

细胞工厂与发酵工程

基于2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4磷酸途径的产紫槐二烯大肠杆菌构建及其补糖策略优化

汪建峰^{1,2}, 熊智强², 张嗣良¹, 王勇²

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所 合成生物学重点实验室, 上海 200032

汪建峰, 熊智强, 张嗣良, 等. 基于2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4磷酸途径的产紫槐二烯大肠杆菌构建及其补糖策略优化. 生物工程学报, 2014, 30(1): 64-75.

Wang JF, Xiong ZQ, Zhang SL, et al. Engineering MEP pathway in *Escherichia coli* for amorphadiene production and optimizing the bioprocess through glucose feeding control. Chin J Biotech, 2014, 30(1): 64-75.

摘要: 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径是大肠杆菌 *Escherichia coli* 唯一的萜类前体合成途径, 研究表明它比甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)途径具有更高的理论产率。但目前有关 MEP 途径的调控所知非常有限, 故单独强化 MEP 途径对萜类异源合成产量的提高效果并不理想。研究中通过引入外源 MEP 途径基因强化 *E. coli* 萜类合成的遗传改造策略和发酵过程补糖控制优化, 尝试更有效地释放 MEP 途径的潜力, 建立青蒿素前体——紫槐二烯的高密度发酵过程。研究结果表明共表达阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* *dxs2* 基因和枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* *idi* 基因可使紫槐二烯的摇瓶发酵产量比野生菌株提高 12.2 倍。随后针对该菌株建立了高密度发酵过程, 发现稳定期的中前期 (24-72 h) 是产物合成的关键期, 通过稳定期补糖速率的调整, 明显改善了产物合成速度, 使紫槐二烯的产量从 2.5 g/L 提高到了 4.85 g/L, 但不影响产物积累的周期。考虑到 72 h 后菌体老化可能会影响产物合成, 进一步采取了调整对数期的补糖速率控制菌体生长的策略, 使紫槐二烯的产量达到 6.1 g/L。研究结果为基于 MEP 途径的萜类异源合成工程菌构建及其发酵工艺的建立奠定了基础。

关键词: MEP 途径, 紫槐二烯, 大肠杆菌, 高密度发酵, 补糖速率

Received: September 30, 2013; **Accepted:** November 29, 2013

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB721104), National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2012AA02A701), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31170101, 31100073), Major Projects of Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-J-12).

Corresponding author: Siliang Zhang. Tel/Fax: +86-21-64252565; E-mail: siliangz@ecust.edu.cn

Yong Wang. Tel/Fax: +86-21-54924295; E-mail: yongwang@sibs.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB721104), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA02A701), 国家自然科学基金 (Nos. 31170101, 31100073), 中国科学院知识创新工程重大项目 (No. KSCX2-EW-J-12) 资助。

Engineering MEP pathway in *Escherichia coli* for amorphadiene production and optimizing the bioprocess through glucose feeding control

Jianfeng Wang^{1,2}, Zhiqiang Xiong², Siliang Zhang¹, and Yong Wang²

¹ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

² Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: The pathway of 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) is the exclusive isoprenoid precursor biosynthetic pathway in *Escherichia coli*, with a higher theoretical yield than mevalonate (MVA) pathway. However, due to lack of information about the regulation of MEP pathway, only engineering MEP pathway in *E. coli* achieved limited improvement of heterologous isoprenoid production. We used exogenous MEP pathway genes to improve MEP pathway in *E. coli* and optimized the glucose feeding to release the potential of MEP pathway. The results demonstrate that co-expression of *dxs2* from *Streptomyces avermitilis* and *idi* from *Bacillus subtilis* can increase amorphadiene production with 12.2-fold compared with the wild-type strain in shake flask fermentation. Then we established a high-cell density fermentation process for the engineered strain, and found that the phase from 24 to 72 h is important for product biosynthesis. The optimization of glucose feeding rate during 24 to 72 h significantly improved product accumulation, which was improved from 2.5 to 4.85 g/L, within the same process time. Considering the attenuation of strain metabolism after 72 h, this study further modulated the glucose feeding rate during exponential phase to control strain growth and the amorphadiene yield eventually reached to 6.1 g/L. These results provided useful information to develop engineered *E. coli* for isoprenoid production through MEP pathway engineering.

Keywords: 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway (MEP pathway), isoprenoids, *Escherichia coli*, high-cell density fermentation, glucose feeding rate

近十年随着合成生物学技术的快速发展,以常见的微生物如大肠杆菌 *Escherichia coli* 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 作为通用底盘细胞构建高效细胞工厂,已经成为大规模生产植物源珍稀天然产物的重要手段^[1-4]。青蒿素作为最有效的抗疟疾药物,其前体紫槐二烯及青蒿酸的微生物合成受到了广泛的关注。加州大学伯克利分校的研究人员通过在 *S. cerevisiae* 中改造甲羟戊酸 (MVA) 途径或在 *E. coli* 中引入外源 MVA 途径的策略成功地构建了高产紫槐二烯 (Amorphadiene) 和青蒿酸的工程菌^[5-6]。

与所有的萜类化合物一样,紫槐二烯是由

萜类通用前体——异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP) 装配合成的。野生型 *E. coli* 以 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径作为唯一的萜类前体合成途径^[7]。在过去的十多年研究人员针对 *E. coli* MEP 途径采取了简单强化或精细调控关键基因表达的策略,使重组菌株的紫杉二烯和 β -胡萝卜素产量分别提高到 1 g/L 和 2.1 g/L 的^[8-9]。Partow 等^[10]和 Meng 等^[11]分别利用全基因组水平 *in silico* 代谢通量分析发现 MEP 途径比 MVA 途径具有更高的理论产率。但受限于 MEP 途径特性及调控机制研究不成熟,大多数情况下改造 MEP 途径所取得

的效果与引入更成熟的 MVA 途径具有一定的差距^[6, 12-13],尤其是 Keasling 等通过对引入 MVA 途径进行一系列的改造后^[6],使 *E. coli* 能够合成 27.4 g/L 的紫槐二烯。此外,对 MEP 途径的改造效果往往随着基因表达强度、宿主菌株以及下游产物的变化而变化^[12, 14-15]。因此 MEP 途径仍需要有更多的研究来进一步释放潜力。此外,除工程菌的遗传改造外,目前针对萜类化合物异源合成的发酵过程主要是基于传统高密度蛋白表达工艺建立的^[16-17],仍缺乏针对性的发酵控制策略的研究。考虑到萜类合成与蛋白表达在基因表达和细胞代谢调控两个层次上存在很大差异,如蛋白表达过程往往采取先生长后表达的策略,尽可能多地让表达阶段的物质和能量用于蛋白质合成,而异源合成需要平衡前体和下游途径基因表达,合理分配物质和能量代谢流,使细胞减少副产物积累,尽可能多地支持目标产物的合成^[18]。因此仍需要针对某个特定的异源合成工程菌株开展更深入的发酵过程研究,了解产物合成与菌体生长代谢的关系,以便在反应器水平最大限度地发挥菌株潜力。

本研究拟从引入异源 MEP 途径基因构建紫槐二烯异源合成工程菌株和菌株高密度发酵过程的糖流加控制策略两个方面入手,尝试最大限度地释放 *E. coli* 内源 MEP 途径合成紫槐二烯的潜力,为开发基于 MEP 途径的萜类异源合成工程菌株及其发酵工艺奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌株、引物及相关试剂

本研究相关的质粒与引物如表 1 所示。菌株 *E. coli* DH10B (Invitrogen) 作为克隆宿主,

E. coli BL21 (DE3)(Novagen) 作为产物合成的宿主。分子克隆相关的酶、DNA 片段与质粒抽提纯化试剂盒分别由 NEB 公司、TaKaRa 公司及 Axygen 公司提供。石竹烯标准品和十二烷分别由 Sigma-Aldrich 公司和上海一基生物试剂有限公司提供。各培养基组分、抗生素及其他相关试剂购自 Oxoid、国药集团与上海生物工程有限公司。本研究中各抗生素的工作浓度如下:氨苄青霉素 100 mg/L,卡那霉素 50 mg/L。以下研究中根据菌株所含质粒的抗性添加抗生素。除发酵培养基外,补料培养基也按相同的浓度添加,不再做特别说明。

1.2 重组质粒的构建

质粒 pJF23 (图 2A) 由本实验室保存^[19],含有编码 *E. coli* 法尼基焦磷酸合成酶基因 (*ispA*) 和密码子优化后的紫槐二烯合成酶基因 (*ads*) 的 T7 Prom-*ispA-ads*-T7 Term 人工操作子^[23]。以相应菌株的基因组为模板,分别 PCR 扩增 *E. coli* MG1655 的 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶的基因 (*dxs_EC*) 和异戊二烯焦磷酸异构酶的基因 (*idi_EC*),阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis* MA 4680T) 的 *dxs2_SAV*,枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis* CMCC63501) 的 *idi_BS*。将基因 *dxs_EC*、*idi_EC*、*dxs2_SAV* 和 *idi_BS* 的 PCR 产物回收,并用限制性内切酶酶切后,连接到 pET21d 载体的相应位点上,获得质粒 pJF39、pJF44、pJF554 和 pJF567。用 *Xba* I 和 *Xho* I 酶切 pJF44,回收含 *idi_EC* 基因的 DNA 片段,将其插入到 pJF39 的 *Spe* I 和 *Xho* I 位点上,获得质粒 pJF63。用 *Xba* I 和 *Spe* I 酶切 pJF554,回收含 *idi_BS* 基因的 DNA 片段,将其插入到 pJF568 的 *Spe* I 位点上,获得重组质粒

表1 本研究涉及的质粒与引物序列

Table 1 Plasmids and primers involved in this study

Name	Characteristics/sequences	Information
Plasmids	Detailed characteristics	Source
pET21d	Vector with an ampicillin resistance marker and a T7 promoter	Novagen
pJF23	pET28a- T7 Prom- <i>ispA-ads</i> -T7 Term	[17]
pJF39	pET21d-T7 Prom- <i>dxs</i> _EC-T7 Term	This study
pJF44	pET21d-T7 Prom- <i>idi</i> _EC-T7 Term	This study
pJF67	pET21d-T7 Prom- <i>dxs</i> _EC- <i>idi</i> _EC-T7 Term	This study
pJF554	pET21d-T7 Prom- <i>idi</i> _BS-T7 Term	This study
pJF567	pET21d-T7 Prom- <i>dxs2</i> _SAV-T7 Term	This study
pJF678	pET21d-T7 Prom- <i>dxs2</i> _SAV- <i>idi</i> _BS-T7 Term	This study
Primers	Sequences (5'-3')	Cloning site
<i>dxs</i> _EC F	CATGCCATGGGCATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCG	<i>Nco</i> I
<i>dxs</i> _EC R	CGGAATTC ACTAG TTTATGCCAGCCACCTT	<i>Eco</i> R I
<i>idi</i> _EC F	CATGCCATGGGCATGCAAACGGAACACGTCATTTTA	<i>Nco</i> I
<i>idi</i> _EC R	CGGAATTCCTTATTTAAGCTGGGTAAATGCAG	<i>Eco</i> R I
<i>idi</i> _BS F	CATGCCATGGGCATGACTCGAGCAGAACGAAA	<i>Nco</i> I
<i>idi</i> _BS R	CGCGGATCC ACTAG TTTATCGCACACTATAGCTTG	<i>Bam</i> H I
<i>dxs2</i> _SAV F	GCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAGG ATCCGGTGCCGCTGCTGACCCGCATC	<i>Xba</i> I
<i>dxs2</i> _SAV R	CCCAAGCTT ACTAG TTTCAGTCGCGCGGGCTCCA	<i>Hind</i> III

Underline is a recognition site of restriction enzyme for gene cloning. The 'ACTAGT' sequence indicated in bold represents the 'Spe I' site. The intergenic sequence between *Xba* I and *Nco* I of pET21d is indicated in italic font.

经测序验证, 选择 *dxs2*_SAV 和 *idi*_BS 基因插入方向一致的克隆, 命名为 pJF678 (图 2A)。

1.3 工程菌的发酵研究

1.3.1 发酵培养基

LB 培养基 (g/L): NaCl 10, 蛋白胨 10, 酵母抽提物 5。

摇瓶发酵培养基 (g/L): Na₂HPO₄·7H₂O 12.8, KH₂PO₄ 3, NaCl 0.5, NH₄Cl 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.493, CaCl₂·2H₂O 0.0147, 葡萄糖 8。

补料分批培养基 (体积 1 L)^[6]: 基础料含 K₂HPO₄·3H₂O 15.7 g, KH₂PO₄ 4.2 g, 柠檬酸 1.7 g,

(NH₄)₂SO₄ 2 g 葡萄糖 15 g, MgSO₄·7H₂O 1.2 g 和微量元素溶液 I 10 mL。补料培养基含葡萄糖 650 g, MgSO₄·7H₂O 12 g, (NH₄)₂SO₄ 10.7 g 和微量元素溶液 II 10 mL。微量元素溶液 I (g/L) 含有 CoCl₂·6H₂O 0.25, MnCl₂·4H₂O 1.5, CuCl₂·2H₂O 0.15, H₃BO₄ 0.3, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25, Zn(CH₃COO)₂·2H₂O 1.3 和柠檬酸三铁 10。微量元素溶液 II (g/L) 含有 CoCl₂·6H₂O 0.4, MnCl₂·4H₂O 2.35, CuCl₂·2H₂O 0.25, H₃BO₄ 0.5, Na₂MoO₄·2H₂O 0.4, Zn(CH₃COO)₂·2H₂O 1.6 和柠檬酸三铁 4。

1.3.2 发酵种子的制备

将质粒 pJF23 与 MEP 途径改造相关的质粒 (pET21d 作为空白对照) 共转化 BL21 (DE3), 挑取单菌落至 10 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、250 r/min 过夜培养 12 h, 用 15 mL 无菌离心管离心收集菌体后, 加入等体积 15% 的甘油悬浮, -80 °C 冻存后作为摇瓶发酵种子和补料分批发酵的一级种子。

将 -80 °C 冻存的甘油种子以 1% 的接种量接种到含 50 mL LB 培养基的 500 mL 摇瓶中, 37 °C、250 r/min 培养 6 h, 作为补料分批发酵二级种子。

1.3.3 摇瓶发酵

取 10 mL 摇瓶发酵培养基于 100 mL 的摇瓶中, 按 2% 的接种量将 -80 °C 冻存的甘油种子接种到摇瓶中, 同时加入 20% 的十二烷和终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 进行初始诱导, 置于 250 r/min、28 °C 的摇床上发酵培养 3 d 或者 5 d 后, 进行产物检测。

1.3.4 发酵罐系统配置与参数采集

采用上海国强生化工程装备公司生产的 5 L 发酵罐系统, 配有溶氧、温度和 pH 电极, 罐体和补料称重装置, SHP8400PMS 过程气体质谱仪等在线监测设备。发酵过程溶氧、温度、pH、氧摄取速率 (OUR) 和二氧化碳释放速率 (CER) 等在线参数由 Biostar 2.0 (由华东理工大学国家生化工程技术研究中心 (上海) 开发) 软件包采集计算。

1.3.5 补料分批发酵

按 5% 的接种量, 将二级种子接种到装液量为 1 L 的发酵罐中。为了减少菌体生长延迟期, 发酵过程的初始温度为 37 °C, 转速恒定 800 r/min, 通气量维持在 1 vvm, 自动补加氨水控制 pH 为

7.0。经过约 3 h 的延迟期后, 菌体开始进入对数生长期, 约 7 h 后菌体浓度 (OD_{600}) 达到 10 左右后, 迅速降温至 28 °C, 并加入 200 mL 十二烷和终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养。随后待基础料中葡萄糖耗尽, 溶氧开始回升后, 开始流加碳源。整个发酵过程分两个阶段控制糖的流加, 按图 1 所示分别对各工艺对数期和稳定期的流加速率进行控制。待 OD_{600} 至 200 左右以后 (进入稳定期), 将补料速度设定为恒定速率补加。

1.4 发酵过程离线参数检测、质粒稳定性分析与紫槐二烯的定量

残糖浓度检测: 采用二硝基水杨酸法^[20]。

铵离子浓度检测: 采用苯酚-次氯酸盐法^[21]。

质粒稳定性测试: 在无菌条件下, 将培养液稀释进行梯度稀释, 选取合适的梯度涂布无抗性 LB 固体平板和加有氨苄青霉素和卡那霉素双抗性的平板。用抗性平板单菌落数与无抗性平板单菌落数的比值表征双质粒系统稳定性。

乙酸检测: 色谱条件为 TSKgel ODS-100Z

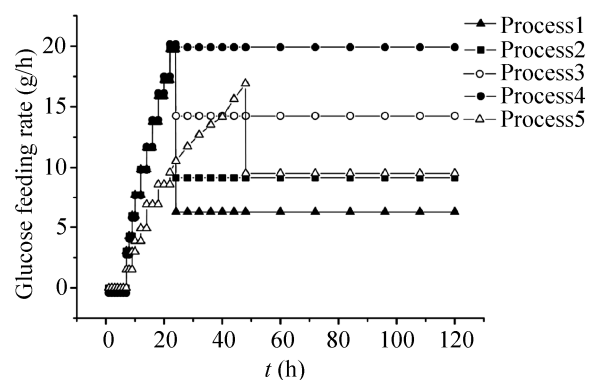


图 1 各过程的补糖速率

Fig. 1 Profile of glucose addition rate of each feed-batch fermentation process in this study.

C18 色谱柱(250 mm×25 mm, 5 μm), 流动相为 25 mmol/L KH₂PO₄ 缓冲液 (pH 2.5): 乙腈=98:2, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C; 紫槐二烯定量: 按 Tsuruta 等^[6]报道的条件, 采用 GC-MS (Thermo Scientific TRACE GC-ISQ) 对紫槐二烯进行定量。取 500 μL 的发酵液 (保证十二烷均匀分布), 用等体积的乙酸乙酯进行萃取一次, 离心收集有机相, 用乙酸乙酯对有机相进行一定的稀释后进样检测。以类似物石竹烯作为标准品采用选择离子扫描模式 (204、189 离子) 进行 GC-MS 分析。

2 结果与分析

2.1 表达异源 MEP 途径基因模块对 *E. coli* 合成紫槐二烯的影响

已有的研究表明 *dxs* 和 *idi* 基因是 *E. coli* MEP 途径中最关键的限速基因^[8-9]。强化 *dxs* 和 *idi* 基因的表达能够有效地提高 MEP 途径的代谢通量^[8-9], 强化下游萜类化合物的合成。从图 2 可以看到, 单独过表达 *E. coli* 内源 *dxs* 和 *idi* 基因的菌株经 5 d 的摇瓶发酵后, 紫槐二烯的产量分别为 10.756 mg/L 和 9.552 mg/L, 相比于对照菌株 (6.552 mg/L), 分别提高了 64%和 46%。该结果表明在 BL21 (DE3) 菌株中强化 *E. coli* 内源 MEP 途径基因对提高 amorphadiene 的合成是比较有限。考虑到自然界中 MEP 途径基因在酶活及调控特性方面的多样性^[22-23], 本研究组在前期的研究中挖掘了链霉菌属、糖多孢菌属、芽胞杆菌属、欧文氏菌属等不同来源的 MEP 途径基因, 发现通过表达 *S. avermitilis* 的 *dxs2* 基因和 *B. subtilis* 的二型 *idi* 基因能够显著地提升 MEP 途径前体供应, 增加紫槐二烯的产量。由

图 2B 可知, 在 M9 培养基中摇瓶发酵 5 d 后, 单独过表达 *dxs2_SAV* (BL21 (DE3) pJF567/pJF23) 和 *idi_BS* (BL21 (DE3) pJF554/pJF23) 基因能够使紫槐二烯的产量达到 24.91 mg/L 和 53.50 mg/L, 分别比对照菌 BL21 (DE3) pET21d/pJF23 提高了 3.8 和 8.2 倍。此外, 引入 *dxs2_SAV* 比过表达内源 *dxs_EC* 提高了 2.3 倍, 引入 *idi_BS* 比过表达 *idi_EC* 提高了 5.6 倍。随后构建了 T7 Prom-*dxs2_SAV*-*idi_BS*-T7 Term 操纵子 (pJF678) 共表达 *dxs2_SAV* 和 *idi_BS* 模块进一步提高紫槐二烯的合成, 菌株 BL21 (DE3) pJF678/pJF23 能够合成 80.22 mg/L 的紫槐二烯, 比野生菌提高了 12.2 倍。这些结果表明引入某些外源 MEP 途径基因比强化内源基因能更显著地释放 MEP 途径的潜力。外源 MEP 途径基因因为 *E. coli* MEP 途径重新设计和改造提供了丰富的元件。

2.2 补料分批高密度发酵过程的建立

为了考察菌株 BL21 (DE3) pJF678/pJF23 在发酵过程中的代谢潜能, 本研究先建立了紫槐二烯的高密度发酵过程 (过程 1), 考察了整个发酵过程中 OUR、CER、菌体生长、紫槐二烯产量、残糖浓度和乙酸浓度状况。为了减少发酵过程副产物乙酸的积累, 在保证对数期快速生长的前提下, 整个发酵过程糖流加速率控制在较低的水平 (图 1, 稳定期为 6.05 g/h), 以使对数期和稳定期的 DO 分别维持在 20%–30%和 60%–70%。由图 3 可知对数期菌体生长非常迅速, 约 24 h 后 *OD*₆₀₀ 达到 200 以上, OUR 和 CER 分别达到了 192.09 mmol/(L·h)和 196.09 mmol/(L·h)。随后进入稳定期, 补糖速率维持在 6.05 g/h, 菌体仍保持微弱的生长, *OD*₆₀₀ 缓慢增长到 225 左

右 (60 h), OUR 和 CER 逐渐减小, 36 h 以后维持在 60–70 mmol/(L·h)。在对数期后期, 产物已开始合成, 尤其是在 24–72 h, 产物迅速积累。直到 84 h, 紫槐二烯的产量达到最大, 为 2.50 g/L。质粒稳定性测试发现 120 h 时双质粒的稳定性维持在 78% 以上, 因此质粒稳定性对后期产物合成减慢不会产生影响。整个发酵过程中残糖

和乙酸浓度控制在很低水平, 仅有对数期后期和稳定期后期有少量的残糖 (1.32 g/L) 和乙酸积累 (46.78 mg/L), 不会对菌体产生抑制作用。以上结果表明发酵过程中工程菌株能够稳定的存在, 发酵 24–72 h 是产物合成的关键时期。因此对稳定期控制策略的调整对于强化产物的合成可能具有重要的作用。

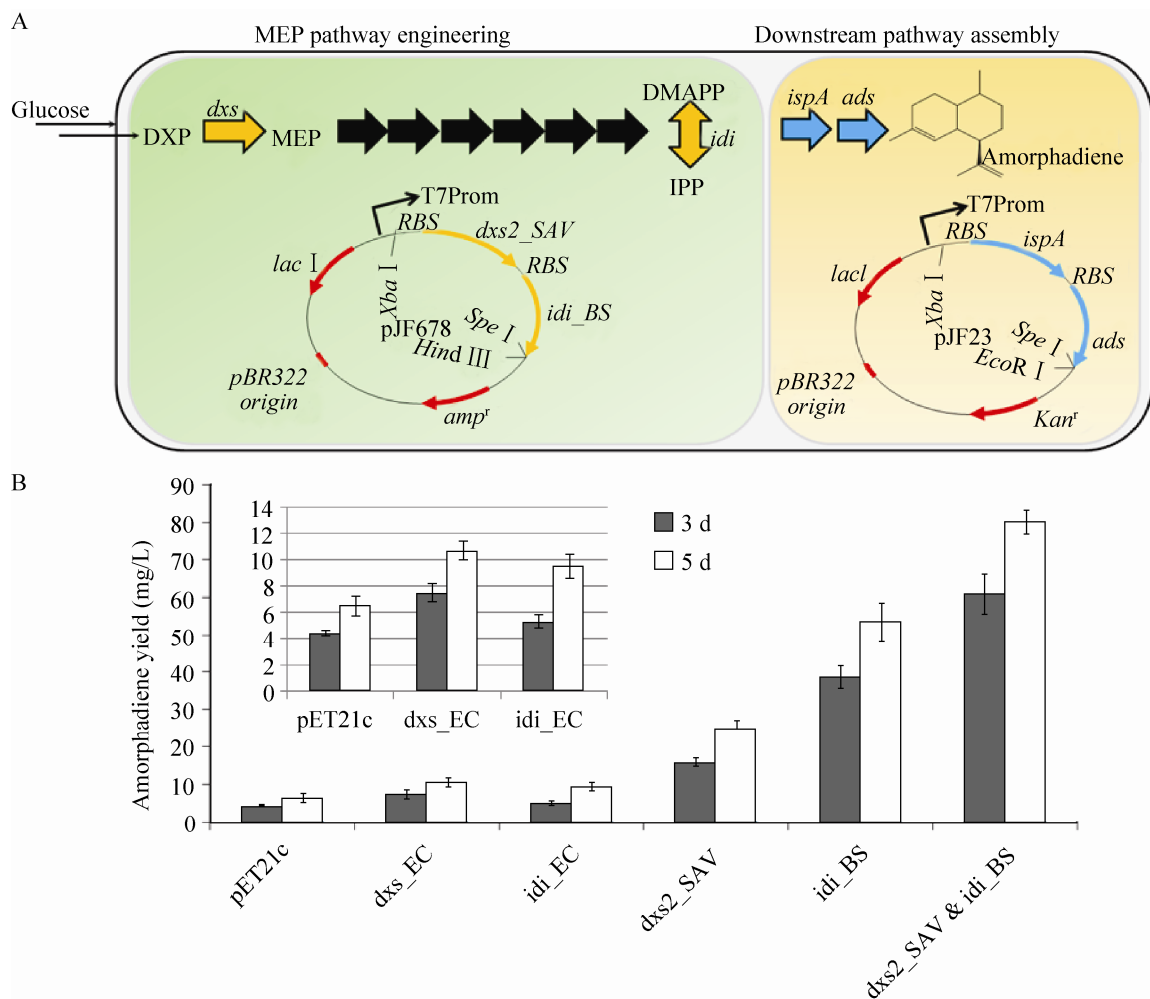


图 2 产萜类大肠杆菌工程菌的构建及紫槐二烯的合成

Fig. 2 Construction of recombinant *E. coli* strain for isoprenoid production and biosynthesis of amorpha-4,11-diene. (A) Strategy for the construction of engineered strains and the maps of plasmids responsible for MEP pathway engineering (pJF678) and amorpha-4,11-diene pathway assembly (pJF23). (B) Amorpha-4,11-diene yield for engineered strains.

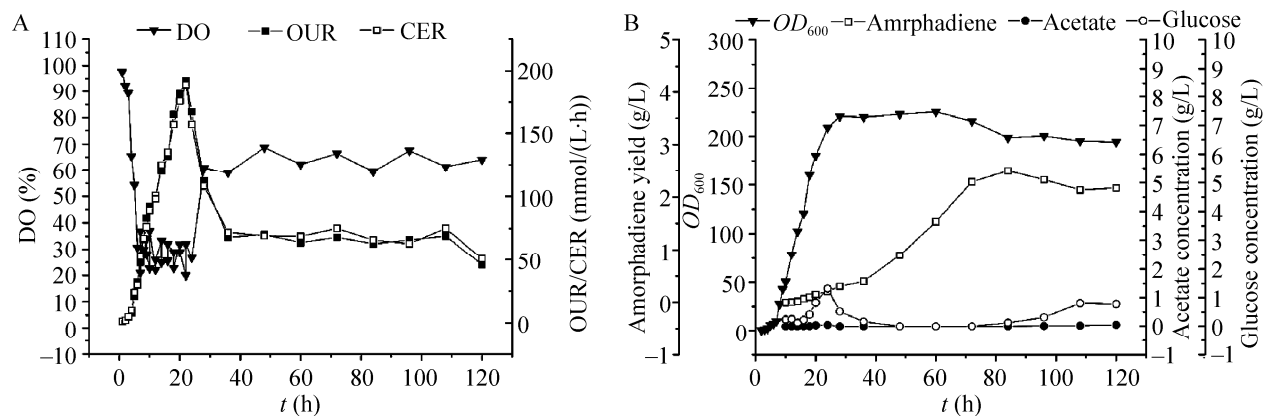


图3 产萜类大肠杆菌工程菌补料分批发酵过程参数曲线

Fig. 3 Process parameters of an *E. coli* feed-batch fermentation process for isoprenoid production. (A) The variation of DO, OUR and CER. (B) The variation of OD_{600} , amorphadiene yield, acetate concentration and residual glucose.

2.3 稳定期补糖控制对紫槐二烯合成的影响

从过程1可以发现稳定期的24–72 h是紫槐二烯快速合成的关键时期，于是我们希望通过调整稳定期的补糖速率来强化产物合成速率和延长产物合成期来增加紫槐二烯的产量。考虑到过程1稳定期糖流加速率 (6.05 g/h) 较低，本研究以此为基础，在维持对数期补糖不变的情况下，通过逐步增加稳定期糖流加速率来考察菌体生长代谢和产物合成的变化。过程2 (9.152 g/h) 和过程3 (14.08 g/h) 稳定期菌体 OD_{600} 缓慢增加到 270 左右，OUR 分别维持在约 90–100 mmol/h 和 120–130 mmol/h，DO 则分别恒定在 40%–50%和 25%–35%。过程4 (19.52 g/h) 糖流加速率最大， OD_{600} 与过程1相当，维持在 230 左右，OUR 从 24 h 的 198.24 mmol/(L·h) 逐渐下降到 120 h 的 30.76 mmol/(L·h)，同时伴随着 DO 逐步上升。比较 4 个过程的产物的积累情况可以发现 (图 4D)，过程 2–4 与过程 1 一样，产物均在 24–72 h 快速合成，最终过程 2 获得了

最高的紫槐二烯产量，发酵 72 h 后达到了 4.85 g/L，比过程 1 提高了 94%。60 h 左右，过程 3 的产物合成速度与过程 2 相比，开始变慢，这可能是过程 3 的副产物乙酸积累比过程 2 更快引起的。过程 4 的补糖速率达到 19.52 g/h，进入稳定期后乙酸马上即开始快速积累，48 h 时即达到 2.73 g/L，严重地影响了发酵过程菌体的生长和产物的积累。从质粒稳定性的测试发现过程 2 和过程 3 的质粒稳定性与过程 1 相似，120 h 时仍维持在 70%，过程 4 丢失比较严重，120 h 仅为 18%左右。以上结果表明，通过产物合成关键期补糖速率的调整，可以显著地增加产物合成速率，增加紫槐二烯的产量，但无法延长产物合成周期。

2.4 控制对数生长期补糖对菌体生长及紫槐二烯合成的影响

从 2.3 的结果稳定期补糖速率调整虽然可以改变 24–72 h 产物合成的速率，无法进一步延长产物的积累时间。考虑到萜类合成需要 MEP

途径提供 DMAPP 和 IPP 前体以及大量的 ATP、还原力,而无论 MEP 途径活性和 ATP、还原力均与菌体生长息息相关。稳定期中前期的 24–72 h,菌体代谢活力较旺盛,能提供较多的能量和辅因子,同时 MEP 途径活性维持在较高的水平,因此工程菌株可以维持较活跃的异源代谢。基于这个推测,本研究进一步调整了对数期糖流加速率,希望通过延长菌体生长周期,达到延长产物合成时间,来增加紫槐二烯的最终产量。因此,在维持稳定期补糖为 9.152 g/h 的情况下,

调整了对数生长期的糖流加速率(图 1A,过程 5),使对数期 DO 维持在 40%–50%左右(图 5A)。由图 5B 可以看到, OD_{600} 值在约 48 h 时才达到 200,随后进入稳定期恒速补糖阶段。在 48–108 h 菌体浓度缓慢增加直到约 108 h, OD_{600} 达到最大值为 258.64。紫槐二烯的产量也一直保持增长,直到约 108 h 达到最大值为 6.1 g/L,在过程 2 的基础上又提高了 25.7%。该结果表明通过适当地减慢菌体生长,可以使菌体调节到更有利于异源萜类代谢产物合成的生理状态。

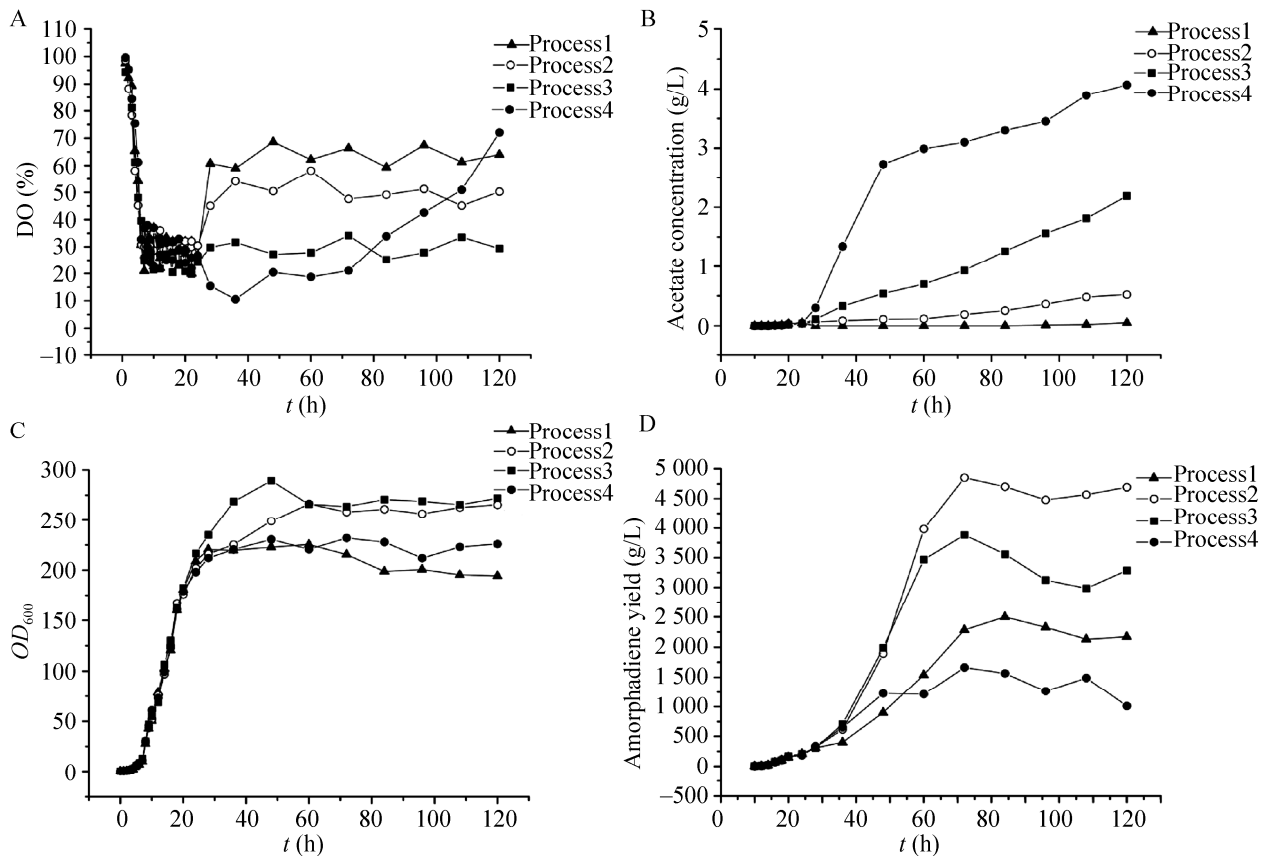


图 4 稳定期补糖速率优化的影响

Fig. 4 Effects of glucose feeding rate optimization during stationary phase. (A) The DO variation of process 1–4. (B) The acetate accumulation of process 1–4. (C) The OD_{600} variation of process 1–4. (D) The amorphadiene accumulation of process 1–4.

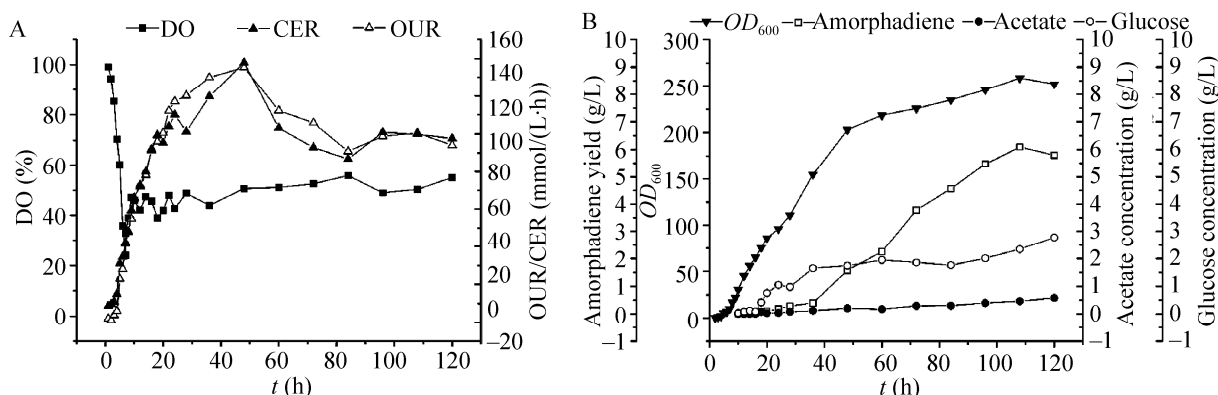


图5 对数生长期糖流加速率调整对产萜类大肠杆菌补料分批发酵的影响

Fig. 5 Effects of glucose feeding rate during stationary phase to a feed-batch fermentation process. (A) The variation of DO, OUR and CER. (B) The variation of OD_{600} , amorphadiene yield, acetate concentration and residual glucose.

3 讨论

随着菌株及下游途径产物的变化, MEP 途径关键基因强化对萜类合成的影响是不同^[12,14-15]。Yuan 等^[12]在菌株 MC1061 中强化了染色体上 *dxs* 和 *idi* 的表达, 使 β -胡萝卜素的产量提高幅度达到 2 倍和 1.4 倍。Zhao 等^[14]在 BL21 (DE3) 中过表达 *dxs*, 使异戊二烯产量提高幅度仅为 50%。Morrone 等^[15]在 C41 Overexpress 菌株中过表达 *dxs* 和 *idi* 后使松香二烯的产量分别降低了 50% 和提高了 50%。这些研究不仅表明 MEP 途径关键基因的强化对提高不同下游萜类产物的合成是不同的, 而且也说明了简单强化内源 MEP 途径基因表达的策略对提高萜类的合成是相对有限的。在过去的十多年里, 多种外源的 MEP 途径基因已经被用于 *E. coli* MEP 途径的强化, 并更有效地改善了异戊二烯和番茄红素等萜类化合物的合成^[22-24]。这些研究预示着不同来源的 MEP 途径基因可以为 *E. coli* 内源 MEP 途径的改造提供丰富的元件。随着大量微生物基因组信息的积累, 链霉菌等原核生物

被发现含有非常多样的 MEP 途径基因元件^[25], 如 *S. avermitilis* 和 *B. subtilis* 自身均以 MEP 途径作为萜类前体途径合成 geosmin^[25] 和异戊二烯^[26] 等次级代谢产物。本实验室在前期的研究中通过对链霉菌属、糖多孢菌属、芽胞杆菌属和欧文氏菌属 MEP 途径模块的挖掘, *idi* 基因发现 *dxs2_SAV* 和 *idi_BS* 这两个 MEP 途径基因能够非常显著地改善 *E. coli* MEP 途径的活性。基于此, 本研究共表达 *dxs2_SAV* 和 *idi_BS* 两个外源 MEP 途径基因模块, 使工程菌在摇瓶中紫槐二烯的产量比野生菌提高了 12.2 倍, 有效地释放 MEP 途径的巨大潜力。基因组信息分析发现 *S. avermitilis* 中存在着 *dxs1* 和 *dxs2* 两个不同的 *dxs* 基因。在工程菌中表达了 *dxs2_SAV* 基因, 能够比强化 *E. coli* 自身 *dxs* 基因更明显地提高萜类的合成, 而表达 *dxs1_SAV* 对紫槐二烯的合成没有影响(未提供数据)。这说明 *S. avermitilis* 的 *dxs1* 和 *dxs2* 基因与 *M. tuberculosis* 的 *dxs1* 和 *dxs2* 一样, 具有完全不同的酶活与调控特性^[23]。*B. subtilis* 的 IDI 酶是典型的二型 IDI 酶。单独过表达 *idi_BS* 能够使紫槐二烯合成提高 8.2 倍,

该发现与已报道的某些 II 型 IDI 酶比 I 型 IDI 酶更能释放 MEP 途径活性一致^[24]。该研究也证明了丰富的异源 MEP 途径基因资源是 MEP 途径潜力挖掘的重要模块。

基于传统蛋白表达的 *E. coli* 高密度发酵方法^[18]，本研究首先建立了简单的补料分批培养过程，发现稳定期的 24–72 h 是紫槐二烯积累的关键时期。对发酵过程稳定期糖流加速率进行优化调控后，紫槐二烯产量提高了 94%。无论是化合物异源合成还是蛋白表达高密度培养过程，葡萄糖作为唯一碳源，为菌体生长维持和产物的合成提供必要的物质基础和 ATP、NADPH 等能量与辅因子。但异源合成与蛋白表达在基因表达、生理代谢两个层次上存在很大差异。蛋白表达往往需要将尽可能多的物质和能量导向蛋白质合成代谢以使蛋白质合成最大化，而异源合成需要实现前体及下游途径基因的适量表达，以平衡物质和能量代谢流的平衡，尽可能多地导向目的产物的合成^[28]。因此与蛋白表达一样^[29]，建立适合异源合成工程菌的糖流加工工艺对产物合成具有显著的影响。在过程 1 和过程 2 中的糖流加速率下，没有明显的副产物乙酸积累，过程 2 比过程 1 具有更大糖耗和代谢流以支持产物合成。继续增大补糖后，过程 3 中 60 h 后乙酸积累增加，影响了产物的合成，而过程 4 中，由于补糖速率过大，菌体生长和产物合成受到明显抑制。因此通过产物合成期的糖流加速率的优化可以找到平衡工程菌物质和能量代谢之间、自身生长维持与异源代谢之间的控制点，从反应器水平最大限制度发挥工程菌的潜力。此外稳定期补糖速率的调整无法延长产物快速积累的周期。而通过调整对数期的补糖速率来延长菌体生长周期的策略，

可以有效地延长产物的积累。这可能是因为当前期菌体快速生长时，发酵到 72 h 时菌体已开始老化，而 MEP 途径是与菌体生长密切相关，菌体老化导致细胞维持代谢消耗增加，进入 MEP 途径的代谢流量减少，从而影响工程菌萜类前体的供应。延长菌体的生长周期，可以较长时间地保持菌体代谢活力和萜类前体的供应，增加紫槐二烯的产量。

REFERENCES

- [1] Yadav VG, De Mey M, Lim CG, et al. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metab Eng*, 2012, 14(3): 233–241.
- [2] Lee JW, Na D, Park JM, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 536–546.
- [3] Keasling JD. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 2010, 330(6009): 1355–1358.
- [4] Immethun CM, Hoynes-O'Connor AG, Balassy A, et al. Microbial production of isoprenoids enabled by synthetic biology. *Front Microbiol*, 2013, 4(75): 1–8.
- [5] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943.
- [6] Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, et al. High-level production of amorpho-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2009, 4(2): e4489.
- [7] Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1079–1089.
- [8] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70–74.
- [9] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central

- metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17(0): 42–50.
- [10] Partow S, Siewers V, Daviet L, et al. Reconstruction and evaluation of the synthetic bacterial MEP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52498.
- [11] Meng H, Wang Y, Hua Q, et al. In silico analysis and experimental improvement of taxadiene heterologous biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioproc E*, 2011, 16(2): 205–215.
- [12] Morrone D, Lowry L, Determan MK, et al. Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: comparison of MEV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(6): 1893–1906.
- [13] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796–802.
- [14] Zhao Y, Yang J, Qin B, et al. Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(6): 1915–1922.
- [15] Yuan LZ, Rouvière PE, LaRossa RA, et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metabolic Engin*, 2006, 8(1): 79–90.
- [16] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Characterization of lycopene-overproducing *E. coli* strains in high cell density fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 968–974.
- [17] Newman JD, Marshall J, Chang M, et al. High-level production of amorpho-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(4): 684–691.
- [18] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(3): 98–105.
- [19] Meng H, Wang J, Xiong Z, et al. Quantitative design of regulatory elements based on high-precision strength prediction using artificial neural network. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e60288.
- [20] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt Chem*, 1959, 31(3): 426–428.
- [21] Li BQ, Deng YJ, Yang JW. Determining concentration of ammonium ion in external environment of blank liposome by phenol-hypochlorite reaction. *Chin J Pharm*, 2006, 4(4): 181–185 (in Chinese).
李宝齐, 邓英杰, 杨静文. 苯酚-次氯酸盐法测定空白脂质体透析液中铵离子浓度. *中国药剂学杂志*, 2006, 4(4): 181–185.
- [22] Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, et al. Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie*, 2012, 94(8): 1621–1634.
- [23] Brown AC, Eberl M, Crick DC, et al. The nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* is essential and transcriptionally regulated by *dxs*. *J Bacteriol*, 2010, 192(9): 2424–2433.
- [24] Kajiwarra S, Fraser PD, Kondo K, et al. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1997, 324(Pt 2): 421–426.
- [25] Rad SA, Zahiri HS, Noghabi KA, et al. Type 2 IDI performs better than type 1 for improving lycopene production in metabolically engineered *E. coli* strains. *World J Microb Biotechnol*, 2012, 28(1): 313–321.
- [26] Cane DE, He X, Kobayashi S, et al. Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase. *J Antibiot*, 2006, 59(8): 471–479.
- [27] Wagner WP, Helmig D, Fall R. Isoprene biosynthesis in *Bacillus subtilis* via the methylerythritol phosphate pathway. *J Nat Prod*, 2000, 63(1): 37–40.
- [28] Na D, Kim TY, Lee SY. Construction and optimization of synthetic pathways in metabolic engineering. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(3): 363–370.
- [29] Li X, Taylor KB. Effect of glucose on the expression parameters of recombinant protein in *Escherichia coli* during batch growth in complex medium. *Biotechnol Prog*, 1994, 10(2): 160–164.

(本文责编 陈宏宇)