

利用代谢工程改善大肠杆菌的3-脱氢莽草酸生产

元飞^{1,2}, 陈五九², 贾士儒¹, 王钦宏²

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

元飞, 陈五九, 贾士儒, 等. 利用代谢工程改善大肠杆菌的3-脱氢莽草酸生产. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1549–1560.

Yuan F, Chen WJ, Jia SR, et al. Improving 3-dehydroshikimate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1549–1560.

摘要: 3-脱氢莽草酸是芳香族氨基酸合成代谢途径中的一种重要中间产物。除可作为一种高效的抗氧化剂, 还可用于合成己二酸、香草醛等一些重要的化工产品, 具有重要的应用价值。相关研究证明具有去酪氨酸反馈抑制的3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶基因 *aroF^{FBR}* 以及转酮醇酶基因 *tktA* 可以有效影响3-脱氢莽草酸的过量合成。通过增加 *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 串联过量表达的拷贝数, 可使工程菌株在摇瓶发酵条件下3-脱氢莽草酸产量提高2.93倍。通过同源重组无痕基因敲除技术依次敲除出发菌大肠杆菌 *Escherichia coli* AB2834 的乳酸、乙酸、乙醇等副产物合成途径中的重要基因 *ldhA*、*ackA-pta* 和 *adhE*, 可使工程菌株的3-脱氢莽草酸产量进一步提高, 达到了1.83 g/L, 是初始出发菌株大肠杆菌 *E. coli* AB2834 产量的6.7倍。利用5 L发酵罐进行分批补料发酵, 62 h后工程菌株3-脱氢莽草酸产量达到了25.48 g/L。本研究可为构建有应用前景的3-脱氢莽草酸生产菌株提供重要参考。

关键词: 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶, 转酮醇酶, 副产物合成途径, 3-脱氢莽草酸, 代谢工程, 大肠杆菌

Received: January 9, 2014; **Accepted:** February 17, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00800), Research Equipment Program of Chinese Academy of Sciences (No. YZ201153).

Corresponding author: Qinhong Wang. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: wang_qh@tib.cas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00800), 中国科学院科研装备项目 (No. YZ201153) 资助。

Improving 3-dehydroshikimate production by metabolically engineered *Escherichia coli*

Fei Yuan^{1,2}, Wujiu Chen², Shiru Jia¹, and Qinhong Wang²

¹ College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

² Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: In the aromatic amino acid biosynthetic pathway 3-dehydroshikimate (DHS) is a key intermediate. As a potent antioxidant and important feedstock for producing a variety of important industrial chemicals, such as adipate and vanillin, DHS is of great commercial value. Here, in this study, we investigated the effect of the co-expression of *aroF*^{FBR} (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase mutant with tyrosine feedback-inhibition resistance) and *tktA* (Transketolase A) at different copy number on the production of DHS. The increased copy number of *aroF*^{FBR} and *tktA* would enhance the production of DHS by the fold of 2.93. In order to further improve the production of DHS, we disrupted the key genes in by-product pathways of the parent strain *Escherichia coli* AB2834. The triple knockout strain of *ldhA*, *ackA-pta* and *adhE* would further increase the production of DHS. The titer of DHS in shake flask reached 1.83 g/L, 5.7-fold higher than that of the parent strain *E. coli* AB2834. In 5-L fed-batch fermentation, the metabolically engineered strain produced 25.48 g/L DHS after 62 h. Metabolically engineered *E. coli* has the potential to further improve the production of DHS.

Keywords: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, transketolase, by-product pathway, 3-dehydroshikimate, metabolic engineering, *Escherichia coli*

3-脱氢莽草酸 (3-dehydroshikimate, DHS) 是微生物体内芳香族氨基酸生物合成代谢途径中的一种重要中间产物,对维系细胞正常生长、完成代谢过程具有重要作用^[1]。其进一步加工可以合成原儿茶酸 (Protocatechuate)、香草醛 (Vanillin)^[2]、儿茶酚 (Catechol)^[3]、没食子酸 (Gallate) 及己二酸 (Adipate)^[4]等一系列重要化工产品。利用 DHS 合成这些化工产品可以避免有毒的苯和甲苯等原料的使用,减少对人体和环境的影响。此外, DHS 还是一种十分有效的抗氧化剂,其活性优于没食子酸、丙基没食子酸 (Propyl gallate)、BHQ (Tertbutylhydroquinone)、丁羟甲苯 (Butylatedhydroxytoluene, BHT) 和生育酚 (α -tocopherol) 等一些商品化的抗氧化剂^[5],具有重要的应用价值。另外, DHS 作为

一种小分子手性化合物,还可以作为药物合成中非常有潜力的合成中间体^[5]。因此,研究 DHS 的生产具有重要的应用前景。

近年来,利用大肠杆菌等微生物合成 DHS 受到极大关注^[1,6-7]。在大肠杆菌中, DHS 合成途径如图 1^[8]所示。莽草酸脱氢酶 AroE 负责将 DHS 转化为莽草酸,所以通过突变或基因敲除 *aroE* 可以增加大肠杆菌积累 DHS 的能力^[9]。合成途径中转酮醇酶基因 *tktA* 是主要负责赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 合成的基因,会影响目标产物 DHS 的合成^[10]。3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶 AroF 影响 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸 (DAHP) 的合成,其突变体 AroF^{FBR} 增强了对代谢终产物芳香族氨基酸的抗反馈抑制抗性,可以促进 DAHP 的合成,从而影响 DHS 的

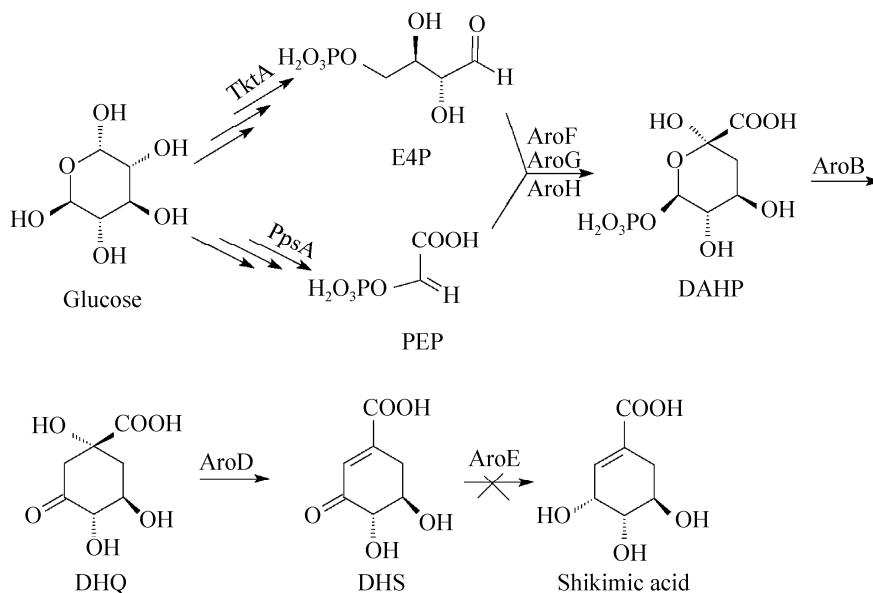


图 1 大肠杆菌中 3-脱氢莽草酸的生物合成途径^[8]

Fig. 1 3-dehydroshikimate biosynthetic pathway in *E. coli*^[8]. E4P: D-erythrose 4-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquininate; DHS: 3-dehydroshikimate; TktA: transketolase; PpsA: PEP synthase; AroF: tyrosine-sensitive DAHP synthase; AroG: phenylalanine-sensitive DAHP synthase; AroH: tryptophan-sensitive DAHP synthase; AroB: DHQ synthase; AroD: DHQ dehydratase; AroE: shikimate dehydrogenase.

生成^[11]。另外细胞中副产物合成的存在经常会影响目标产物的合成，所以破坏某些副产物合成途径可以有效提高目标产物的合成^[12-15]。

在上述分析的基础上，本文以莽草酸脱氢酶 *aroE* 突变的大肠杆菌 *E. coli* AB2834 为出发菌株，首先通过增加 *tktA* 和 *aroF^{FBR}* 共表达的拷贝数提高了 DHS 合成。然后，通过同源重组基因敲除技术敲除副产物合成途径中的关键基因，降低副产物的积累，进一步提高了 DHS 产量。最后，通过分批补料发酵使工程菌株实现了较高的 DHS 生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本试验所用菌株和质粒如表 1 所示。生产

DHS 的出发菌株大肠杆菌 AB2834 购自美国 *Escherichia coli* Genetic Stock Center，该菌是 3-脱氢莽草酸脱氢酶突变菌 (*aroE353*)，即 3-脱氢莽草酸到莽草酸合成途径是被阻断的；用于构建质粒的大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司 (Beijing TransGen)。pKD8.292PL20-mCherry^[16]、pET30a(+)和 pUC19 分别是低、中和高拷贝数的质粒，用于不同拷贝数的 *tktA* 和 *aroF^{FBR}* 共表达。

1.1.2 主要试剂和培养基

主要试剂：氨苄青霉素、氯霉素、壮观霉素、硫酸卡那霉素购自上海生工生物工程有限公司；质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司；DNA 回收试剂盒购自 Tiangen 公司；TransStart Fast Pfu DNA 聚合酶，DNA

Marker pEASY-Blunt Cloning Kit 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶购自 Fermentas 公司；DHS 标准品购自美国 Sigma 公司；其他试剂均为分析纯。

液体 LB 培养基 (g/L)：胰蛋白酶蛋白胨 10，酶酵母提取物 5，氯化钠 5；121 °C、15 min 灭菌。对于固体 LB，灭菌前向其中加入 1.5% 的琼脂粉。氨苄青霉素、氯霉素、壮观霉素、硫酸卡那霉素终浓度分别为 100、25、50、50 µg/mL。

摇瓶发酵培养基 (g/L)：Na₂HPO₄ 6.78，KH₂PO₄ 3，NaCl 0.5，NH₄Cl 1，MgSO₄ 0.24，

CaCl₂ 0.22，葡萄糖 20。其中 MgSO₄ 和 CaCl₂ 用 0.22 µm 的滤膜过滤除菌后加入培养基中，葡萄糖先溶于水配成 500 g/L 的溶液，115 °C、20 min 灭菌，用时按比例稀释加入培养基中。对于 *E. coli* AB2834、WJ002、WJ010、WJ022 等 *aroE* 突变的 4 株菌株发酵时，加入终浓度为 0.04 g/L 的莽草酸。

发酵罐发酵种子培养基 (g/L)：胰蛋白酶蛋白胨 10，酶酵母提取物 5，氯化钠 5，葡萄糖 20。

发酵罐发酵培养基 (g/L)：KH₂PO₄ 7.5，(NH₄)₂SO₄ 2.96，MgSO₄ 0.24，柠檬酸铵 0.3，一水合柠檬酸 2.1，苯丙氨酸 0.7，酪氨酸 0.7，

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

	Relative characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> AB2834	<i>F</i> ⁻ , <i>tsx-352</i> , <i>glnV42(ΔS)</i> , <i>λ</i> ⁻ , <i>aroE353</i> , <i>malT352 (ΔR)</i>	<i>Escherichia coli</i> Genetic Stock Center, [17]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> ⁻ <i>Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Beijing TransGen
<i>E. coli</i> WJ002	AB2834, <i>AldhA</i>	This study
<i>E. coli</i> WJ010	AB2834, <i>AldhAΔackA-pta</i>	This study
<i>E. coli</i> WJ022	AB2834, <i>AldhAΔackA-ptaΔadhE</i>	This study
Plasmids		
pKL4.130B	Cm ^R , <i>aroF^{FBR}</i> , <i>tktA</i>	[7]
pKD8.292PL20-mCherry	Spe ^R , Low copy plasmid (1–5/cell)	[16]
pET30a (+)	Kan ^R , Medium copy plasmid (~15 /cell)	Novagen
pUC19	Amp ^R , High copy plasmid (>100/cell)	New England Biolabs
pKD46	<i>λ</i> -Red recombinant genes under ParaBAD promoter, Temperature sensitive origin	[18]
pLOI4162	Amp ^R , <i>cat</i> , <i>sacB</i>	[12]
pEASY-Blunt zero	Amp ^R , Kan ^R , pUC ori	Beijing TransGen
pKD-Ptac-aroF ^{FBR} -tktA	Spe ^R , Ptac promoter, <i>aroF^{FBR}</i> , <i>tktA</i>	This study
pET-Ptac-aroF ^{FBR} -tktA	Kan ^R , Ptac promoter, <i>aroF^{FBR}</i> , <i>tktA</i>	This study
pUC-Ptac-aroF ^{FBR} -tktA	Amp ^R , Ptac promoter, <i>aroF^{FBR}</i> , <i>tktA</i>	This study

色氨酸 0.7, 对氨基苯甲酸 0.01, 2,3-二羟基苯甲酸 0.01, 对羟基苯甲酸 0.01, $(\text{NH}_4)_6(\text{M}_7\text{O}_{24})\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.003 7, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 9, H_3BO_3 0.024 7, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002 5, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.015 8, 葡萄糖 20。其中, KH_2PO_4 、柠檬酸铵、一水合柠檬酸和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 配好后于 121 °C、15 min 灭菌(灭菌前用 KOH 调 pH 至 7.0), 葡萄糖配成 500 g/L 溶液, 115 °C、20 min 灭菌, 用时按比例稀释加入培养基中; 其他溶液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 然后按比例稀释加入培养基中。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

用于串联表达 $aroF^{FBR}$ 和 $tktA$ 的质粒包括 pKD- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 、pET- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 和 pUC- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$, 分别对应低拷贝、中拷贝和高拷贝(表 1), 其构建方法如下, 质粒构建相关引物见表 2。

以质粒 pKL4.130B 为模板, 用引物 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF\text{-}XhoI\text{-}5$ 和 $aroF\text{-}SacI\text{-}3$ 经 PCR 扩增获得 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}$ 片段; 以质粒 pKL4.130B 为模板, 用引物 $tktA\text{-}SacI\text{-}5$ 和 $tktA\text{-}BglIXbaI\text{-}3$ 经 PCR 扩增获得 $tktA$ 片段。用 $Sac I$ 分别酶切 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}$ 和 $tktA$ 的片段, 然后连接两个片段。以连接产物为模板, 用 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF\text{-}XhoI\text{-}5$ 和 $tktA\text{-}BglIXbaI\text{-}3$ 为引物, PCR 扩增得到 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 基因片段。

1) pET- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 质粒构建: 用 $Xho I/Xba I$ 分别酶切 pET30a (+) 和 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 片段, 分别胶回收目的片段, 将得到的酶切纯化产物连接, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的固体 LB 培养基上过夜培养, 挑取 5 个克隆, 提取质粒 DNA, 用 $BamH I/EcoR I$ 酶切验证,

将正确的阳性克隆命名为 pET- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 。

2) pUC- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 质粒构建: 用 $Sma I/Xba I$ 酶切 pUC19, 胶回收纯化目的片段, 同时用 $Xba I$ 酶切 $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 片段并进行产物纯化。然后连接前面得到的载体线性片段和外源基因片段, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的固体 LB 培养基上过夜培养, 挑取 5 个克隆, 提取质粒 DNA, 用 $Xho I/Xba I$ 酶切验证, 将正确的阳性克隆命名为 pUC- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 。

3) pKD- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 质粒构建: 用 $Xho I/Xba I$ 分别酶切 pKD8.292-PL20-mCherry 和 pET- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 质粒并胶回收纯化目的片段, 连接得到的酶切纯化产物, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素的固体 LB 培养基上过夜培养, 挑取 5 个克隆, 提取质粒 DNA, 用 $Xho I/Xba I$ 酶切验证, 将正确的阳性克隆命名为 pKD- $P_{\text{tac}}\text{-}aroF^{FBR}\text{-}tktA$ 质粒。

1.2.2 基因敲除

以 *E. coli* AB2834 为出发菌株, 利用两轮同源重组无痕敲除基因技术^[14]依次敲除出发菌株的乳酸、乙酸、乙醇等副产物合成途径的关键基因, 包括 *ldhA* (编码乳酸脱氢酶基因)、*ackA* (编码乙酸激酶 A 基因) 和 *pta* (编码磷酸乙酰转移酶基因) 与 *adhE* (编码乙醇脱氢酶基因)。敲除基因和相关同源重组 DNA 片段构建的流程如图 2 所示, 所用的相关引物见表 2, 所得的基因敲除菌株如表 1 所示。

1.2.3 摇瓶发酵和发酵罐补料发酵

摇瓶发酵生产: 将保存于 -80 °C 的菌种在加有相应抗生素的平板上划线, 培养过夜, 挑单

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Ptac-aroF-XhoI-5	CTACGAACCTCGAGTGTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGA GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGGATCCATCGATGCTTAGGAGGTCATATGC AAAAAGACGCGCTGAATAACG
aroF-SacI-3	TCTCCTTCTTGAGCTCTTAAGCCACGCGAGCCGTCAGCTG
tktA-SacI-5	GCTTAAGAGCTCAAGAAGGAGATATACATATGTCCTCACGTAAAGAGCTTGCCAATG
tktA-BglIXbaI-3	GTACGATGGCCTATATGGCTCTAGATTACAGCAGTTCCTTTTGCTTCGCAACAACG
cat-sacB-up	GTGACGGAAGATCACTTC
cat-sacB-down	ATCAAAGGGAAAACGTCC
ldhA-1-s	GCAGAATCAAGTTCTACCG
ldhA-1-a	AAGACTTTCTCCAGTGATG
ldhA-2-s	CGAACGAACTGGTTTAATC
ldhA-2-a	TGTCTGTTTTGCGGTGCG
ackA-1-s	AAACGGATCGCATAACGC
ackA-1-a	CGTGGCTAAAAAACGTC
pta-2-s	TCTCGTCATCATCCGCGAG
pta-2-a	CCGTATTTTCGATCCTGAG
adhE-1-s	AATAATCCCTACCGGGTTG
adhE-1-a	CTGCTCGAATACGAGAGTA
adhE-2-s	TCAGTAGCGCTGTCTGGC
adhE-2-a	CCCATAATATTACGCGAG

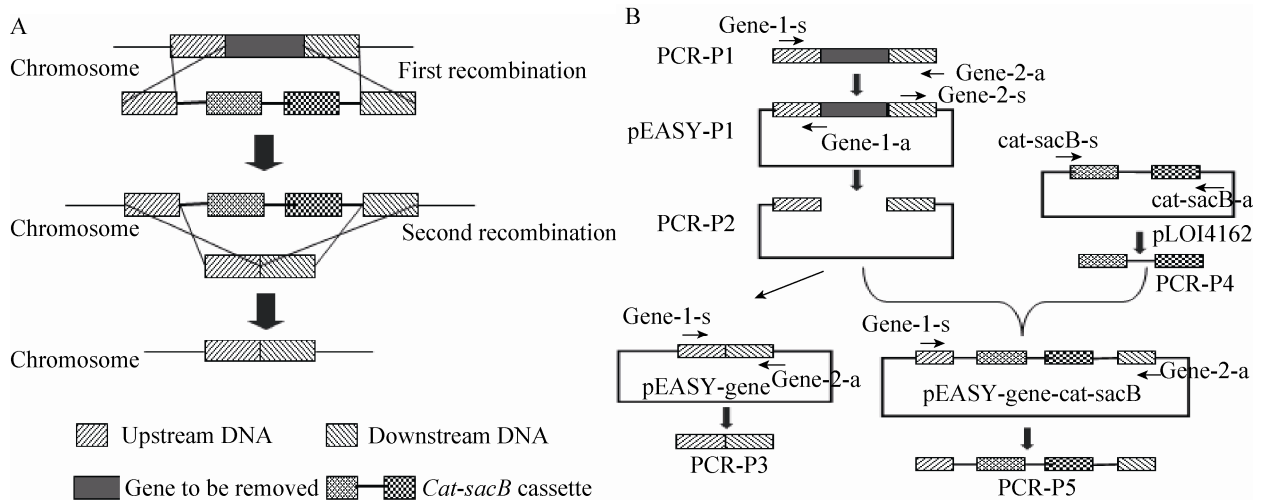


图 2 两轮同源重组法无痕敲除基因和相关同源重组 DNA 片段构建的流程

Fig. 2 Diagram for seamless gene disruption via two-round homologous recombination and the construction of DNA fragments for homologous recombination. (A) Gene disruption. (B) The construction of DNA fragments for homologous recombination.

菌落到 5 mL LB (15 mm×100 mm 试管) 中, 培养含 pET-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA* 质粒的菌株培养基中加硫酸卡那霉素, 培养含 pUC-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA* 质粒的菌株培养基中加氨苄青霉素, 培养含 pKD-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA* 质粒的菌株培养基中加壮观霉素 37 °C、220 r/min 过夜培养 12 h 测 OD₆₀₀ 值, 保证起始 OD₆₀₀=0.5, 按相应比例接种于 20 mL 发酵培养基 (相应抗生素) 中 (100 mL 锥形瓶), 接种时加入 0.2 mmol/L 诱导剂 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 进行诱导, 37 °C、220 r/min 培养。培养 24–48 h 后, 收集菌液用于 DHS 产量的测定。

发酵罐补料发酵生产: 在上述构建的菌株中, 选取摇瓶发酵中 DHS 产量最高的菌株进行发酵罐放大培养, 挑单菌落接种于 5 mL (15 mm×100 mm 试管) 种子培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 12 h, 再取 5 mL 培养液接种于 200 mL 种子培养基 (500 mL 摇瓶) 中, 37 °C、220 r/min 培养 12 h, 然后将 200 mL 种子液全部接种于装有 4 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中, 在 37 °C、220 r/min, pH 7, 溶氧 20% 的条件下发酵, 通过氨水调控 pH。发酵过程中根据培养基中残糖含量、乙酸积累量和菌株的葡萄糖利用速率补加葡萄糖, 补糖溶液浓度为 600 g/L。在菌株的对数生长中期加入终浓度 10 mg/L 的 IPTG, 之后按相同量每 6 h 加一次 IPTG, 直到发酵结束。从 6 h 开始, 每隔 4 h 取一次样, 检测发酵液中葡萄糖、乙酸和 DHS 等的含量。

1.2.4 代谢物和菌体量检测方法

用高效液相色谱来确定发酵中底物葡萄糖消耗、产物 DHS 形成以及乳酸、乙酸和乙醇等副产物积累的情况。取 1 mL 发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入新的离心管中。用

去离子水稀释适当倍数, 振荡混匀, 制样, 上液相。检测条件: VWD 检测器, Aminex HPX-878H 色谱柱 (300 mm×7.8 mm, 9 μm), 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 流速 0.6 mL/min, 柱温 63 °C, 检测波长 260 nm。每个待测样品分别有 3 个平行样, 实验结果取自 3 个平行的平均值。用购自 Sigma 公司的葡萄糖、DHS、乳酸、乙酸和乙醇等标准品构建 HPLC 标准曲线。以水为空白, 用分光光度计于 600 nm 处测定 OD₆₀₀ 值作为单位时间的菌体量。

2 结果与分析

2.1 *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 不同拷贝数串联表达对工程菌株 DHS 生产的影响

相关文献研究表明, *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 是影响菌株生产 DHS 的重要基因, 它们分别可以通过影响相应的中间产物 DAHP 和 E4P 的生成进而影响 DHS 的合成^[10-11]。另外, 基因的拷贝数是影响工程菌株代谢工程改造的重要因素。因此, 我们研究了 *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 不同拷贝数串联表达对工程菌株 DHS 生成的影响。不同拷贝数的 *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 串联表达通过 3 个低、中和高拷贝的质粒携带 *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 来实现。这 3 个质粒 (pKD-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA*、pET-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA* 和 pUC-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA*) 带有相同的启动子, 利用这 3 个质粒可以比较相同条件下, 不同拷贝数的基因表达对目标产物生成的影响。质粒构建完成后, 用限制性内切酶及 DNA 测序分析进一步确认了所构建的质粒是正确的。

将上述构建成功的 3 种质粒分别转入 *E. coli* AB2834 中, 由于 3 个表达载体的拷贝数不同, 其上携带的 *aroF^{FBR}* 和 *tktA* 串联基因的表达强度也不同。*E. coli* AB2834/pKD-P_{tac}-*aroF^{FBR}*-*tktA*、

E. coli AB2834/pET-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 和 *E. coli* AB2834/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 这 3 株重组菌与出发菌 *E. coli* AB2834 的摇瓶发酵生产相比, DHS 产量均有了不同程度提高, 分别提高了 14%、226% 和 293% (图 3)。其中, 携带高拷贝 pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 质粒的菌株 DHS 产量最高, 为 1.06 g/L。这表明在本实验条件下 *aroF*^{FBR} 和 *tktA* 串联基因的表达载体拷贝数越高, 所得重组菌株的 DHS 产量也越高。

2.2 阻断副产物合成途径对菌株 DHS 生成的影响

由于菌株 *E. coli* AB2834 摇瓶发酵时乳酸、乙酸等副产物积累较多, 而为了降低副产物积累, 通过基因敲除降低副产物积累是常用的手段^[19-21]。根据大肠杆菌基因组信息^[22], *ldhA* 编码乳酸脱氢酶, 敲除 *ldhA* 经常可以减少乳酸的

生成。*ackA* 和 *pta* 基因的表达产物催化丙酮酸生成乙酸, 敲除 *ackA-pta* 基因可减少乙酸的生成。*adhE* 编码乙醇脱氢酶, 敲除 *adhE* 可以减少乙醇的生成。因此, 本研究以 *E. coli* AB2834 菌株为出发菌, 用两轮同源重组无痕敲除基因技术依次敲除菌株的乳酸、乙酸和乙醇等副产物合成途径中关键基因 *ldhA*、*ackA-pta* 和 *adhE*, 得到不同组合的基因敲除菌株 (表 1)。分别以 *gene-1-s* (*gene* 分别为 *ldhA*、*ackA-pta* 和 *adhE*) 和 *gene-2-a* 为引物进行菌落 PCR 验证 (图 2B, 引物序列见表 2), *ldhA* 敲除前, 条带大小为 1 987 bp, 敲除后应为 1 014 bp; *ackA-pta* 敲除前后条带大小分别应为 4 417 bp 和 975 bp; *adhE* 敲除前后条带大小分别应为 3 803 bp 和 1 087 bp。各基因敲除后 PCR 验证结果如图 4 所示, PCR 结果

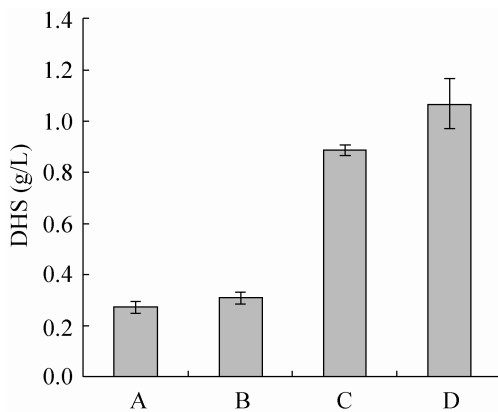


图 3 转入 pKD-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*, pET-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 和 pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 不同表达载体后 *E. coli* AB2834 的 DHS 产量

Fig. 3 DHS production of *E. coli* AB2834 harboring pKD-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*, pET-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* and pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*, respectively. A: *E. coli* AB2834; B: *E. coli* AB2834/pKD-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*; C: *E. coli* AB2834/pET-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*; D: *E. coli* AB2834/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*.

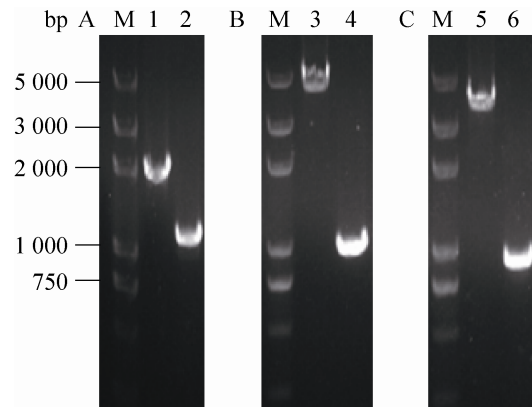


图 4 *ldhA*、*ackA-pta* 和 *adhE* 3 个基因敲除的菌落 PCR 验证

Fig. 4 Colony PCR verification of *ldhA* (A), *ackA-pta* (B) and *adhE* (C) gene knockout mutants of *E. coli*. (A) M: Trans 2K Plus DNA marker; 1: parent strain for *ldhA* knockout; 2: *ldhA* knockout strain. (B) 3: parent strain for *ackA-pta* knockout; 4: *ackA-pta* knockout strain. (C) 5: parent strain for *adhE* knockout; 6: *adhE* knockout strain.

与理论结果相同,表明成功敲除了这3个基因。通过基因敲除获得了3株不同组合副产物途径基因敲除的重组菌,其对应的基因特性见表1。

把 pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 分别转入副产物合成途径被破坏的菌株 WJ002、WJ010 和 WJ022 中,得到3株重组工程菌。与携带 pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 的菌株 *E. coli* AB2834/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 相比,副产物合成途径被破坏的菌株其 DHS 产量均有不同程度提高(图5)。敲除了 *ldhA* 后菌株 WJ002/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 的 DHS 产量为 1.37 g/L,较敲除前提高了 29%。在此基础上依次敲除了 *ackA-pta* 和 *adhE*, DHS 的产量也得到进一步提高,最高可累积 1.83 g/L DHS,与出发菌株相比提高了 72.6%。该研究表明破坏菌株的副产物合成途径,可以减少碳流量在分支途径中的消耗,提高目标产物 DHS 的产量。

与 *E. coli* AB2834 相比,敲除了 *ldhA*、*ackA-pta* 和 *adhE* 3 个基因的菌株 *E. coli* WJ022,发酵过程中菌株糖耗增加,利用糖的能力增强,乙酸产量下降,*OD*₆₀₀ 和乳酸变化不大(表3)。另外,尽管敲除 *adhE* 前后都没有检测到乙醇的积累,但是敲除 *adhE* 后使乙酸积累进一步降低,从而导致 DHS 合成的进一步增加,但是具体原因有待进一步分析。总之,合适的副产物合成途径关键基因敲除可以使更多碳流走向 DHS 合成途径,使目标产物 DHS 的产量得到明显提高。

2.3 菌株 *E. coli* WJ022/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 的 5 L 发酵罐分批补料发酵

根据摇瓶发酵结果,选取 DHS 产量最高的菌株 *E. coli* WJ022/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*, 进行

5 L 发酵罐分批补料发酵。从发酵 6 h 开始取样,之后每 4 h 取一次样,检测样品中乙酸、乳酸、残余葡萄糖和 DHS 含量。根据发酵液中残糖和乙酸的含量来决定补加葡萄糖的量,补加原则是保持发酵液乙酸含量小于 1 g/L,残糖含量不高于 20 g/L。根据每 4 h 取样测得的发酵液中乙酸含量,当乙酸浓度很低或几乎没有乙酸时,补加葡萄糖;当乙酸浓度接近或大于 1 g/L 时,停止补加葡萄糖。在这样的补料条件下,整个发酵过程中没有检测到乳酸生成;同时基本没有乙酸积累。发酵 62 h 后菌株的 DHS 产量达到最大,为 25.48 g/L。*OD*₆₀₀ 为 53.2。(图6) 整个过程糖耗经核算相当于 187 g/L,所以 DHS 对葡萄糖的转化率为 0.14 g/g 葡萄糖。

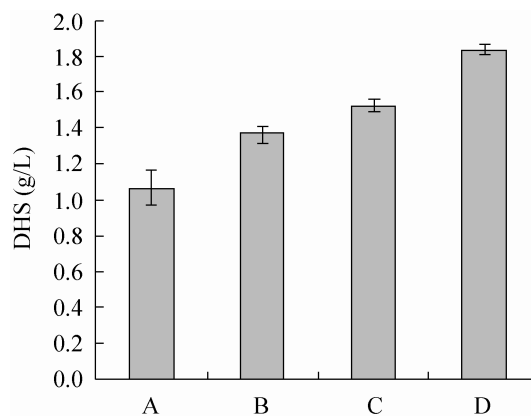


图5 不同副产物合成途径基因敲除后菌株的 DHS 产量

Fig. 5 DHS production of *E. coli* AB2834 with different gene disruption in by-product pathways. All strains were transformed with pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*. A: *E. coli* AB2834/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*; B: *E. coli* WJ002/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*; C: *E. coli* WJ010/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*; D: *E. coli* WJ022/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*.

表 3 不同副产物途径关键基因敲除的工程菌株糖耗、细胞生长和副产物含量比较

Table 3 Glucose consumption, cell growth and the formation of by-products in *E. coli* AB2834 with different gene disruption in by-product pathways

Strain	Consumption of glucose (g/L)	OD_{600}	Acetate (g/L)	Lactate (g/L)
<i>E. coli</i> AB2834	10.70±0.15	2.44±0.07	2.08±0.06	2.54±0.03
<i>E. coli</i> WJ002	10.77±0.19	2.51±0.08	1.66±0.06	2.39±0.19
<i>E. coli</i> WJ010	10.37±0.84	2.11±0.61	0.44±0.04	2.23±0.15
<i>E. coli</i> WJ022	13.32±0.16	2.31±0.23	0.26±0.02	2.47±0.23

All strains were transformed with pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA*.

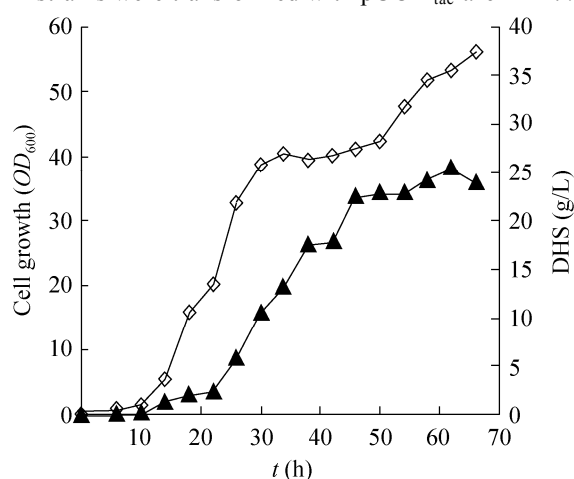


图 6 工程菌株 *E. coli* WJ022/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 在 5 L 发酵罐分批补料发酵过程中细胞生长和 DHS 生产

Fig. 6 Cell growth and DHS production of *E. coli* WJ022/pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* by 5 L fed-batch fermentation. OD_{600} (◇), concentration of DHS (▲).

3 讨论

不同拷贝数的表达载体可使携带的目的基因进行不同强度的表达,但并不是质粒拷贝数越高,对于目的产物的累积越有利。位于一个多拷贝质粒上的基因的表达有可能导致酶表达水平超过改善一个限速酶特性所需,这种代谢负担常常会使菌株生长率减慢,合成产物的产率和转化率变低;本研究选用 3 个不同拷贝数

的质粒作为目的基因 *aroF*^{FBR}-*tktA* 的表达载体,以期得到最适目的基因表达的载体。结果发现,所用 3 个质粒的拷贝数越高,菌株 DHS 产量也越高。所以最终选用拷贝数最高的 pUC-P_{tac}-*aroF*^{FBR}-*tktA* 质粒用作目的基因的表达载体。另外通过合适地敲除菌株的一些副产物合成途径的关键基因,使菌株利用糖的能力、生长和副产物的合成等情况都发生了改变,从而使菌株的 DHS 产量得到了提高(图 5 和表 3)。虽然敲除基因后并不一定明显降低相应副产物的合成,如在摇瓶发酵条件下,敲除菌株 *E. coli* AB2834 的 *ldhA* 后并没有使菌株对应的乳酸产量发生明显下降,这可能与乳酸的另一条合成途径,即通过丙酮醛合成乳酸有关^[23],因此需要进一步敲除相关基因以减少乳酸的积累。

本研究通过对 *E. coli* AB2834 菌株 DHS 合成途径中两个重要酶 DAHP 合成酶和转酮醇酶的编码基因 *aroF*^{FBR} 和 *tktA* 进行串联表达调控,使菌株在摇瓶发酵条件下的 DHS 产量提高了 2.93 倍。然后通过基因敲除破坏与目的产物 DHS 合成途径无关的一些副产物合成途径,使工程菌株摇瓶发酵条件下 DHS 产量进一步提高了 72.6%,达到 1.83 g/L。然后用 5 L 发酵罐进行分批补料发酵,最终使工程菌株的 DHS 产量在发酵 62 h 后达到了 25.48 g/L,为目前国内报

道的最高水平。我们的研究为实现有应用前景的 DHS 生产菌构建及生产提供了重要参考。此外,大肠杆菌的 DHS 合成途径中还有许多重要基因,如 *aroD*、*aroG* 和 *aroH*^[24-25] 可以进行改造优化,这将是进一步代谢工程改造 DHS 生产菌株的研究方向。

REFERENCES

- [1] Draths KM, Kambourakis S, Li K, et al. Chemicals and Materials from Renewable Resources. Washington DC: American Chemical Society, 2001: 133–146.
- [2] Li K, Frost JW. Synthesis of vanillin from glucose. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(40): 10545–10546.
- [3] Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of catechol from D-glucose. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(9): 2395–2400.
- [4] Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(1): 399–400.
- [5] Richman JE, Chang YC, Kambourakis S, et al. Reaction of 3-dehydroshikimic acid with molecular-oxygen and hydrogen peroxide: products, mechanism, and associated antioxidant activity. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(46): 11587–11591.
- [6] Licona-Cassani C, Lara AR, Cabrera-Valladares N, et al. Inactivation of pyruvate kinase or the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system increases shikimic and dehydroshikimic acid yields from glucose in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2013, 24(1): 37–45.
- [7] Li K, Mikola MR, Draths KM, et al. Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(1): 61–73.
- [8] Bongaerts J, Kramer M, Muller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng*, 2001, 3(4): 289–300.
- [9] Kramer M, Bongaerts J, Bovenberg R, et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng*, 2003, 5(4): 277–283.
- [10] Shen T, Liu Q, Xie X, et al. Improved production of tryptophan in genetically engineered *Escherichia coli* with TktA and PpsA overexpression. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 605219.
- [11] Umbarger HE. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 1978, 47(1): 533–606.
- [12] Jantama K, Zhang X, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(5): 881–893.
- [13] Guo XK, Fang HY, Zhuge B, et al. Influence of key enzyme gene knockout of 2,3-butanediol pathway to 1,3-propanediol fermentation in *Klebsiella pneumonia*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(9): 1290–1300 (in Chinese).
郭欣坤, 方慧英, 诸葛斌, 等. 2,3-丁二醇代谢途径关键酶基因敲除对克雷伯氏菌发酵产 1,3-丙二醇的影响. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1290–1300.
- [14] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng*, 2008, 10(6): 305–311.
- [15] Zhu JF, Shimizu K. Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. *Metab Eng*, 2005, 7(2): 104–115.
- [16] Wu YQ, Zhang YY, Tu R, et al. Construction of the synthetic promoters for *Escherichia coli* and application in the biosynthesis of cis,cis-muconic acid. *Chin J Biotech*, 2013, 29(6): 760–771 (in Chinese).
吴元庆, 张媛媛, 涂然, 等. 大肠杆菌合成启动子的构建及在顺,顺-粘康酸生物合成中的应用. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 760–771.
- [17] Pittard J, Wallace BJ. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1966, 91(4):

- 1494–1508.
- [18] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [19] Zhou L, Tian KM, Zuo ZR, et al. Elimination of succinate and acetate synthesis in recombinant *Escherichia coli* for D-lactate production. *Chin J Biotech*, 2011, 27(1): 31–40 (in Chinese).
周丽, 田康明, 左志锐, 等. 大肠杆菌琥珀酸和乙酸合成途径的删除及其重组菌株的 D-乳酸发酵. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 31–40.
- [20] Seo MY, Seo JW, Heo SY, et al. Elimination of by-product formation during production of 1, 3-propanediol in *Klebsiella pneumonia* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(3): 527–534.
- [21] Wang XF, Chen J, Liu PP, et al. Production of D-mannitol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(10): 1450–1462 (in Chinese).
王晓芳, 陈晶, 刘萍萍, 等. 利用代谢工程构建 D-甘露醇生产菌株. *生物工程学报*, 2013, 29(10): 1450–1462.
- [22] Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453–1462.
- [23] Grabar TB, Zhou S, Shanmugam KT, et al. Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in l(+) and d(-)-lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(19): 1527–1535.
- [24] Ray JM, Yanofsky C, Bauerle R. Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1988, 170(12): 5500–5506.
- [25] Kikuchi Y, Tsujimoto K, Kurahashi O. Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(2): 761–762.

(本文责编 陈宏宇)