发菌株升高约 8.5%–24.1%。OAH18 胞内的 NADPH 水平提升至 0.38 $\mu\text{mol/L}$,NADH/NADPH 的值较出发菌株 OAH8 降低 9.9% (图 4),且 NADPH 与 NADH 的总量均有显著提升,证实了 ATP 供应不足导致 NADPH 水平没有显著提升的推测。以上结果表明协同提升 NADPH 与 ATP 供应的辅因子工程,对工程菌株积累 OAH 具有非常显著的正向作用,可以在不损害细胞生长的前提下完成 NADPH 的供应,从而促进目标产物的高效合成。

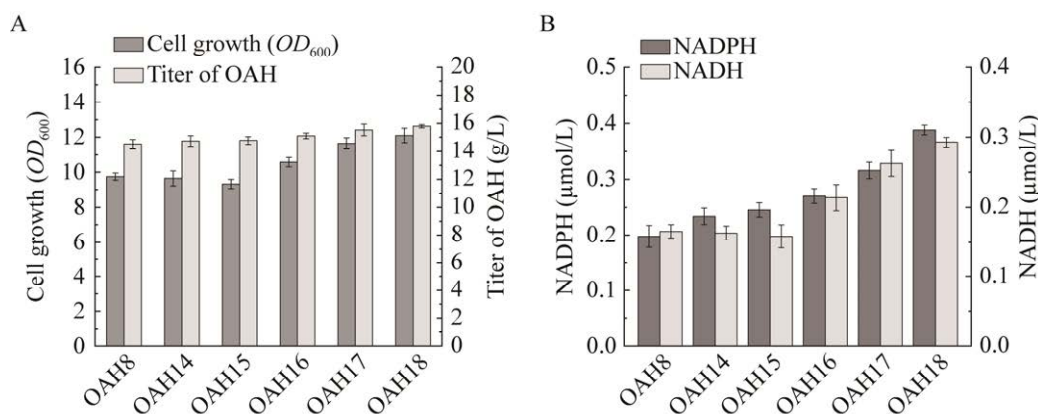


图 4 协同供应 NADPH 和 ATP 对菌株生产性能的影响 A: 工程菌株生长生产性能分析; B: 工程菌株胞内 NADPH/NADH 含量检测。

Figure 4 Effect of synergistically supplying NADPH and ATP on the productive performance of the engineered strains. A: Analysis of growth and production performance of the engineered strains; B: Detection of the intracellular NADPH/NADH content of the engineered strains.

2.3 乙酸回用增强乙酰辅酶 A 供应对菌株生产性能的影响

为了进一步测试评估重组菌株的生产能力, 将 OAH18 作为出发菌株在 5 L 发酵罐中进行分批补料发酵(图 5A)。在 68 h 的发酵过程中, OAH 的产量在 56 h 以前随着细胞的不断增长而不断积累, 最高达到 29.50 g/L, 相较于摇瓶提升 62.8%, 糖酸转化率为 0.18 g/g 葡萄糖, 生产强度为 0.27 g/(L·h)。发酵过程中随着糖的不断摄入, 细胞总量稳定增加, 但在发酵初期(0–20 h), OAH 积累量极低。随着 OAH 的产生, L-HS 也在稳步积累; 当发酵液中碳源耗尽时, OAH 容易被分解以维持细胞活性。有机酸的检测结果显示: 发酵过程中, 细胞在合成 OAH 的过程中伴随着大量乙酸的积累, 最高可达 16.84 g/L, 而丙酮酸的积累量只有 3.75 g/L (图 5B)。此外, 该重组菌株在整个发酵过程中均有一定量 L-HS 的积累(摇瓶水平并未发现)。以上结果表明 OAH18 菌株中 L-高丝氨酸前体合成供应充足, 可能是 MetX 的转化效率与前体乙酰辅酶 A 的供应不足, 影响了 L-HS 到

OAH 的转化过程。需要指出的是, 乙酸积累一方面抑制工程菌株细胞生长; 另一方面会消耗乙酰辅酶 A, 造成 OAH 合成前体的浪费^[15]。

在大肠杆菌中, 乙酸可通过 ACS 催化转化为乙酰辅酶 A。因此, 对工程菌 OAH18 的乙酸回用途径进行改造, 先后敲除 *patZ* 和 *cspC* 基因, 并将编码乙酰辅酶 A 合成酶 *acs* 基因启动子原位替换为 P_{trc} 启动子, 分别获得 OAH19、OAH20 和 OAH21, 其摇瓶发酵的细胞生长情况未发生显著变化, 主要是因为摇瓶的乙酸含量较低, 尚未产生毒性。OAH19、OAH20 和 OAH21 的 OAH 产量分别可达 16.20、16.45 和 16.82 g/L (图 5C), 较 OAH18 分别提升了 2.6%、4.2% 和 6.5%, 说明乙酸回用途径对 OAH 的积累具有提升作用。对 3 株菌在摇瓶发酵产生的乙酸含量检测表明, 敲除 *patZ* 后阻断细胞磷酸乙酰基转移酶的合成表达, 乙酸含量从 1.23 g/L 下降至 1.02 g/L; 在此基础上敲除 *cspC* 基因和过表达 *acs* 基因可使乙酸含量进一步下调至 0.90 g/L 和 0.55 g/L (图 5C), 由此证明工程菌株在发酵过程中乙酸回用确实得到了加强。

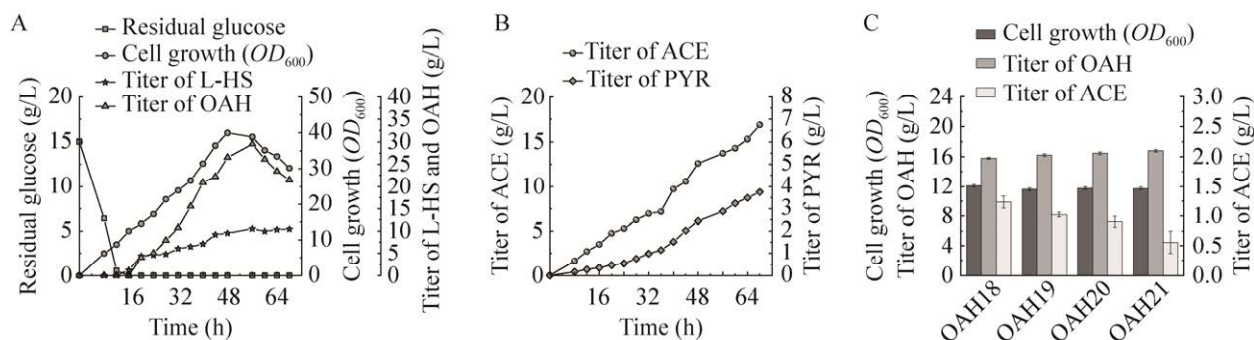


图 5 工程菌 OAH18 5 L 罐发酵过程控制及其乙酸回用途径强化 A: 工程菌 OAH18 发酵过程参数; B: OAH18 菌株发酵过程丙酮酸和乙酸含量; C: 敲除 *cspC*、*patZ* 以及过表达 *acs* 对菌株生产性能和乙酸积累的影响。

Figure 5 Fed-batch fermentation of the engineered strain OAH18 in 5 L bioreactors and its acetic acid reuse route enhancement. A: Fermentation process parameters of OAH18; B: PYR and ACE contents of OAH18; C: Effects of knockout of *cspC* and *patZ* and overexpression of *acs* on the production performance and acetic acid accumulation of the engineered strains.

2.4 OAH 合成关键酶 MetX 异源筛选和组合表达对 OAH 合成的影响

MetX 参与 OAH 合成的最后一步, 其活性和表达量都决定了 OAH 的合成强度。来自钩端螺旋体属的 *L. meyeri* 和 *C. glutamicum* 的 MetX 具有 OAH 合成活性^[7]。因此, 本研究分别以 *C. glutamicum*、*L. meyeri* 和问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans* serovar) 来源的 MetX 为模板, 通过 NCBI 中的蛋白质序列比对 (basic local alignment search tool, BLAST), 筛选出高效棒状杆菌 (*Corynebacterium efficiens*) YS-314、腐殖还原棒状杆菌 (*Corynebacterium humireducens*) NBRC 106098、钩端螺旋体属 (*Leptospira* sp.)、问号钩端螺旋体 (*L. interrogans* serovar)、赛塔罗塞钩端螺旋体 (*Leptospira santatosai*) 共计 6 株与模板同源性大于 70% 的序列, 将其分别构建在 pTrc99a 质粒上并导入菌株 OAH21 替换谷氨酸棒状杆菌来源的 *metX*, 摇瓶发酵测试显示表达来自迈氏钩端螺旋体 MetX 的菌株 OAH22 的产量仅次于 OAH21 (表达谷氨酸棒状杆菌来源的 MetX), 而 5 种其他来源的 MetX 虽然表现出了合成 OAH 的能力, 但均有不同程度的 L-HS 积累。以上结果说明, 在 MetX 活性方面 *C. glutamicum* 和 *L. meyeri* 来源的基本相当。因此进一步将 *C. glutamicum* 和 *L. meyeri* 来源的 MetX 以串联重复的形式连接至 pTrc99a 质粒, 并导入菌株 OAH21 中得到工程菌株 OAH28, 其 OAH 产量提升了 0.67 g/L, 达到 17.49 g/L (图 6), 说明多源同工酶在同一个细胞中的表达可能弱化底物的反馈抑制作用, 从而提升了 OAH 产量。

2.5 工程菌 5 L 罐发酵性能评估

为进一步评估工程菌株 OAH28 规模化生产 OAH 的潜力, 采用分批补料发酵调控策略在 5 L 罐中进行生产性能测试 (图 7)。在叠加表达两种来源的 *metX* 后, 工程菌株 OAH28 在发酵

72 h 时生长浓度达到最高 $OD_{600}=56.8$ 。发酵至 80 h 时, OAH 积累量最高, 为 47.12 g/L, 此时糖酸转化率为 0.32 g/g 葡萄糖, 生产强度为 0.59 g/(L·h) (图 7A)。与 OAH18 菌株相比, 其产量提升了 29.6%, 说明乙酰辅酶 A 供应和多源 MetX 强化策略对于 OAH 合成有正向促进作用。此外, 在整个发酵进程中无 L-HS 的积累, 各类有机酸如乙酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸等的积累量在发酵结束时均低于 3.00 g/L (图 7B)。由于菌株为氨基酸缺陷型, 在发酵过程中额外添加了 L-Thr、L-Met、L-Lys 这 3 种氨基酸, 导致在发酵前中期细胞生长浓度较低的情况下, 发酵液中能检测到部分 L-Thr 的残留, 最高达到了 1.62 g/L; 而在发酵结束时, 仍能检测到 L-Met 与 L-Lys 的剩余, 由此推测菌体在发酵培养的前期对 L-Thr 的需求量略低于后期, 而细胞对 L-Met 和 L-Lys 的需求在整个发酵过程中较为稳定。

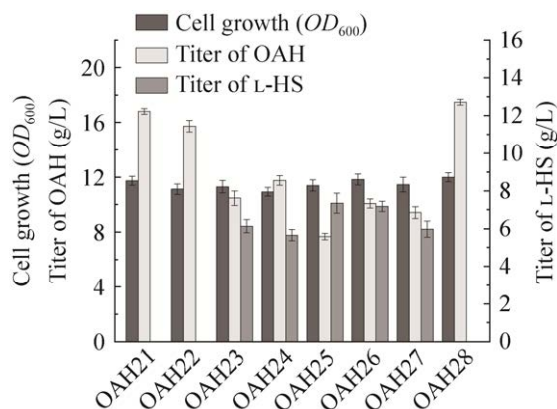


图 6 不同来源的 MetX 过表达对工程菌株生产性能的影响

Figure 6 Effects of overexpressing MetX from different species on production performance of the engineered strains.

3 讨论与结论

本研究以实验室保藏的 HS33 作为底盘菌株, 通过主合成路径强化、辅因子再生以及乙

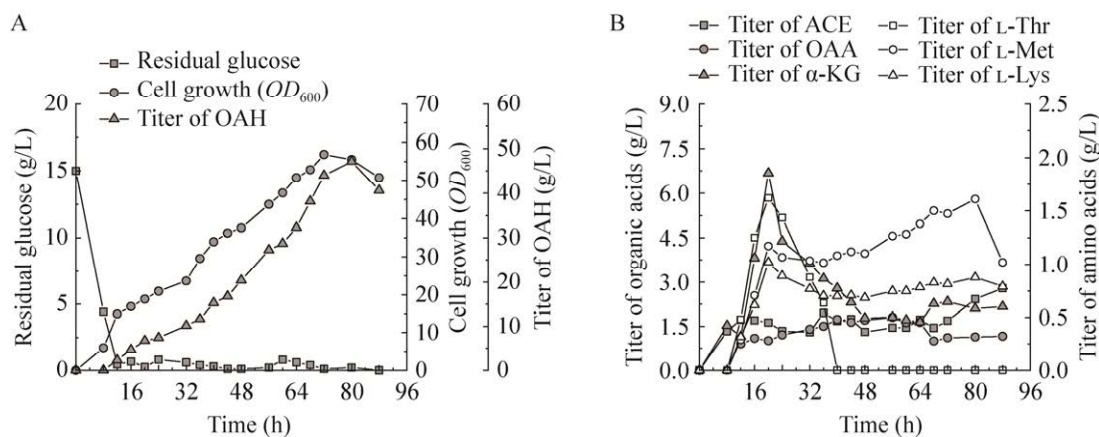


图7 大肠杆菌工程菌 OAH28 5 L 发酵罐分批补料发酵 A: OAH28 菌株发酵过程参数; B: OAH28 菌株发酵过程主要有机酸及氨基酸含量。

Figure 7 Fed-batch fermentation of the engineered strain OAH28 in 5 L bioreactor. A: Fermentation process parameters of OAH28; B: Main organic acids and amino acids content of OAH28.

酸回用策略成功构建了 1 株工程菌株 OAH28。该菌株在摇瓶中发酵 OAH 产量可达到 17.49 g/L。在 5 L 发酵罐中经分批补料发酵, OAH 的产量、得率和生产强度分别达到了 47.12 g/L、0.32 g/g 葡萄糖和 0.59 g/(L·h), 具有良好的工业化应用潜力。

L-HS 是 OAH 合成的主要前体之一, 且是 OAH 的碳骨架, 因此 OAH 代谢合成的关键限速节点与 L-HS 基本相同。上游途径中, PEP 和 PYR 之间的流量分配决定了碳原子的经济性^[17]。pykA 基因的敲除可以降低 PYR 的合成效率, 减少 PEP 的消耗, 使其更多地通过 PPC 一步合成 OAA, 缩短 L-HS 的合成路径, 此外还可降低以 PYR 为前体的其他有机酸的积累^[4]。为了提升 PYR 的利用效率, 引入谷氨酸棒杆菌来源的 PYC, 一方面减少 PYR 在 TCA 循环的碳原子损失, 另一方面帮助细胞呼吸作用产生的 CO₂ 被重新固定到 OAA 中, 从而提升碳原子利用率。在下游途径中, AspC 和 AspA 途径的平衡被认为是 L-HS 合成的关键节点, Mu 等^[13]采用核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)工

程匹配合适强度的 *apsA* 提升了合成前体 L-HS 的产量。本研究采用过表达 *aspA* 并匹配异源 *aspC* (*aspB_{cg}*) 以实现 OAA 和 FUM 合成 ASP 的平衡。此外, *thrA* 突变体的过表达是下游合成拉动力的重要来源。

辅因子工程是提升合成途径辅因子依赖性酶催化效率的有效策略, 可以实现目标产物代谢通量的最大化。在 *E. coli* 的 OAH 合成途径中, 辅因子的生成和消耗存在不平衡性: 每合成 1 分子的 OAH 需要消耗 2 分子 NADPH^[7], 因此, NADPH 的高效再生可能是影响 OAH 生物合成的限制因素之一。在 *E. coli* 中, 大多数增强 NADPH 供应的代谢工程策略主要集中在加强磷酸戊糖途径(过表达 *zwf1*、*gnd1* 等)和转氢酶系统(在 *sthA* 位点过表达 *pntAB*)^[13,18]。Mu 等^[13]在 L-HS 的工程化改造中证明了 *pntAB* 基因整合至 *sthA* 位点可以有效缓解高丝氨酸合成过程的还原力供应。然而, PPP 和转脱氢酶系统通量的增加导致了不可避免的碳流和能量消耗。因此, Wei 等^[7]将 NADP⁺ 依赖的丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 突变体引入工程

菌株, 将 OAH 产量提升了 10.6%, 为辅因子再生提供了新的策略。本研究在转氢酶系统基础上, 敲除了 NADPH 消耗基因 *yahK* 与 *yqjH*, 并整合了 *nadK* 与 *ppnK*, 使 NADP⁺ 得到充足供应, 将 OAH 产量提升至 14.46 g/L, 但 OD 值下降了 5.0%。考虑到 *nadK* 与 *ppnK* 供应 NADP⁺ 的过程消耗 ATP, 推测是 ATP 消耗造成的生长抑制。这一推测在后续敲除 ATP 消耗基因 *artP*、*mgtA* 和 *fecE* 积累 ATP 的工作中得到验证。本研究通过积累 ATP 池供应磷酸基团并与下游还原力供应系统形成微循环, 提供了新的面向 OAH 合成过程辅因子供应不足的解决方案。

在 OAH 发酵生产过程中, 发现 L-HS 有一定的积累, 这是由 L-HS 和乙酰辅酶 A 供应的强度不平衡造成的。大肠杆菌乙酰辅酶 A 的供应途径有很多, 其中乙酸回用是一种有效策略。乙酸的积累不仅浪费碳流, 还会造成菌株生长的抑制^[19]。对乙酸生成途径 *pta-ack* 基因的敲除会严重影响细胞生长^[20], 因此采用强表达 *acs* 减少乙酸积累, 同时增加乙酰辅酶 A 的供应成了 OAH 合成的首选方法。此外, Seong 等^[16]在对大肠杆菌乙酸盐耐受性驯化的过程中发现压力感应因子 *cspC* 和赖氨酸乙酰基转移酶基因 *patZ* 突变有助于菌株对乙酸耐受且利用效率大幅提升。本研究在此基础上, 发现 *cspC* 和 *patZ* 的敲除对乙酸回用确实具有正向效果。研究表明, CspC 通过上调 *rpoS* 的表达从而抑制 *acs* 的转录^[21], 而 PatZ 则编码赖氨酸乙酰基转移酶对 Acs 进行乙酰化修饰失活^[22], 并且它们的敲除还可供应 ATP^[16]。因此, 对它们的敲除从转录和翻译这 2 个维度对 Acs 进行了激活, 从而避免了使用异源 Acs。敲除 *cspC* 和 *patZ* 表现的正向促进作用, 为 OAH 工程菌株的构建提供了新的改造参考位点。平衡强化 L-HS 和乙酰辅酶 A 供应为最后一个关键酶 MetX 提供丰富的前

体, 但其活性和表达量限制了其生产效率。比较了不同来源的 MetX, 进一步确认了 *C. glutamicum* 和 *L. meyeri* 来源的 MetX 具有最优的活性, 并且将其组合表达对 OAH 合成具有更好的效果。

本研究采用的系统代谢工程改造策略显著改善了菌株生长和生产状况, 获得了摇瓶水平的已知报道最高产量, 但 5 L 罐的放大结果在产量、转化率和生产强度上皆弱于 Wei 等^[7]报道的工作, 可能的原因在于出发宿主 HS33 敲除了 L-苏氨酸、L-亮氨酸以及 L-甲硫氨酸合成途径, 是一株严格的氨基酸缺陷株, 导致发酵罐内控制工艺较为复杂, 后续可以从氨基酸合成途径动态回补或者发酵工艺优化这 2 个角度去改善菌株工业性能。此外, OAH 在发酵过程中还存在易降解的问题, 这也是影响其产量的重要因素之一, 可以考虑低 pH 或双阶段 pH 发酵控制工艺以维持其结构的稳定性。总体而言, 本研究为 OAH 菌株的改造和工业化生产奠定了基础, 也为代谢工程改造生产其他氨基酸提供了借鉴。

REFERENCES

- [1] HUANG JF, LIU ZQ, JIN LQ, TANG XL, SHEN ZY, YIN HH, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 843-851.
- [2] HONG KK, KIM JH, YOON JH, PARK HM, CHOI SJ, SONG GH, LEE JC, YANG YL, SHIN HK, KIM JN, CHO KH, LEE JH. O-succinyl-L-homoserine-based C4-chemical production: succinic acid, homoserine lactone, γ -butyrolactone, γ -butyrolactone derivatives, and 1,4-butanediol[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(10): 1517-1524.
- [3] LI YJ, WEI HB, WANG T, XU QY, ZHANG CL, FAN XG, MA Q, CHEN N, XIE XX. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1588-1602.
- [4] LI B, HUANG LG, YANG YF, CHEN YY, ZHOU XJ, LIU ZQ, ZHENG YG. Metabolic engineering and

- pathway construction for O-acetyl-L-homoserine production in *Escherichia coli*[J]. 3 Biotech, 2023, 13(6): 173.
- [5] LIU P, ZHANG B, YAO ZH, LIU ZQ, ZHENG YG. Multiplex design of the metabolic network for production of L-homoserine in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(20): e01477-20.
- [6] KAWANO Y, SUZUKI K, OHTSU I. Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize L-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(19): 8203-8211.
- [7] WEI L, WANG Q, XU N, CHENG J, ZHOU W, HAN GQ, JIANG HF, LIU J, MA YH. Combining protein and metabolic engineering strategies for high-level production of O-acetylhomoserine in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(5): 1153-1167.
- [8] YUAN SF, NAIR PH, BORBON D, COLEMAN SM, FAN PH, LIN WL, ALPER HS. Metabolic engineering of *E. coli* for β -alanine production using a multi-biosensor enabled approach[J]. Metabolic Engineering, 2022, 74: 24-35.
- [9] SU YW, GUO QQ, WANG S, ZHANG X, WANG J. Effects of betaine supplementation on L-threonine fed-batch fermentation by *Escherichia coli*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(10): 1509-1518.
- [10] LI H, WANG BS, ZHU LH, CHENG S, LI YR, ZHANG L, DING ZY, GU ZH, SHI GY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for L-homoserine production[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(12): 1973-1983.
- [11] LIN H, CASTRO NM, BENNETT GN, SAN KY. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6): 870-874.
- [12] XU JM, LI JQ, ZHANG B, LIU ZQ, ZHENG YG. Fermentative production of the unnatural amino acid L-2-aminobutyric acid based on metabolic engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 43.
- [13] MU QX, ZHANG SS, MAO XJ, TAO Y, YU B. Highly efficient production of L-homoserine in *Escherichia coli* by engineering a redox balance route[J]. Metabolic Engineering, 2021, 67: 321-329.
- [14] SHEN YP, LIAO YL, LU Q, HE X, YAN ZB, LIU JZ. ATP and NADPH engineering of *Escherichia coli* to improve the production of 4-hydroxyphenylacetic acid using CRISPRi[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 100.
- [15] GECSE G, LABUNSKAITE R, PEDERSEN M, KILSTRUP M, JOHANSON T. Minimizing acetate formation from overflow metabolism in *Escherichia coli*: comparison of genetic engineering strategies to improve robustness toward sugar gradients in large-scale fermentation processes[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1339054.
- [16] SEONG W, HAN GH, LIM HS, BAEK JI, KIM SJ, KIM D, KIM SK, LEE H, KIM H, LEE SG, LEE DH. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* lacking cellular byproduct formation for enhanced acetate utilization through compensatory ATP consumption[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 249-259.
- [17] LONG CP, AU J, SANDOVAL NR, GEBRESELASSIE NA, ANTONIEWICZ MR. Enzyme I facilitates reverse flux from pyruvate to phosphoenolpyruvate in *Escherichia coli*[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14316.
- [18] SUNDARA SEKAR B, SEOL E, PARK S. Co-production of hydrogen and ethanol from glucose in *Escherichia coli* by activation of pentose-phosphate pathway through deletion of phosphoglucose isomerase (*pgi*) and overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (*zwf*) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (*gnd*)[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 85.
- [19] PINHAL S, ROPERS D, GEISELMANN J, de JONG H. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(13): e00147-e00119.
- [20] ENJALBERT B, MILLARD P, DINCLAUX M, PORTAIS JC, LÉTISSE F. Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42135.
- [21] PHADTARE S, INOUE M. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(4): 1205-1214.
- [22] DE DIEGO PUENTE T, GALLEGO-JARA J, CASTAÑO-CEREZO S, BERNAL SÁNCHEZ V, FERNÁNDEZ ESPÍN V, GARCÍA DELA TORRE J, MANJÓN RUBIO A, CÁNOVAS DÍAZ M. The protein acetyltransferase PatZ from *Escherichia coli* is regulated by autoacetylation-induced oligomerization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(38): 23077-23093.