

# 基于 PTS 缺陷型大肠杆菌构建莽草酸生产菌

邹永康<sup>1,2</sup> 周军智<sup>1,2,3</sup> 孙旭<sup>2,4</sup> 蔡亚非<sup>1</sup> 戴红梅<sup>2</sup> 李树龙<sup>2</sup> 周长林<sup>4</sup> 方宏清<sup>2\*</sup>

(1. 安徽师范大学 生命科学学院 安徽 芜湖 241000)

(2. 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(3. 北京师范大学 生命科学学院 北京 100875)

(4. 中国药科大学 生命科学与技术学院 江苏 南京 210009)

**摘要:** 对大肠杆菌芳香族氨基酸合成途径进行代谢流改造, 以实现高效的生物制备莽草酸。以磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS 系统)敲除菌 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* (DHP)为基础, 特异性敲除 *aroL*、*ydiB* 基因并转入受阿拉伯糖诱导表达的 T7-RNA 聚合酶基因, 最终构建一系列产莽草酸宿主菌。再将 *aroE*、*aroB*、*tktA*、*glk*、*aroF*<sup>fbr</sup> 组成的系列基因串联起来置于质粒上, 在 T7 启动子控制下表达, 经摇瓶培养检测得知, 不同重组菌产莽草酸能力与对照相比均有明显提高, 其中 DHPYA-T7/pAOC-TGEFB 菌株产量最高, 可达到 392 mg/L。为进一步构建高表达莽草酸工程菌奠定基础。

**关键词:** *ptsHIcrr* 操纵子, 莽草酸, *aroL*, *ydiB*

## Construction of shikimic acid-producing engineered *Escherichia coli* strains based on *ptsHIcrr* mutants

ZOU Yong-Kang<sup>1,2</sup> ZHOU Jun-Zhi<sup>1,2,3</sup> SUN Xu<sup>2,4</sup> CAI Ya-Fei<sup>1</sup> DAI Hong-Mei<sup>2</sup>  
LI Shu-Long<sup>2</sup> ZHOU Chang-Lin<sup>4</sup> FANG Hong-Qing<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China)

(2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

(3. College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

(4. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

**Abstract:** Metabolic engineering for aromatic amino acid biosynthesis pathway in *Escherichia coli* to acquire high-level biosynthesis of shikimic acid was reported. Knockout of *aroL*, *ydiB* genes and knock-in of T7-RNA-Polymerase gene which expression was controlled by L-arabinose based on the initial strain DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* (DHP), resulted in a series of shikimic acid-producing host strains. A series of tandem genes consisting of *aroE*, *aroB*, *tktA*, *glk* or *aroF*<sup>fbr</sup> were controlled by T7 promoter on

plasmids were transformed into these host strains. According to the concentration of shikimic acid in shake-flask culture, all the engineered strains displayed high-potentiality compared to the control strain DHP, and the strain DHPYA-T7/pAOC-TGEFB synthesized the highest yield of 392 mg/L of shikimic acid. This study layed a strong foundation for constructing a high-level shikimic acid-producing engineered strain.

**Keywords:** *PtsHlcr* operon, Shikimic acid, *aroL*, *ydiB*

莽草酸是芳香族氨基酸合成途径中第一个被鉴定出的中间体, 该途径(图 1)广泛存在于微生物和植物中, 终产物为 L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和 L-色氨酸等芳香族氨基酸<sup>[1-2]</sup>。莽草酸是抗禽流感药物“达菲”合成的关键手性起始原料<sup>[3]</sup>。目前生产所需莽草酸大部分来自于木兰科植物八角, 生产工艺复杂, 得率较低<sup>[4]</sup>, 原料易受季节、气候等因素限制, 难以满足大规模生产所需。对微生物芳香族氨基酸代谢流改造以提高莽草酸产量具有广阔前景。目前莽草酸

生物合成主要围绕对 CCM (Central carbon metabolism)和芳香族氨基酸合成途径的基因改造<sup>[5]</sup>。

糖酵解途径中间产物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和磷酸戊糖途径中间产物 4-磷酸赤藓糖(E4P)是芳香族氨基酸合成途径的前体物质, 经 3-脱氧- $\alpha$ -阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合酶(DAHP 合酶)催化作用下生成 3-脱氧- $\alpha$ -阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)。大肠杆菌 DAHP 合酶同功酶分别由 *aroF*、*aroG*、*aroH* 基因编码, 它们分别受芳香族氨基酸 L-酪氨酸、L-苯丙氨

Central carbon metabolism in DHP

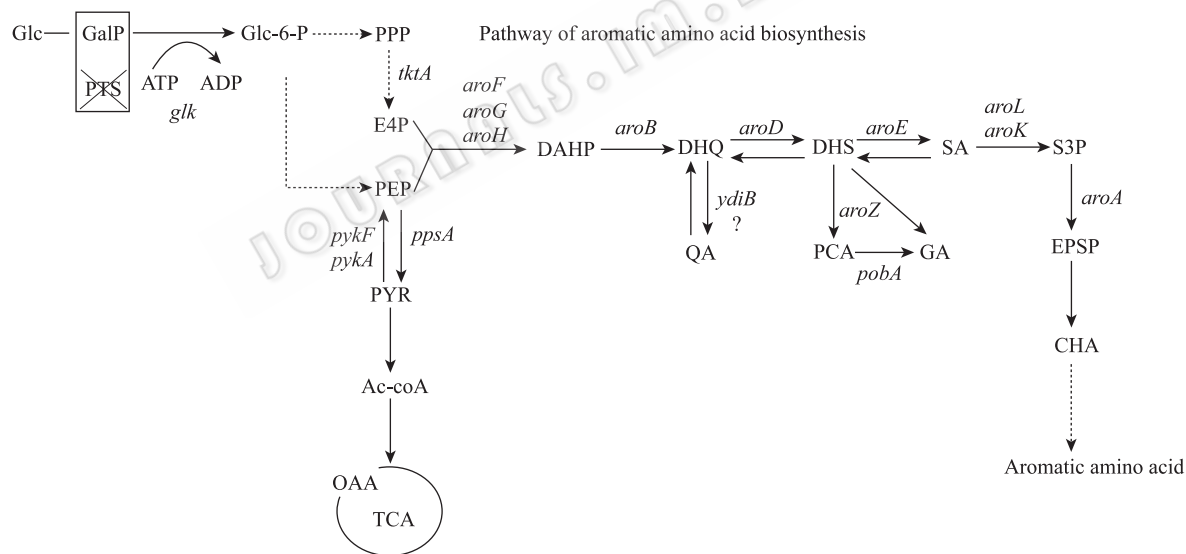


图 1 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHlcr* 中 CCM 途径和芳香族氨基酸合成途径

Fig. 1 Central carbon metabolism and shikimic acid pathways in DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHlcr*

Note: Glc: Glucose; GalP: galactose permease; Glc-6-P: Glucose-6-P; Glk: Glucokinase; PEP: Phosphoenol pyruvate; PYR: Pyruvate; Ac-CoA: Acetyl coenzyme-A; TCA: Tricarboxylic acid cycle; OAA: Oxaloacetate; PPP: Pentose phosphate pathway; E4P: Erythrose-4-P; DAHP: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-P; DHQ: 3-dehydroquinic acid; DHS: 3-dehydroshikimic acid; SA: Shikimic acid; S3P: Shikimate-3-P; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; CHA: Chorismic acid; QA: Quinic acid; PCA: Protocatechuic acid; GA: Gallic acid. Genes and coded enzymes: *tktA*, transketolase I; *pykF*, pyruvate kinase I; *pykA*, pyruvate kinase II; *ppsA*, phosphoenolpyruvate synthase; *aroF*, *aroG*, *aroH*, DAHP synthase isoenzymes F, G and H, respectively; *aroB*, DHQ synthase; *aroD*, DHQ dehydratase; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *aroK*, shikimate kinase I; *aroL*, shikimate kinase II; *aroA*, EPSP synthase; *aroC*, chorismate synthase; *aroZ*, dehydroshikimate dehydratase; *pobA*, p-hydroxy-benzoate hydroxylase<sup>[5]</sup>. Continuous arrows represent unique reactions catalyzed by one or more enzymes. Dotted lines or arrows represent two or more enzymatic reactions or incomplete characterized reactions.

酸和 L-色氨酸反馈抑制。DAHP 在脱氢奎尼酸合酶 (*aroB* 编码)催化下产生 3-脱氢奎尼酸(DHQ)。脱氢奎尼酸脱水酶(*aroD* 编码)催化 DHQ 脱水得到 3-脱氢莽草酸(DHS), DHS 再由莽草酸脱氢酶(*aroE* 编码)催化合成莽草酸。莽草酸经由大肠杆菌 2 个莽草酸激酶同功酶(*aroK* 和 *aroL* 编码)催化形成 3-磷酸莽草酸(S3P), S3P 再经一系列生化反应最终产生芳香族氨基酸。分析代谢中间产物还发现 DHQ 合酶是限速酶, 莽草酸脱氢酶受到莽草酸的反馈抑制<sup>[6]</sup>, 这为我们进行代谢改造提供依据。

我们的研究及他人文献报道 *ptsHlcr* 基因敲除或突变解除了“分解物代谢阻遏现象”<sup>[7-8]</sup>, 能更有效地利用复合培养基水解产物来维持菌体生长, PTS 系统缺失菌株依赖 GalP 及 Glk 以 ATP 提供的磷酸基进行葡萄糖磷酸化转运, 该葡萄糖转运系统提高胞内 PEP 的利用率, 有利于增加碳流进入芳香族氨

基酸途径。本实验以 DHP 为出发菌株, 首先敲除 *aroL* 基因, 阻断部分莽草酸代谢途径, 使得莽草酸能够有效积累, 同时又能少量合成芳香族氨基酸以维持菌体生长; 再敲除 *ydiB* 基因以探究其对莽草酸产量和代谢途径副产物的作用, 为解决整个代谢途径中的限速酶和反馈抑制问题, 将 *tktA*、*glk*、*aroE*、*aroF<sup>ubr</sup>*、*aroB* 基因等基因串联克隆到质粒, 并置于 T7 启动子控制下进行表达。通过同源重组将阿拉伯糖启动子控制表达的 T7-RNA 聚合酶基因整合到宿主染色体上, 宿主在阿拉伯糖诱导下稳定表达 T7-RNA 聚合酶以表达 T7 启动子所控制的相关基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒: 所用的菌株和质粒列于表 1。

表 1 菌株与质粒  
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains or plasmids	主要特征 Relevant characteristics	来源 Source
DHP	DH5aΔ <i>ptsHlcr</i>	Reference [8]
DHP-T7	Knock-in of <i>T7-RNA-Pol</i> gene in DHP	This study
DHPA-T7	DHP-T7Δ <i>aroL</i>	This study
DHPYA-T7	DHPA-T7Δ <i>ydiB</i>	This study
pKDS	Arabinose-inducible promoter that drives expression of λ-Red recombination proteins, and <i>I-Sce</i> I endonuclease, temperature-sensitive replicon, Cm <sup>r</sup>	Reference [8]
Target plasmid	Homology region lapped fragment of target gene cloned into pET-28a	This study
pET-3b-tktA	2.0 kb <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing site-specific mutagenesis <i>tktA</i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-3b, Amp <sup>r</sup>	This study
pET-22b-glkl	1.0 kb <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing site-specific mutagenesis <i>glk</i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-22b, Amp <sup>r</sup>	This study
pET-3b-aroE	0.8 kb <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing <i>aroE</i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-3b, Amp <sup>r</sup>	This study
pET-22b- <i>aroF<sup>ubr</sup></i>	1.1 kb <i>Xho</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing site-specific mutagenesis <i>aroF<sup>ubr</sup></i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-22b, Amp <sup>r</sup>	This study
pET28a- <i>aroB</i>	1.1 kb <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing <i>aroB</i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-28a, Kan <sup>r</sup>	This study
pET-3b-TG	3.0 kb <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing site-specific mutagenesis <i>glk</i> , <i>tktA</i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-3b-tktA, Amp <sup>r</sup>	This study
pET-3b-EFB	3.0 kb <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> H I fragment containing <i>aroE</i> , <i>aroB</i> , site-specific mutagenesis <i>aroF<sup>ubr</sup></i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-22b, Amp <sup>r</sup>	This study
pET-3b-TGEFB	6.0 kb <i>Bgl</i> II- <i>Bam</i> H I fragment containing <i>aroE</i> , <i>aroB</i> , site-specific mutagenesis <i>glk</i> , <i>tktA</i> , <i>aroF<sup>ubr</sup></i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pET-22b, Amp <sup>r</sup>	This study
pAOC	lacO, P15Aori, Cm <sup>r</sup>	This study
pAOC-TGEFB	6.0 kb <i>Bgl</i> II- <i>Eco</i> R I fragment containing <i>aroE</i> , <i>aroB</i> , site-specific mutagenesis <i>glk</i> , <i>tktA</i> , <i>aroF<sup>ubr</sup></i> gene of <i>E. coli</i> cloned into pAOC, Cm <sup>r</sup>	This study

**1.1.2 培养基、酶和试剂:** LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母抽提物 5, NaCl 10。发酵培养基(g/L):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  7,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  3, NaCl 2.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, 蛋白胨 10, 酵母粉 15, 葡萄糖 25。

限制性内切酶、DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; Easy Taq DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司; 莽草酸标准品购自北京欣经科生物技术有限公司; 氯霉素、卡那霉素等购自 Amresco 公司; Electroporation System ECM 399 购自 Harvard Apparatus 公司, 其他均为分析纯化学试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 一步无痕敲除 *aroL*、*ydiB* 基因<sup>[8]</sup>:** 以 DH5 $\alpha$  基因组为模板, 分别设计引物扩增目的基因上下游同源臂, 通过重叠 PCR 方法连接上下游同源臂, 并通过限制性内切酶酶切后和 pET-28a 载体连接, 构建打靶质粒。利用电击转化方法将打靶质粒和辅助质粒 pKDS 一同转化至宿主菌, 获得共转菌液。取 500  $\mu$ L 共转菌于 50 mL 含有氯霉抗性的 LB 液体培养基, 30  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至  $OD_{600}$  约 0.2 时, 加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导 4 h, 诱导结束后取 100  $\mu$ L 诱导菌液稀释至  $10^{-4}$ , 再取稀释菌液 ( $10^{-4}$ ) 100  $\mu$ L 涂布氯霉抗性平板, 30  $^{\circ}$ C 培养。以平板上单菌落为模板, 同源臂两侧各取一条引物进行 PCR 鉴定, 阳性菌落 42  $^{\circ}$ C 剔除质粒并传代纯化即得到敲除菌株。

**1.2.2 一步法敲入阿拉伯糖启动子控制表达的 T7-RNA 聚合酶基因<sup>[9]</sup>:** 以 BL21(AI) 基因组为模板, PCR 扩增得到 T7-RNA 聚合酶基因和 *Tetr* 基因作为打靶片段, 使用 1.2.1 方法进行目的片段敲入。

**1.2.3 摇瓶培养:** 在 LB 液体培养基中接种大肠杆菌重组菌, 37  $^{\circ}$ C 培养 12 h, 用发酵培养基洗涤菌体 1 次, 按 5% 接种量接种于 50 mL 发酵培养基中,  $OD_{600}$  约 0.3 时加入 L-Ara 至终浓度 0.2% 诱导表达, 37  $^{\circ}$ C 培养 72 h。

**1.2.4 莽草酸含量测定<sup>[10]</sup>:** 高碘酸氧化法: 取 250  $\mu$ L 发酵上清液加入 250  $\mu$ L 高碘酸盐试剂, 37  $^{\circ}$ C 保温 0.5 h 后加入 500  $\mu$ L  $Na_2SO_3$  和 NaOH 混合溶液, 混匀后在波长 382 nm 下测量吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因工程菌株的获得与鉴定

依据 1.2.1 和 1.2.2 所述方法筛选得到菌株 DHP-T7、DHPA-T7 和 DHPYA-T7。基因敲除和敲入均在同源臂两侧取引物鉴定, PCR 鉴定结果(图 2)和测序(结果未显示)进一步确认成功敲除 *aroL*、*ydiB* 基因, 并成功敲入 T7-RNA 聚合酶基因。

### 2.2 基因克隆与共表达载体构建

以大肠杆菌 DH5 $\alpha$  染色体为模板, 基因克隆与表达操作过程如图 3 所示, 构建了不同组合的基因共表达载体, 分别转化至 DHP-T7、DHPA-T7 和 DHPYA-T7 菌株, 比较其生产莽草酸的能力。

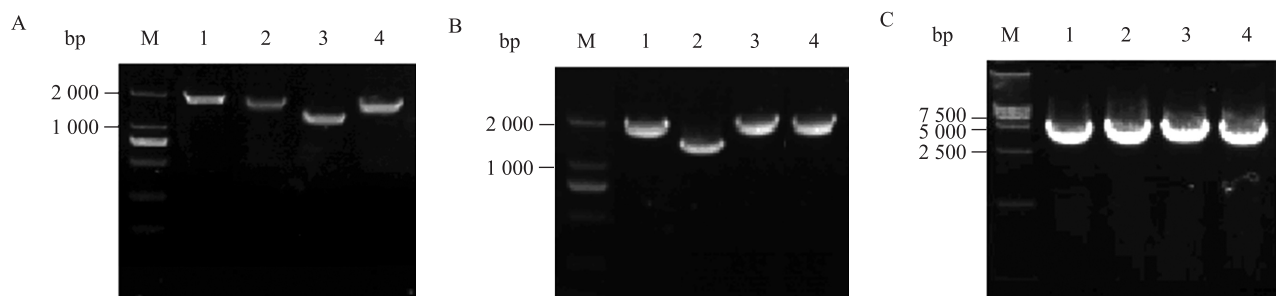


图 2 大肠杆菌基因敲除和敲入鉴定

Fig. 2 Identification of *E. coli* genes knockout and knock-in

注: A: 1、2、4: 阴性条带, 2 000 bp; 3: 阳性条带, 2 500 bp。B: 1、3、4: 阴性条带, 2 200 bp; 2: 阳性条带, 1 500 bp。C: 1、2、3、4: 阳性条带, 5 000 bp。

Note: A: Identification of *aroL* gene knockout strain. 1,2,4: Negative strips, 2 000 bp; 3: Positive strip, 2 500 bp. B: Identification of *ydiB* gene knockout strain. 1,3,4: Negative strips, 2 200 bp; 2: Positive strip, 1 500 bp. C: Identification of *T7-RNA-Pol* and *Tetr* genes knock-in strain. 1,2,3,4: Positive strips, 5 000 bp.

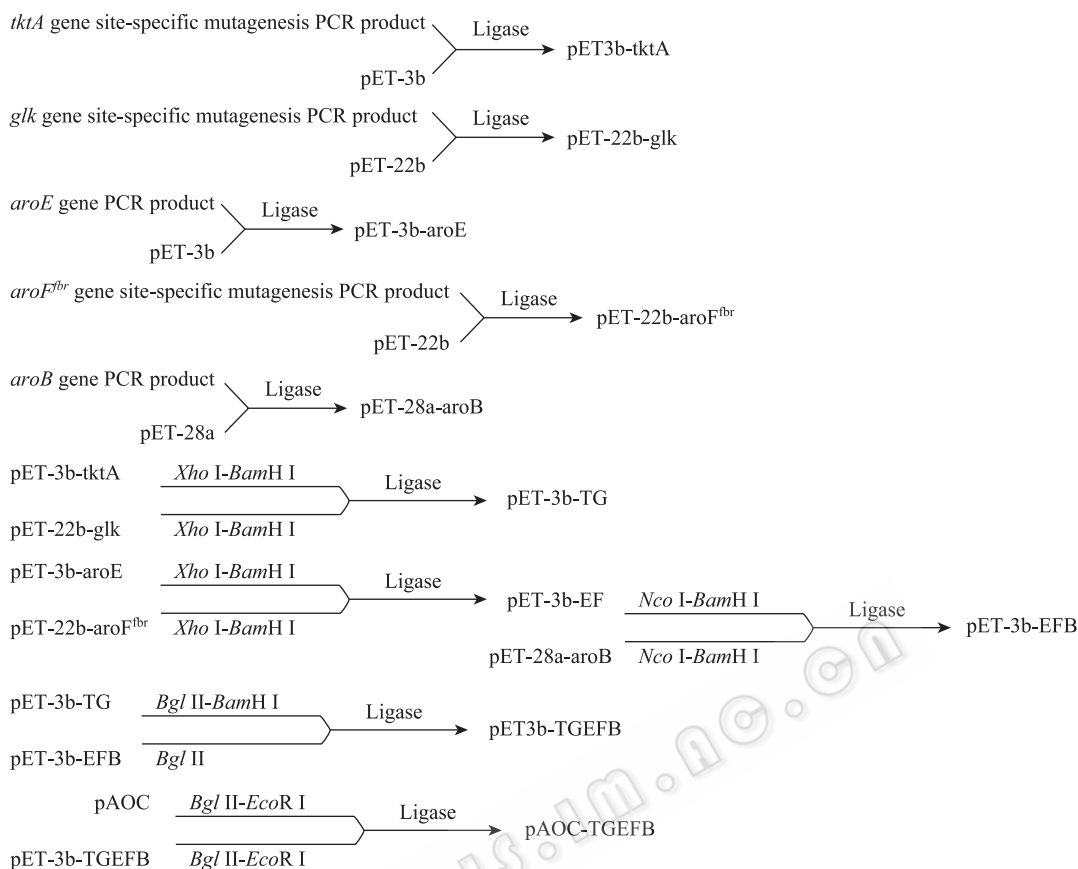


图3 基因克隆与表达载体构建

Fig. 3 Construction of gene clone and expression plasmids

### 2.3 摇瓶培养重组菌产莽草酸含量比较

**2.3.1 基因共表达:** 如图4所示,以不含质粒的DHPYA-T7宿主菌株作为对照,转入*tktA*、*glk*共表达质粒扩增表达转酮醇酶和葡萄糖激酶,分别提高芳香族氨基酸合成途径2个前体物质4-磷酸赤藓糖(E4P)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的含量,以增加进入该途径的碳流,莽草酸产量提高3倍,达到24 mg/L。同一宿主菌转入*aroE*、*aroF<sup>fbr</sup>*、*aroB*共表达质粒,莽草酸产量提高9倍,达到65 mg/L。将上述5个基因共表达,带有pET3b-TGEFB质粒的菌株莽草酸产量显著提高,在55 h时比对照组提高了24倍,达到150 mg/L。实验结果表明PEP和E4P作为进入整个芳香族氨基酸合成途径的前体物质,其产量和利用率是提高莽草酸产量的基础。不优化CCM途径,而仅仅扩增表达*aroE*、*aroF<sup>fbr</sup>*、*aroB*基因,莽草酸产量提高潜力有限。只有综合改造

CCM途径和芳香族氨基酸合成途径才能显著提高莽草酸产量。携带低拷贝质粒pAOC-TGEFB的菌株莽草酸55 h时产量达到289 mg/L,这可能与低拷贝质粒稳定表达有关,也表明基因的稳定表达对莽草酸合成至关重要,也许将它们全部整合到染色体能具有更好的稳定性。此外,不同菌株生长曲线无明显差异(数据未显示),可以排除菌体生长速度差异对莽草酸产量的影响。比较结果发现表达pAOC-TGEFB的菌株莽草酸产量最高,因此我们选择该质粒以进行后续实验。

**2.3.2 基因共表达载体在不同宿主菌中的莽草酸产量比较:** pAOC-TGEFB转化至不同宿主菌,图5结果显示DHPA-T7/pAOC-TGEFB比DHP-T7/pAOC-TGEFB莽草酸产量高,说明敲除*aroL*基因后,阻断了部分莽草酸代谢途径,莽草酸得以有效积累。DHPA-T7/pAOC-TGEFB的起始SA产量比

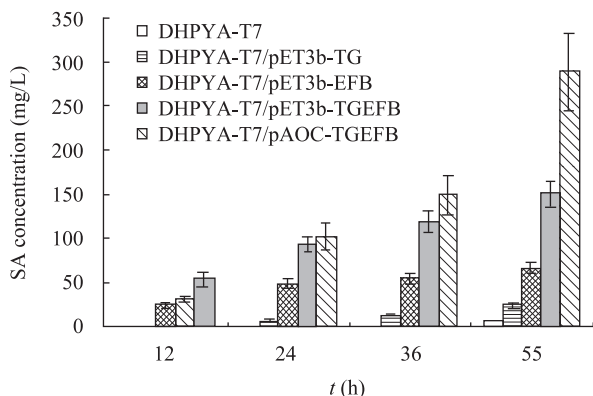


图4 相同宿主菌中不同表达载体的莽草酸产量比较  
Fig. 4 Comparison of SA concentration of different plasmids in DHPYA-T7

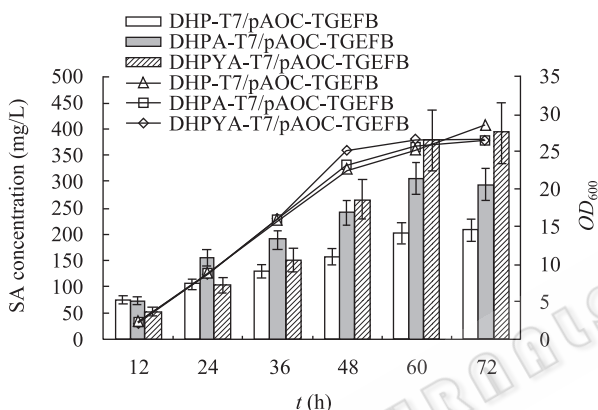


图5 莽草酸生产菌株的莽草酸产量比较  
Fig. 5 Comparison of SA concentration of SA-producing derivatives

注: 柱形图表示莽草酸浓度; 折线图表示 OD<sub>600</sub>.

Note: The histogram represents SA concentration. The polygram represents OD<sub>600</sub>.

DHPYA-T7/pAOC-TGEFB 菌株高, 但约 36 h 后 DHPYA-T7/pAOC-TGEFB 的产量开始增加并逐渐超越 DHPA-T7/pAOC-TGEFB (图 5), 这可能与 *ydiB* 基因敲除有关。据文献报道 *YdiB* 是一种双功能酶(奎尼酸/莽草酸脱氢酶), 与奎尼酸(QA)代谢紧密相关<sup>[11]</sup>, 我们推测 *ydiB* 基因敲除后菌株缺乏奎尼酸脱氢酶活性, DHQ 合成 QA 途径受阻, 副产物 QA 产量下降, DHQ 得到积累并在脱氢奎尼酸脱水酶催化下合成大量 DHS; 而莽草酸脱氢酶活性可以通过 *aroE* 的过表达得到补偿, 高浓度的 DHS 作为莽草酸脱氢酶的底物, 高效合成莽草酸, 目的产物产量显著提

高。实验结果中重组菌 DHPYA-T7/pAOC-TGEFB 莽草酸产量提高最为有效, DHPA-T7/pAOC-TGEFB 次之, 不同组的生长曲线(图 5)也无明显差异, 说明莽草酸产量差异并非由菌体生长速度造成, 而是由菌株代谢途径改造引起。

### 3 讨论

随着近年来莽草酸商业化需求增加, 利用微生物代谢工程提高莽草酸产量成为研究的热点。据文献报道 PTS 缺失菌可以利用更高浓度的葡萄糖(100 g/L)<sup>[12-13]</sup>, 或者同时利用葡萄糖和其它不同的碳源<sup>[14-15]</sup>, 在 PTS 缺失菌基础上失活 *aroL* 和 *aroK* 基因, 并转入带有 *aroG<sup>br</sup>*、*tktA*、*aroB* 和 *aroE* 基因的质粒, 该菌株可以高效地将 CCM 途径的碳流运输至莽草酸合成途径, 在发酵罐中控制培养条件, 在 25 g/L 葡萄糖浓度时莽草酸产量达到 7 g/L, 而当葡萄糖浓度升高至 100 g/L 时, 莽草酸产量升至 14 g/L<sup>[5]</sup>。文献中大量研究以随机筛选获得 PTS 缺陷株为基础。为了构建具有自主知识产权的莽草酸生产菌, 我们利用重组技术对大肠杆菌的糖代谢途径及芳香族合成途径进行了改造。

我们早先利用建立基因组修饰方法敲除了常用大肠杆菌 DH5α 的 *ptsHicrr* 操纵子<sup>[8]</sup>, 本文在此基础上进一步敲除 *aroL*、*ydiB* 基因并敲入 T7-RNA 聚合酶基因, 同时转入 *tktA*、*glk*、*aroE*、*aroF<sup>br</sup>* 和 *aroB* 基因串联表达质粒, 得到系列重组菌, 摇瓶培养测定莽草酸含量, 重组菌莽草酸产量均有不同程度增加, 其中以菌株 DHPYA-T7/pAOC-TGEFB 的莽草酸产量最高, 摇瓶培养莽草酸 72 h, 产量可达到 392 mg/L, 高于目前国内文献报道的最高摇瓶培养水平<sup>[16]</sup>。由于在摇瓶中无法控制恒定的培养条件, 暂时无法与文献报道数据进行详细比较。我们实验结果还表明, 当系列串联基因克隆在低拷贝质粒上(pACYC 系列)时, 与高拷贝数质粒(pET 系列)相比具有更高的表达水平, 这可能与高拷贝数质粒稳定性较低有关, 提示我们将这些串联基因整合到染色体上也许能获得更好的结果。

大肠杆菌莽草酸代谢途径中副产物 QA、DHS

的产生也影响莽草酸产量和得率,该途径中奎尼酸、3-脱氢莽草酸和莽草酸的代谢平衡是副产物的主要来源<sup>[17]</sup>,如何避免积累在发酵液中的莽草酸再次转运回细胞质中代谢是提高莽草酸产量的关键。据报道 *ydiB* 基因对 QA 的合成影响较大<sup>[11]</sup>,本实验对莽草酸生产菌株 *ydiB* 基因敲除的同时过表达 *aroE* 基因,阻碍平衡中 DHQ 向 QA 转化,有利于 DHS 积累并由莽草酸脱氢酶催化合成莽草酸,培养 72 h 后,重组菌 DHPYA-T7/pAOC-TGEFB 比 DHPA-T7/pAOC-TGEFB 的莽草酸产量高近 1/3,首次证明 *ydiB* 基因敲除可提高莽草酸产量。

芳香族氨基酸合成途径中, *aroK* 基因编码的莽草酸激酶 II 催化莽草酸合成 S3P 也阻碍莽草酸的积累。本文未敲除 *aroK* 基因是因为 *aroL*、*aroK* 双敲除菌对菌体生长不利。为了既不影响菌体生长又能减少 S3P 的形成,我们目前正在研究利用反义 RNA 调控基因表达的手段在培养后期抑制 *aroK* 的表达。

由于莽草酸合成涉及 CCM 途径和芳香族氨基酸合成途径,限速步骤和代谢支路较多,还有一些尚未确认的反应步骤,同时还需要考虑 QA、DHS、DAHP、S3P 等副产物含量,后续研究还将依赖组学分析、碳流代谢分析等结果,以寻找新的改造靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Herrmann KM. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 907-919.
- [2] Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology[M]. Washington DC: American Society of Microbiology, 1996: 458-484.
- [3] Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2003, 5(4): 277-283.
- [4] Haslam E. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites[M]. Chichester, New York: John Wiley and Sons Ltd, 1993: 8.
- [5] Escalante A, Calderón R, Valdivia A, et al. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 21.
- [6] Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115(24): 11581-11589.
- [7] Flores S, Flores N, De Anda R, et al. Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2005, 10(1): 51-63.
- [8] 周军智, 邹永康, 戴红梅, 等. 大肠杆菌 *ptsHicrr* 操纵子的快速敲除及敲除菌生长性能测定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(8): 1146-1152.
- [9] 沈林, 方宏清, 戴红梅, 等. 通过一种新方法使 T7 基因 I 置换 *araBAD* 基因簇[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(5): 643-646.
- [10] 先正达有限公司. 莽草酸的检测方法: 中国, 00806428.8[P]. 2002-05-29.
- [11] Michel G, Roszak AW, Sauvé V, et al. Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its Paralog YdiB: a common structural framework for different activities[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(21): 19463-19472.
- [12] De Anda R, Lara AR, Hernández V, et al. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(3): 281-290.
- [13] Lara AR, Vázquez-Limón C, Gosset G, et al. Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(6): 1164-1175.
- [14] Kambourakis S, Draths KM, Frost JW. Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(37): 9042-9043.
- [15] Flores N, Flores S, Escalante A, et al. Adaptation for fast growth by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(2): 70-87.
- [16] 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[J]. *华东理工大学学报*, 2009, 35(2): 207-212.
- [17] Knop DR, Draths KM, Chandran SS, et al. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(42): 10173-10182.