

理性设计和构建过量合成莽草酸的大肠杆菌代谢工程菌

李明明^{1,2}, 陈献忠^{1,2}, 周丽^{1,2}, 沈微^{1,2}, 樊游^{1,2}, 王正祥^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

李明明, 陈献忠, 周丽, 等. 理性构建过量合成莽草酸的大肠杆菌代谢工程菌. 生物工程学报, 2013, 29(1): 56–67.

Li MM, Chen XZ, Zhou L, et al. Rational design and construction of an overproducing shikimic acid *Escherichia coli* by metabolic engineering. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 56–67.

摘 要: 利用代谢工程手段理性改造野生大肠杆菌的莽草酸 (Shikimic acid, SA) 合成途径及相关代谢节点, 以构建高产莽草酸的工程菌株。根据细胞代谢网络分析, 利用 Red-Xer 重组系统连续删除了野生型大肠杆菌 CICIM B0013 的莽草酸激酶基因 (*aroL*、*aroK*), 葡萄糖磷酸转移酶系统 (PTS) 的关键组分 EIICBglc 的编码基因 (*ptsG*) 以及奎宁酸/莽草酸脱氢酶基因 (*ydiB*) 并系统评价了基因删除对细胞的生长、葡萄糖代谢和莽草酸积累的影响。*aroL*、*aroK* 的删除阻断了莽草酸进一步转化成为莽草酸-3-磷酸, 初步提高莽草酸的累积。删除 *ptsG* 基因使大肠杆菌 PTS 系统部分缺失, 细胞通过 GalP-glucose (半乳糖透性酶-葡萄糖激酶) 途径, 利用 ATP 将葡萄糖磷酸化后进入细胞。利用该途径运输葡萄糖能够减少 PEP 的消耗, 使得更多的碳代谢流进入莽草酸合成途径, 从而显著提高了莽草酸的产量。在此基础上删除 *ydiB* 基因, 阻止了莽草酸合成的前体物质 3-脱氢奎宁酸转化为副产物奎宁酸 (Quinic acid, QA), 进一步提高了莽草酸的累积。初步发酵显示 4 个基因缺失的大肠杆菌代谢工程菌生产莽草酸的能力比原始菌提高了 90 多倍。

关键词: 大肠杆菌, Red-Xer 重组系统, 基因删除, 莽草酸, 代谢工程

Received: August 1, 2012; **Accepted:** October 12, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21006039).

Corresponding author: Xianzhong Chen. Tel/Fax: +86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

Zhengxiang Wang. Tel/Fax: +86-510-85918121; E-mail: zxwang@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21006039) 资助。

Rational design and construction of an overproducing shikimic acid *Escherichia coli* by metabolic engineering

Mingming Li^{1,2}, Xianzhong Chen^{1,2}, Li Zhou^{1,2}, Wei Shen^{1,2}, You Fan^{1,2},
and Zhengxiang Wang^{1,2}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Shikimic acid (SA), as a hydroaromatic intermediate in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis, is the starting material for the synthesis of neuraminidase inhibitors and other useful compounds. The fermentative production of SA by metabolically engineered microorganisms is an excellent alternative to the extraction from fruits of the *Illicium* plant. In this study, *Escherichia coli* was metabolically engineered by rational design and genetic manipulation for fermentative production of SA. Firstly, blocking the aromatic amino acid pathway after the production of SA was carried out by deletion of *aroL* and *aroK* genes encoding SA kinase. Secondly, the *ptsG* gene encoding protein EIICB^{glc} were removed in the *aroL/aroK* mutant strain to make the phosphotransferase system (PTS) system default. In the resulting strain, the phosphoenolpyruvate-dependent PTS pathway, a main pathway for glucose transport, were replaced by ATP-dependent GalP (galactose permease). Thus, more PEP flux was used to produce SA as a critical precursor of SA. Furthermore, *ydiB* gene (encoding quinic acid/SA dehydrogenase) was deleted to prevent SA precursors of 3-dehydroquinic acid into the byproduct of quinic acid. Thus, the engineered strain with four genes deletion was constructed and 576 mg/L SA was produced in the shake flask fermentation. Results show that SA production was increased 90 times compared to the parent strain *E. coli* CICIM B0013.

Keywords: *Escherichia coli*, Red-Xer recombination, gene knockout, shikimic acid, metabolic engineering

莽草酸是芳香族氨基酸和一些手性化合物合成的重要中间体^[1], 本身具有众多的生理功能和药理作用, 如通过影响花生四烯酸代谢来抑制血小板聚集, 从而可以抑制动、静脉血栓及脑血栓形成; 具有较强的抗炎、镇痛作用, 是抗病毒和抗癌药物的中间体^[2]。此外, 莽草酸是合成有效抗禽流感药物-达菲的重要原料^[3]。莽草酸途径广泛存在于细菌、子囊真菌、寄生虫和植物中^[4-7]。

传统的莽草酸生产方式主要有两种: 从八角属植物的果实中提取^[8], 或通过化学合成手段获得。前者由于原材料的生长受地域限制及气候的影响, 严重制约了莽草酸的大规模生产^[9]; 后者由于生产工艺复杂、产量低、成本高也不能满足

莽草酸的大量需求。微生物发酵法生产莽草酸在生产规模、生产工艺等方面具有显著的优势。因此, 通过代谢工程育种获得高产莽草酸的微生物菌种并发酵生产莽草酸具有广阔的应用前景。大肠杆菌由于遗传背景清楚、生长速度快、发酵周期短以及易于分子操作等优势, 是代谢工程育种中最常用的宿主。如图 1 所示, 大肠杆菌中莽草酸途径是芳香族氨基酸合成的共同途径, 包含 7 步酶催化反应, 最终生成分支酸。首先由糖酵解途径中间产物磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和 HMP 途径的 4-磷酸赤藓糖 (E4P) 缩合形成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸 (DAHP) 起始, 该反应由 *aroF*、*aroG* 和 *aroH* 基因编码的 DAHP 合成酶催

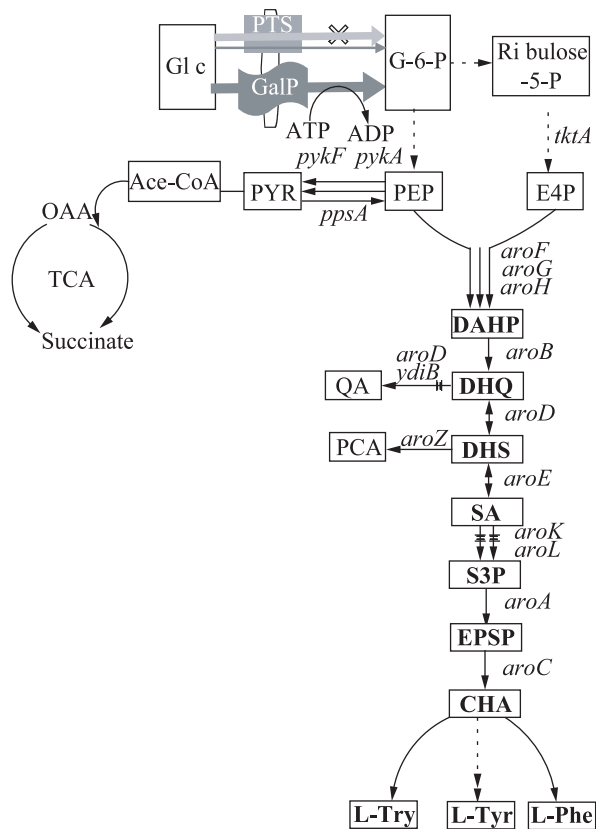


图1 大肠杆菌莽草酸途径

Fig. 1 Pathway of shikimic acid in *E. coli*.

化,这3个同工酶分别受到L-酪氨酸、L-苯丙氨酸和L-色氨酸的反馈抑制^[10]。PEP来自糖酵解途径,也可由*ppsA*基因编码的磷酸烯醇式丙酮酸合成酶A催化丙酮酸转化得到。*tktA*基因编码的转酮酶A是磷酸戊糖途径中生成E4P的关键酶。DAHP经过一系列反应后生成代谢中间产物莽草酸,后者在莽草酸激酶的作用下生成莽草酸-3-磷酸(S3P),并最终合成3种芳香族氨基酸。PEP和E4P是莽草酸合成的前体物质,它们的合成和积累直接决定着莽草酸的合成能力。大量文献表明,通过消除竞争途径,解除限速步骤或增强前体代谢产物的供应,从而加强目的代谢产物的积累是微生物代谢工程常用的一种行之有效的

方法^[11]。

基于Red重组系统的基因删除技术是近几年来国际上进行细菌代谢工程研究的常用方法之一。Red重组系统的原理是在来源于λ噬菌体的*exo*、*bet*、*gam*三个基因控制的重组酶的作用下,染色体DNA可以与外源线性DNA片段通过两翼较短的同源序列高频重组,使其整合到染色体上,并将染色体上的对应序列置换下来^[12]。本实验在Red重组系统的基础上,利用大肠杆菌自身所含有的Xer重组酶能够识别*dif*序列的特点^[13],运用*dif-dif*重组将目的基因的两端同源臂连接,从而去除了其中的抗性基因标记。本研究中的基因删除原理如图2所示。

为了有效利用大肠杆菌莽草酸途径合成莽草酸,在分析大肠杆菌莽草酸代谢网络的基础

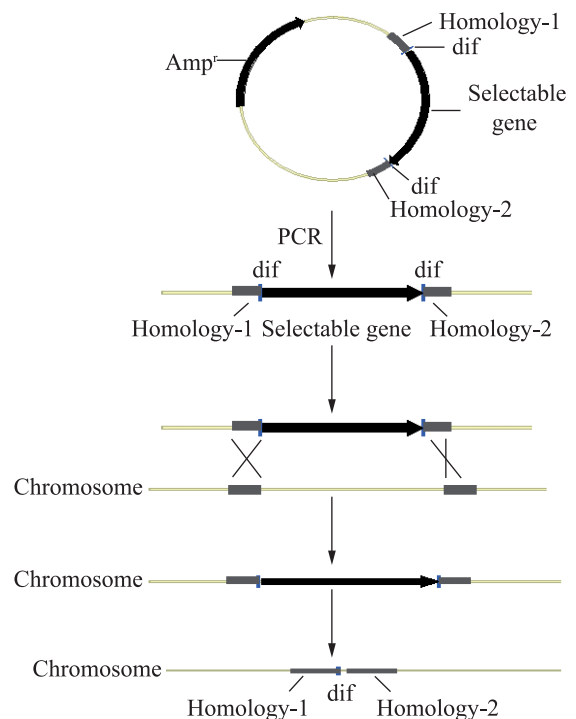


图2 基因删除流程

Fig. 2 Schemes of gene inactivation approach.

上,首先利用 Red-Xer 重组系统删除了莽草酸途径中莽草酸激酶的编码基因 *aroL* 和 *aroK*,从而阻断了莽草酸向莽草酸-3-磷酸的代谢反应,提高了莽草酸的累积。通过删除编码 EIICBglc 蛋白的 *ptsG* 基因部分阻断了大肠杆菌依赖于 PEP 的葡萄糖过磷酸转移酶系统(PTS),使得细胞的葡萄糖运输主要依赖于半乳糖协同运输系统进行^[14]。为了减少副产物奎宁酸 (QA) 的生成,进一步删除了 *ydiB* 基因。最终获得的大肠杆菌代谢工程菌的莽草酸合成和累积能力显著提高。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

大肠杆菌 *Escherichia coli* CICIM B0013 由本中心筛选、保藏; *E. coli* JM109 由本中心保藏; 质粒 pKD46 (温敏型复制子, 含有阿拉伯糖启动子调控的 *gam*、*bet* 和 *exo* 基因, Amp^r) 由本中心保藏; 质粒 pSK-EcdifGm (含有 *dif* 位点, Amp^r, Gm^r) 由本实验室构建并保藏; pMD18-T-simple 购自 TaKaRa (大连公司)。本实验所用到的大肠杆菌菌株见表 1, 本实验所用引

物序列见表 2。

1.1.2 培养基和主要试剂

大肠杆菌培养用培养基和质粒增殖培养基 LB (L): 5 g 酵母粉, 10 g 蛋白胨, 10 g NaCl; 固体培养基在此基础上添加 1.5%~2% 的琼脂粉。培养基中氨苄青霉素钠和庆大霉素的终浓度分别为 100 μg/mL 和 30 μg/mL。

发酵培养基 (/L): 13 g Na₂HPO₄·H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 0.1 g NH₄Cl, 1.2 g MgSO₄, 0.7 g L-苯丙氨酸, 0.35 g L-色氨酸, 0.7 g L-酪氨酸, 0.3 g 柠檬酸铁铵, 2.1 g 一水合柠檬酸, 0.01 g 对羟基苯甲酸, 0.01 g 对氨基苯甲酸钾, 0.01 g 2,3-二羟基苯甲酸, 15 g 酵母抽提物, 20 g 蛋白胨, 25 g 葡萄糖。

dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶购自上海华诺公司; PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒以及 DNA 片段快速胶回收试剂盒均购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; 限制性核酸内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa (大连) 公司; L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司; 引物合成及测序由上海生工生物技术有限公司完成; 其余试剂均是国产分析纯。

表 1 本实验所构建的重组菌

Table 1 *Escherichia coli* strains used in this study

Strains	Relevant genotype	Reference
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning host	Our laboratory
CICIM B0013	Wild type	Our laboratory
SA1	B0013, Δ <i>aroL</i> :: <i>dif</i>	This study
SA2	SA1, Δ <i>aroK</i> :: <i>dif</i>	This study
SA3	SA2, Δ <i>ptsG</i> :: <i>dif</i>	This study
SA4	SA3, Δ <i>ydiB</i> :: <i>dif</i>	This study

表 2 本实验所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')	Size (bp)
<i>aLup</i>	GAATTCATTCTCATGACACCGGCTTT	26
<i>aLdw</i>	GAATTCACAATTGATCGTCTGTGCCA	26
<i>Lverp</i>	AAGATTACGGCCAACCTTAA	21
<i>Lverdn</i>	CCGCGACCGTCATATTGAGC	20
<i>YaL</i>	CGAAATTGTACTAGTTTGATGGTATG	26
<i>aKup</i>	GAATTCGCTTTGATCATCAGTACGA	26
<i>aKdw</i>	GAATTCCTTGCAGCGACCAGATATG	25
<i>Kverp</i>	GATAAACCCGCTTCGCTCAG	20
<i>Kverdn</i>	CGTAACCGTCTTCCGCTCGTG	22
<i>YaK</i>	GTTGCTTCCAGCATGTGAAT	21
<i>pGup</i>	CCGGAATTCTCGGTAAATCGCTGATGCTGCC	31
<i>pGdw</i>	CCGGAATTCGGGTAATACATGCGTCGAGGTTAG	34
<i>Gverup</i>	TGCAGTACCAGTGGCGCAAC	20
<i>Gverdw</i>	TGTGGCTGTTCCCGATCGTC	20
<i>YpG</i>	GTCAAATGTGCAACTTCTCCAATG	25
<i>yBup</i>	CTCGAATTCCTATCCTATCCGCCACAGT	28
<i>yBdw</i>	CTCGAATTCACGCATTCAGTGACCAGA	27
<i>yBverup</i>	CCGATTGTGTCGTCACGGT	20
<i>yBverdw</i>	CATCAACATATTCACACGCCAG	22
<i>YyB</i>	ATGGATGTTACCGCAA	16

1.2 利用 Red-Xer 重组系统删除基因

根据文献报道方法^[13,15], 分别进行 *aroL*、*aroK*、*ptsG* 和 *ydiB* 基因的删除。

1.2.1 利用 Red-Xer 重组系统删除 *aroL* 基因

用以 *aroL* 基因上下游设计的引物 *aLup* 和 *aLdn* 扩增大肠杆菌染色体 DNA 上的 *aroL* 基因, 片段大小为 575 bp, PCR 产物克隆入 pMD18-T-simple 载体中, 获得重组质粒 pMD-aroL。以该重组质粒为模板, 用引物 *Lverp*、*Lverdn* 进行反向 PCR 扩增, PCR 产物与 *difGm* 片段连接得到

重组质粒 pMD-aroL':*difGm*。以重组质粒 pMD-aroL':*difGm* 为模板, 用第一组引物进行 PCR 扩增得到片段 *aroL':difGm*, 即 *aroL* 基因的突变盒。

将 *aroL* 基因突变盒电击转入出发菌 B0013/pKD46 细胞后立即加入含有浓度为 1 mmol/L 的 L-阿拉伯糖的液体 LB 培养基, 30 °C、100 r/min 条件下后培养 4~6 h, 然后涂布于含有庆大霉素的抗性平板, 利用引物 *YL*、*aLdn* 进行菌落 PCR 鉴定获得正确重组的转化子并转接于含有氨苄

青霉素的液体 LB 培养基中,在 30 °C 培养条件下多次转接传代后,划线分离出单菌落并挑选出庆大霉素抗性丢失的转化子,并用 YL、aLdn 引物进行菌落 PCR 验证。

1.2.2 利用 Red-Xer 重组系统删除 *aroK*、*ptsG* 和 *ydiB* 基因

与删除 *aroL* 基因的方法相同,首先构建 *aroK* 基因的突变盒。以 aKup、aKdn 为引物,利用 Taq DNA 聚合酶扩增大肠杆菌的 *aroK* 基因,PCR 产物克隆入 pMD18-T-simple 载体中,获得重组质粒 pMD-aroK。以上述重组质粒为模板用引物 Kverp 和 Kverdn,进行反向 PCR 扩增,并克隆入 difGm 片段得到重组质粒 pMD-aroK':difGm。以重组质粒 pMD-aroK':difGm 为模板,用引物 aKup 和 aKdn 进行 PCR 扩增得到片段 aroK':difGm。将片段 aroK':difGm 电转入 SA1 菌中进行 Red-Xer 重组,实现 *aroK* 基因的突变。*ptsG* 和 *ydiB* 基因删除的技术路线同上。

1.3 摇瓶培养

将保藏在-70 °C 甘油管中的菌体划线在固体平板上,置于 37 °C 恒温箱培养 24 h 后接单菌落于液体 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养 9 h 作为种子培养液。用种子培养液收集适量菌体,以发酵培养基重悬后在 37 °C、200 r/min 摇瓶培养,每隔 2 h 取样测 OD_{600} ,确定菌株生长情况。用生物传感仪测量发酵液中葡萄糖残留量,从而确定菌体消耗葡萄糖的情况。为了防止在培养过程中菌体产酸使培养基 pH 降低从而影响菌体的生长,可在培养过程添加适量的碳酸钙进行中和。本研究中所有发酵实验均重复至少 3 次,检测数据取平均值进行分析。

1.4 发酵及代谢物分析

细胞密度用紫外可见分光光度计在 600 nm 波长处测定,细胞干重 (DCW) 是由 DCW 与 OD_{600} 测定的标准曲线换算得到,本实验所用菌株 CICIM B0013 的细胞干重 (DCW) 与 OD 关系为: $1 OD_{600}=0.38 \text{ g/L DCW}^{[16]}$ 。培养基中的葡萄糖用生物传感仪 (SBA40C) (山东省科学院生物研究所) 检测。

莽草酸、奎宁酸、丙酮酸、以及乙酸和乳酸等有机酸用高效液相色谱分析。取 1.5 mL 的发酵上清液加入等体积的 10% 的三氯乙酸混合均匀,4 °C 放置 2 h 沉淀杂质蛋白 (测定胞内有机酸时先用超声波破碎细胞后按前述方法处理),室温 12 000 r/min 离心 8 min,上清液经 0.45 μm 的膜过滤后,用高效液相的方法测定发酵液中的代谢产物含量。

高效液相色谱分析条件:色谱柱为 Aminex HPX-87H column (300 mm \times 7.8 mm; 9 μm),流动相为 0.005 mol/L 硫酸,流速为 0.6 mL/min,紫外检测波长为 210 nm,柱温为 50 °C,进样量为 20 μL ,测量停留时间为 20 min。

2 结果与分析

2.1 基因删除

2.1.1 *aroL* 基因的删除与鉴定

首先用 1.2.1 的方法构建关键重组质粒 pMD-aroL':difGm,该质粒大小为 4 057 bp,物理图谱如图 3A 所示。将该重组质粒用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 进行酶切验证,获得 2.7 kb 和 1.3 kb 左右的两条电泳条带,见图 3B。

以重组质粒 pMD-aroL':difGm 为模板,PCR 扩增获得 *aroL* 基因的突变盒 aroL':difGm,经纯

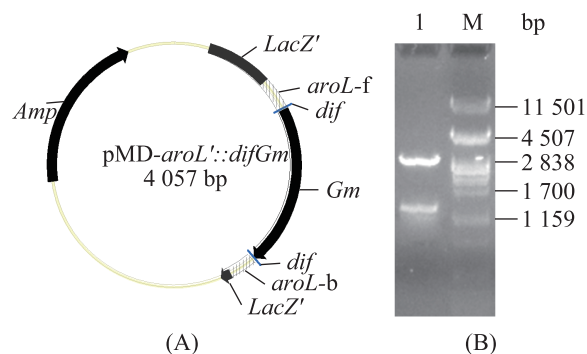


图 3 重组质粒 pMD-aroL':difGm 的物理图谱 (A) 及酶切验证 (B)

Fig. 3 Map of recombinant vector pMD-aroL':difGm (A) and identification by restriction enzyme (B). 1: pMD-aroL':difGm/EcoR I; M: DNA marker.

化后电转化导入宿主菌 B0013/pKD46 后涂布于庆大霉素抗性筛选平板上,挑取单菌落转接于无抗性的 LB 培养基平板上传代培养,最后用引物 YL、aLdn 进行菌落 PCR 验证,原始菌株获得 *aroL* 基因 (片段大小为 575 bp),转化子 SA1 (*aroL':difGm*) 获得片段 *aroL':difGm* (大小为 1.3 kb 左右),其庆大霉素抗性基因 (*Gm*) 丢失后,转化子 SA1 (*aroL':dif*) 获得大小为 365 bp

的 *aroL':dif* 片段 (图 4)。表明 *aroL* 基因已经被成功敲除。

2.1.2 *aroK*、*ptsG* 和 *ydiB* 基因的删除与鉴定

利用相似的策略删除 *aroK* 基因。首先构建 *aroK* 删除片段 *aroK':difGm* 并将其电转入宿主菌 SA1/pKD46 中。挑取转化子后,用引物 YK、aKdn 进行菌落 PCR 扩增验证,出发菌株 SA1 获得 657 bp 大小电泳图谱;转化子 SA1 (*aroK':difGm*) 获得 1.4 kb 左右的电泳图谱;其抗生素抗性基因丢失后,转化子 SA2 获得 356 bp 大小电泳图谱 (图 4)。即菌株 SA1 的 *aroK* 部分基因已被 *dif* 序列替换。

利用相似的策略进行删除 *ptsG* 基因。首先构建删除片段 *ptsG':difGm* 并将其电转入宿主菌 SA1/pKD46 中。以引物 YG 和 pGdn 进行菌落 PCR 验证,*ptsG* 基因的大小为 1.4 kb,整合到染色体 DNA 上的 *ptsG':difGm* 片段大小为 1.7 kb,经 *dif* 重组而丢掉 *Gm* 基因的转化子 SA3 的 PCR 结果为 0.5 kb (*ptsG':dif* 的大小),鉴定电泳图谱见图 4,表明 *ptsG* 基因已经被成功敲除。

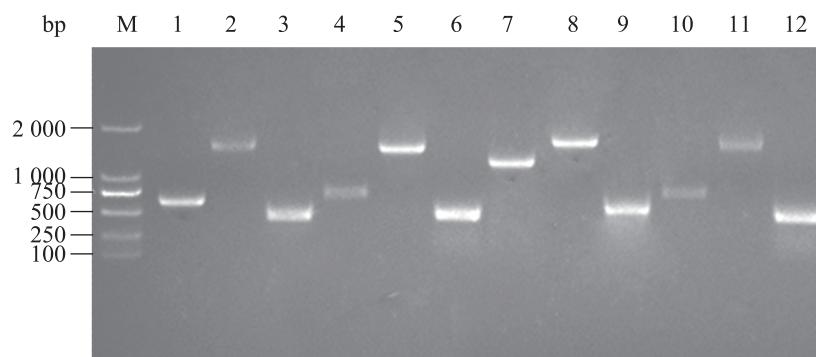


图 4 大肠杆菌基因删除的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of genes knockout in *E. coli*. by PCR M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of *aroL* gene; 2: PCR product of *aroL':difGm*; 3: PCR product of *aroL':dif*; 4: PCR product of *aroK* gene; 5: PCR product of *aroK':difGm*; 6: PCR product of *aroK':dif*; 7: PCR product of *ptsG* gene; 8: PCR product of *ptsG':difGm*; 9: PCR product of *ptsG':dif*; 10: PCR product of *ydiB* gene; 11: PCR product of *ydiB':difGm*; 12: PCR product of *ydiB':dif*.

构建用于删除 *ydiB* 基因的基因突变盒 *ydiB'::difGm* 并导入 SA3 细胞后, 利用引物 YB、yBdn 进行菌落 PCR 验证。*ydiB* 基因的大小为 0.6 kb, *ydiB* 基因片段的大小 1.3 kb 左右, 经 *dif-dif* 重组而丢掉 *Gm* 基因的转化子 PCR 产物大小为 0.3 kb 左右 (*ydiB'::dif* 的大小)。鉴定电泳图谱见图 4, 表明 *ydiB* 基因已经被成功敲除。

2.2 发酵实验结果

2.2.1 代谢工程菌的细胞生长和底物利用性能评价

分别考察出发菌 B0013 和系列突变株 (SA1、SA2、SA3 和 SA4) 的细胞生长、葡萄糖消耗和莽草酸合成情况。

由图 5 可以看出, 在发酵初期的 4 h 内, 突变株与对照菌株的生长速度没有显著区别, 但整个发酵周期来看代谢工程菌的对数生长期显著延长, 并且 SA3 和 SA4 菌株更为突出, 对数生长期达到了 10 h。同时, 表 3 表明, 尽管出发菌株的比生长速率高于代谢工程菌株, 但出发菌株的最终细胞生物量仅为 2.84 g/L, 明显低于其余 4 株基因缺失突变株, 其中 SA4 菌株的最大生物量较高, 达到了 5.71 g/L。有趣的是, 随着基因的叠加删除, 突变株的 SA1、SA2、SA3 和 SA4 最大细胞生物量也呈现出依次升高的趋势, 分别达到 3.45 g/L、3.94 g/L、5.24 g/L 和 5.71 g/L (图 5, 表 3)。由此可见, 基因删除不仅影响大肠杆菌的细胞生长性能, 对最终细胞生物量也产生了明显的影响。

进一步考察了突变株及对照菌株的底物利用情况, 结果如图 6 和表 3 所示。与突变株相比, 出发菌株的葡萄糖利用速度最快, 结合菌体生长

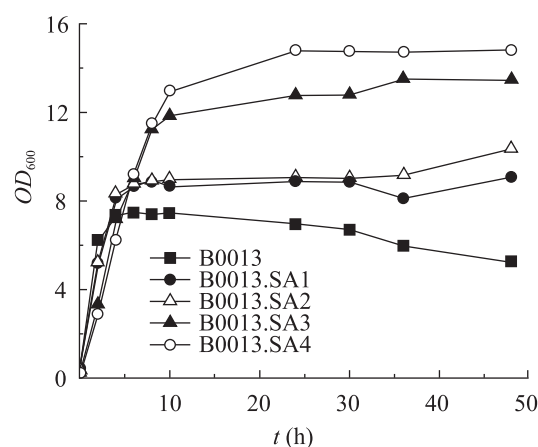


图 5 大肠杆菌 B0013 及其基因缺失突变株的细胞生长过程

Fig. 5 Growth curve of B0013 and its SA-producing derivatives.

情况可以看出, 出发菌株的细胞快速生长可能是葡萄糖快速利用所引起的。与出发菌株相比, 4 株突变株在达到生长稳定期以后葡萄糖消耗速度下降更为显著, 至发酵结束时, SA1 菌株才基本利用完葡萄糖, 而其余 3 株突变株的发酵液中均有不同程度的葡萄糖残余, 其中 SA3 菌株的发酵液中的残余葡萄糖达到 5 g/L 左右。结合代谢工程菌的生长性能可以看出, 删除莽草酸途径中的 *aroK* 和 *aroL* 基因在一定程度上降低了细胞对葡萄糖的利用速率, 而 *ptsG* 基因的删除对抑制细胞的葡萄糖利用效率更为显著。另一方面, 发酵过程中细胞的快速生长和葡萄糖的快速利用对细胞的代谢活力要求较高, 并且需要较高的溶氧水平。同时, 分析了不同菌株发酵液的丙酮酸和乙酸 (数据未显示), 结果发现出发菌株中的乙酸和丙酮酸等有机酸的含量明显高于代谢工程菌, 发酵液的 pH 相对较低, 而 SA2 菌株的发酵液中丙酮酸水平显著高于 SA3 菌株, SA4 发酵液中含有一定浓度的乙酸。可以推测, 出发菌株

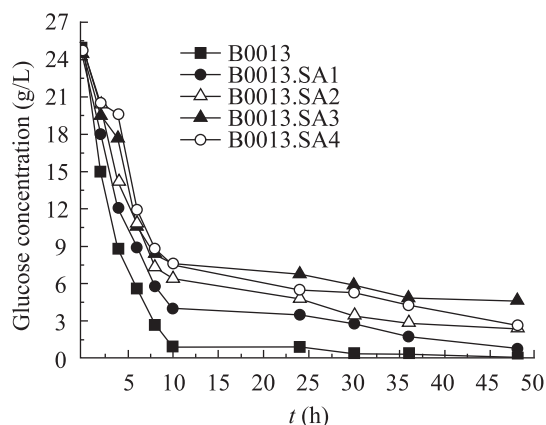


图6 大肠杆菌 B0013 及其基因缺失突变株的葡萄糖利用过程

Fig. 6 Glucose consumption in B0013 and its SA-producing derivatives.

的高生长速率和低细胞生物量可能是由于培养过程中溶氧的限制导致有机酸的积累,从而限制了细胞后期的生长,而 *ptsG* 基因的删除部分阻断了 PEP 依赖型的 PTS 系统,使得细胞的葡萄糖利用效率降低,一方面导致了菌体的生长缓慢,另一方面减少了 PEP 到丙酮酸的转化。

2.2.2 基因删除对莽草酸及中间产物合成的影响

分别考察了突变株及其出发菌株的莽草酸合成能力,培养 48 h 后发酵液中的莽草酸含量最高,结果如图 7 和表 3 所示。对照菌株 B0013 的莽草酸合成和累积水平最低,发酵液中几乎检测不到,说明大肠杆菌的莽草酸代谢受到细胞的严格调控。通过删除 *aroL* 基因部分阻断了莽草酸代谢的下游途径后,菌株 SA1 莽草酸产量较出发菌有所提高,完全阻断莽草酸激酶反应(删除 *aroL* 和 *aroK* 基因),SA2 发酵液中莽草酸含量达到 67 mg/L。PEP 作为莽草酸合成的前体,对细胞的莽草酸合成水平起着重要的调节作用,较高的 PEP 前体可以有效提高目的产物的合成和积累。为考察 PEP 的累积对莽草酸的影响,在删除

aroL、*aroK* 基因基础上进一步删除了 *ptsG* 基因构建了 PTS 部分缺失的突变株,该突变株主要利用葡萄糖协助蛋白和葡萄糖激酶组成的非 PEP 供能的葡萄糖转运系统,可以节约大量的 PEP 用于莽草酸的合成。发酵结果显示,突变株 SA3 的莽草酸合成能力显著提高,发酵液中累积水平达到 417 mg/L,相比于阻断莽草酸激酶反应,提高 PEP 前体对莽草酸合成和积累效果更为显著。在突变株 SA3 的基础进一步删除了莽草酸/奎宁酸脱氢酶基因 (*ydiB*),莽草酸最终产量达到 576 mg/L,较出发菌株莽草酸产量为 6 mg/L 提高了 90 多倍。

同时,研究发现 *ydiB* 基因的删除能够有效减少奎宁酸(QA)合成和积累,发酵结束时 SA3 菌株的发酵液中 QA 的含量为 128 mg/L,而敲除了 *ydiB* 基因的 SA4 突变株的 QA 浓度仅为 37 mg/L(表 3)。由表 3 可知,尽管叠加删除基因后的突变菌株较出发菌株的细胞生物量逐步提高,至最终重组菌 SA4 在发酵液中菌体浓度达到

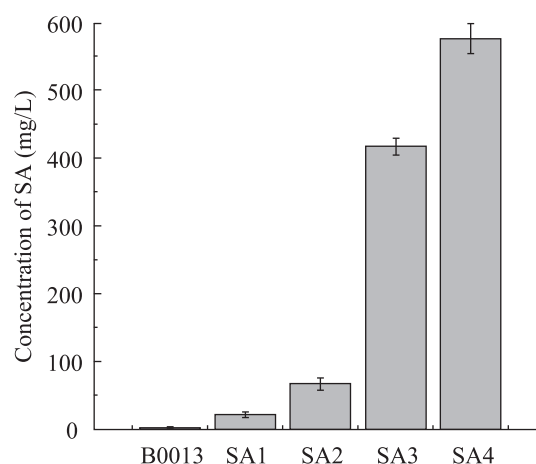


图7 不同菌株莽草酸产量比较

Fig. 7 Comparison of shikimic acid production comparison in different strains.

表 3 摇瓶发酵参数比较

Table 3 Comparison of parameters in shake-flask experiments

Strains	Biomass (g/L)	Average specific growth rate (μ/h)	Consumption of glucose (g/L)	SA productivity (g/(L·h)×10 ³)	SA yield (g/g glc×10 ³)	Specific SA productivity P _μ /(h×10 ³)	Concentration for QA (mg/L)
B0013	2.84±0.23	0.83±0.01	25.02	0.67	0.06±0.03	0.014	ND
SA1	3.45±0.17	0.50±0.00	24.45	8.75	0.86±0.13	0.150	ND
SA2	3.94±0.22	0.54±0.01	22.45	27.92	2.98±0.42	0.470	45.45±5.09
SA3	5.24±0.14	0.38±0.01	20.75	173.75	20.10±0.50	2.390	128.17±8.22
SA4	5.71±0.19	0.47±0.02	22.50	236.67	25.24±1.48	3.090	37.62±6.17

ND: not detected; glc: glucose.

5.71 g/L，莽草酸的产量也显著提高，但考虑到葡萄糖利用和发酵时间，莽草酸的产率 and 生产强度相对较低。

3 讨论

本文通过连续删除大肠杆菌的 *aroL*、*aroK*、*ptsG* 和 *ydiB* 等 4 个基因获得了能够合成积累一定浓度莽草酸的代谢工程菌株。通过删除 *aroL* 和 *aroK* 基因能够提高细胞的莽草酸积累水平，但是由于芳香族氨基酸是细胞生长必需的，因此必须向培养基中添加适量的 3 种芳香族氨基酸后才能保证突变株的正常生长。*ptsG* 基因删除使得细胞的 PTS 系统部分缺失，导致了细胞的葡萄糖转运系统由 PEP 供能形式改变为 ATP 供能形式，从而菌体前期由于没有足够的能量供给而生长较慢，对数生长期延长，同时使得最终菌体浓度得到提高。另一方面，敲除 *ptsG* 基因后，PTS 系统并未完全失活，还存在着甘露糖依赖的 EIIABCD^{Man} 系统，该葡萄糖运输途径依然需要 PEP 的参与，同时大肠杆菌还存在非 PTS 系统的葡萄糖运输途径（如半乳糖:H⁺-葡萄糖激酶系统

等），但这些葡萄糖运输途径的活性相对较低，也是导致葡萄糖代谢速率变慢，从而影响了底物利用效率和细胞生物量的原因之一^[17]。更重要的是 *ptsG* 基因的缺失避免了 PEP 的过度消耗，为莽草酸合成和积累提供了更多的前体，因此能够显著提高细胞的莽草酸合成和积累能力。奎宁酸是莽草酸合成途径中的主要副产物，该副产物的形成不仅降低了莽草酸的产量和得率，更重要的是给下游的莽草酸分离提取工艺带来了较大的不便。删除 *ydiB* 基因不仅降低了副产物奎宁酸的生成，同时显著提高了莽草酸的积累。

利用微生物发酵的方法生产莽草酸成为近几年来国际上解决莽草酸需求的热点。事实上，微生物合成莽草酸的主要受限步骤是 PEP 和 E4P 的利用率^[18]。自 1885 年，Eykmann 首次从莽草中分离出莽草酸以来，国际上对它的研究就一直没有停止过^[19]。Frost 课题组针对大肠杆菌过量合成莽草酸的代谢工程开展了系统研究，在删除相关基因的基础上过量表达 *glf*、*glk*、*aroF*^{FBR}、*tktA* 和 *aroE* 基因，获得的代谢工程菌的莽草酸合成水平在 10 L 发酵罐中达到 87 g/L，莽草酸得率为

0.36 mol/mol^[20], 这是迄今报道最高的莽草酸生产水平。杨婕等^[21]在 *E. coli* JM83 的基础上敲除 *aroL* 基因并游离表达了 *aroG*、*ppsA* 和 *tktA* 等 3 个基因, 摇瓶水平下莽草酸产量达到 94 mg/L, 国内还未见有利用代谢工程菌大规模发酵生产莽草酸的相关报道。本文构建的代谢工程菌的莽草酸产量为 568 mg/L, 相比国外研究水平依然有很大差距。为了进一步提高莽草酸产量, 还可以进行以下尝试: 一是通过过量表达关键酶基因提高细胞的莽草酸代谢能力; 二是提高莽草酸上游代谢途径的底物利用率; 三是降低产莽草酸过程的副产物的形成。

REFERENCES

- [1] Bongaerts J, Krämer M, Müller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 289–300.
- [2] Ma Y, Sun JN, Xu QP, et al. Inhibitory effects of shikimic acid on platelet aggregation and blood coagulation. *Acta Pharmac Sin*, 2000, 30(1): 1–3 (in Chinese).
马怡, 孙建宁, 徐秋萍, 等. 莽草酸对血小板聚集和凝血的抑制作用. *药学报*, 2000, 30(1): 1–3.
- [3] Liu YY, Liao XF. Research progress in shikimic acid. *Chem Ind Times*, 2007, 27(3): 54–57 (in Chinese).
刘永友, 廖晓峰. 莽草酸的研究进展. *化工时刊*, 2007, 27(3): 54–57.
- [4] Abbott A. Avian flu special: what's in the medicine cabinet? *Nature*, 2005, 435(7041): 407–409.
- [5] Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Ann Rev Plant Biol*, 1999, 50(1): 473–503.
- [6] Richards TA, Dacks JB, Campbell SA, et al. Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer and endosymbiotic replacements. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(9): 1517–1531.
- [7] Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, et al. Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110. shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92(5): 541–552.
- [8] Knop DR, Draths KM, Chandran SS, et al. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(42): 10173–10182.
- [9] Wang H, Cui ZF. Regulation of shikimic acid biosynthesis pathway. *Biotechnol Bull*, 2009(3): 50–53 (in Chinese).
汪华, 崔志峰. 莽草酸生物合成途径的调控. *生物技术通报*, 2009(3): 50–53.
- [10] Ghosh S, Chisti Y, Uttam C, et al. Production of shikimic acid. *Biotechnol Adv*, 2012, 3(1): 1–7.
- [11] Chen PT, Chang CJ, Wang JY, et al. Genomic engineering of *Escherichia coli* for production of intermediate metabolites in the aromatic pathway. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2011, 42(1): 34–40.
- [12] Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acid Res*, 2000, 28(22): 97–103.
- [13] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2520–2525.
- [14] Chen R, Yap WM, Postma PW, et al. Comparative studies of *Escherichia coli* strains using different glucose uptake systems: metabolism and energetics. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 56(5): 583–590.
- [15] Zhou L, Niu DD, Li N, et al. Multiple gene inactivation approach in *Escherichia coli* mediated by a combination of red recombination and xer recombination. *Microbiol China*, 2010, 37(6): 923–928 (in Chinese).
周丽, 牛丹丹, 李宁, 等. 基于 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌多基因删除方法. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 923–928.

- [16] Zhou L, Zuo ZR, Chen XZ, et al. Evaluation of genetic manipulation strategies on D-Lactate production by *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 2011, 62(3): 981–989.
- [17] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbi Cell Factor*, 2005, 4(1): 14 doi: 10.1186/1475-2859-4-14.
- [18] Ahn JO, Lee HW, Saha R, et al. Exploring the effects of carbon sources on the metabolic capacity for shikimic acid production in *Escherichia coli* using in silico metabolic predictions. *Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(11): 1773–1784.
- [19] Jiang SD, Singh G. Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. *Tetrahedron Lett*, 1998, 54(499): 4697–4733.
- [20] Chandran SS, Yi J, Draths KM, et al. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(3): 808–814.
- [21] Yang J, Qian J, Ye J, et al. Genetic manipulation of the genes related with shikimate metabolism of *Escherichia coli*. *J East China Univ: Sci Technol*, 2009, 35(2): 207–212 (in Chinese).
- 杨捷, 钱晋, 叶江, 等. 大肠杆菌莽草酸生物合成途径的基因操作. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2009, 35(2): 207–212.

(本文责编 陈宏宇)

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

2012 工业生物技术发展报告



作者: 中国科学院生命科学与生物技术局

ISBN: 9787030356857

定价: 98

开本: 16 装帧: 平装 页码: 412

初版时间: 2012-10-1

专业分类: 生物技术

读者对象:《2012 工业生物技术发展报告》可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。

内容介绍

《2012 工业生物技术发展报告》是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一, 主要报道了工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。为了能够全面了解工业生物技术发展的最新进展, 本书设置了发展战略篇、研发进展篇、产业篇和青年人才篇。在选题上, 着重突出了工业生物技术领域的热点和前沿。为了突出各领域的技术进展并使内容更有层次感, 本书在研发进展篇采用主题的形式组织稿件, 重点报道了合成生物学、工业微生物生理与代谢工程、生物炼制和生物发酵技术、工业蛋白质工程、生物过程工程、微藻生物能源等在工业生物技术领域中的研发进展等内容。为了扩大本报告的读者范围, 使国外读者能了解中国工业生物技术的现状、产业情况, 我们在形式上增加了英文题名、摘要, 以及英文作者简介。此外, 我们通过对 2011 年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾, 与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。