

工业生物技术

产顺,顺-粘康酸细胞工厂的构建与优化

宋国田^{1,2}, 江小龙², 陈五九², 彭彦峰², 路福平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

宋国田, 江小龙, 陈五九, 等. 产顺,顺-粘康酸细胞工厂的构建与优化. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1212–1223.

Song GT, Jiang XL, Chen WJ, et al. Construction and optimization of microbial cell factories for producing *cis*, *cis*-muconic acid. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1212–1223.

摘要: 顺,顺-粘康酸是重要的平台化学品。目前, 生物合成顺,顺-粘康酸还缺乏高性能菌株, 已报道的主要工程菌株不仅需要诱导表达, 遗传不稳定, 而且发酵培养基组分复杂, 不利于大规模工业化生产。构建能利用简单无机盐培养基、遗传稳定且不需要诱导表达的新型工程菌受到人们的关注。本研究在实验室前期构建的产三脱氢莽草酸工程菌株 WJ060 中, 整合合成顺,顺-粘康酸的 3 个外源基因 (*aroZ*、*aroY*、*catA*), 并且利用 3 个不同强度的组成型启动子进行组合调控, 成功构建了 27 株顺,顺-粘康酸工程菌, 得到的最优工程菌 MA30 的产量达到 1.7 g/L。为了进一步提高顺,顺-粘康酸工程菌的生产能力, 利用基因组复制工程构建突变体库, 结合高通量筛选方法, 经过两轮筛选, 成功筛选到了顺,顺-粘康酸产量提高超过 8% 的大肠杆菌 MA30-G2。利用 5 L 发酵罐进行分批补料发酵, MA30-G2 的顺,顺-粘康酸产量达到了 11.5 g/L。本研究采用组合调控和高通量筛选相结合的策略不仅促进了顺,顺-粘康酸的生物合成, 同时也为其他生物基化学品的生物制造提供了重要参考。

关键词: 顺,顺-粘康酸, 组合调控, 大肠杆菌, 组成型启动子, 基因组复制工程, 高通量筛选

Received: December 21, 2015; **Accepted:** January 15, 2016

Supported by: Key Technology R&D Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 14ZCZDSY00066), Research Equipment Program of Chinese Academy of Sciences (No. YZ201153).

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

天津市科学技术委员会科技支撑计划重点项目 (No. 14ZCZDSY00066), 中国科学院科研装备项目 (No. YZ201153) 资助。

Construction and optimization of microbial cell factories for producing *cis, cis*-muconic acid

Guotian Song^{1,2}, Xiaolong Jiang², Wujiu Chen², Yanfeng Peng², Fuping Lu¹, and Qinhong Wang²

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

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

Abstract: *cis, cis*-muconic acid (MA) is an important platform chemical. Now, majority of reported engineered strains are genetically instable, the exogenous genes are expressed under the control of expensive inducer and the components of their fermentation medium are complex, thus large-scale microbial production of MA is limited due to the lack of suitable strains. Hence, it is still necessary to construct novel high-performance strain that is genetically stable, no induction and grows in simple inorganic fermentation medium. In this study, after 3 exogenous genes (*aroZ*, *aroY*, *catA*) for biosynthesis of MA were integrated into previously constructed 3-hydroshikimate producing *Escherichia coli* WJ060 strain and combinatorially regulated with 3 constitutive promoters with different strengths, 27 engineered strains were constructed. The best engineered strain, *E. coli* MA30 could produce 1.7 g/L MA in the simple inorganic fermentation medium without induction. To further enhance the production capacity of MA, the mutant library of *E. coli* MA30 was constructed by genome replication engineering and screened *via* high-throughput assay. After two-round screening, the new strain, *E. coli* MA30-G2 with improved production of MA was obtained, and the titer of MA increased more than 8%. Under the condition of 5 L fed-batch fermentation, *E. coli* MA30-G2 could produce about 11.5 g/L MA. Combinatorial regulation and high-throughput screening provide important reference to microbial production of other bio-based chemicals.

Keywords: *cis, cis*-muconic acid, combinatorial regulation, *Escherichia coli*, constitutive promoters, genome replication engineering, high throughput screening

顺,顺-粘康酸 (*cis,cis*-muconic acid, MA) 具有两个羧基和成对的共轭双键, 在 260 nm 处具有很好的紫外吸收性质, 可用于紫外防护剂以及军工特种用品如隐形飞机涂层, 同时也是制备功能树脂、医药及农用化学品的潜在原料^[1], 并可用于生产大宗化工产品尼龙 66 的单体己二酸以及对苯二甲酸二甲酯和偏苯三酸等^[2-4]。

目前, 生物合成 MA 主要是利用含质粒的工程菌实现。2015 年, Jung 等^[5]通过在优化的肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 中转

入含有 *catA* 的质粒, MA 产量达到 2.1 g/L, 但由于肺炎克雷伯氏菌是致病菌, 不利于工业化生产; 2013 年, Pandeeti 等^[6]在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中通过在质粒上过表达 MA 合成途径的 3 个外源基因, 首次实现了 MA 在酿酒酵母中的生产, 产量仅为 141 mg/L。自 1994 年 Draths 等^[7]在莽草酸合成途径阻断的大肠杆菌 AB2834 中通过共转含有 MA 合成途径 3 个外源基因的 2 个质粒, MA 产量达到 2.4 g/L 之后, 在大肠杆菌中合成 MA 的研究也越来越受

到人们的关注。2014年, Lin等^[8]通过以水杨酸作为前体合成MA, 摇瓶发酵48h产量达到1.5g/L。2015年, Zhang等^[9]通过构建了共生的双细胞模式将木糖与葡萄糖混合糖转化为MA的生物合成途径, MA在72h的分批补料发酵产量最高达到4.7g/L。虽然MA在大肠杆菌中生产取得了一定程度的成功, 但由于是以遗传不稳定的基于质粒的工程菌为发酵菌株, 同时使用复杂的培养基成分使生产成本增加, 不利于MA工业化生产。因此, 需要通过利用新的代谢工程策略将外源基因整合到大肠杆菌基因组, 并通过组合调控等获得生产能力提高, 并且遗传稳定的工程菌株。

为了提高MA产量, 近几十年中, 许多研究学者^[10-12]也采用各种方法提高MA前体物3-脱氢莽草酸的产量。本研究中, 以产3-脱氢莽草酸(3-hydroshikimate, DHS)的大肠杆菌WJ060作为出发菌株, 先后整合不同强度组成型启动子组合调控^[13] *aroZ*、*aroY*和*catA*突变体^[14]的表达, 合成途径如图1所示。我们得到了最优MA生产菌MA30。为进一步提高MA工程菌的生产能力, 我们将基因组复制工程与MA高通量筛选方法^[15-16]相结合, 经过两轮筛选, 成功筛选到了MA产量得到提高的大肠杆菌MA30-G2。利用5L发酵罐进行分批补料发酵^[17-21], 进一步提高了MA的产量。

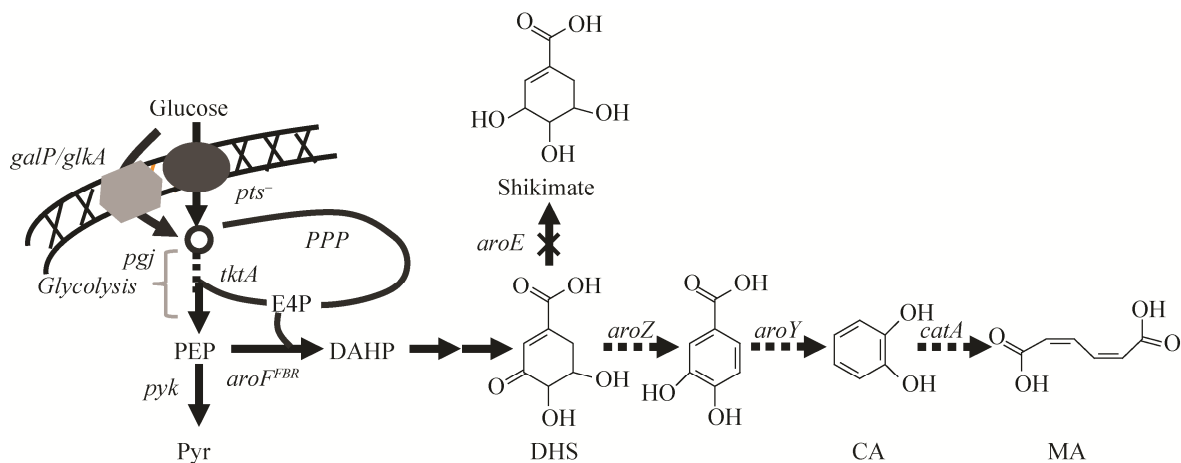


图1 大肠杆菌中顺,顺-粘康酸生物合成途径

Fig. 1 *cis,cis*-muconic acid biosynthetic pathway in engineered *E. coli*. E4P: erythrose 4-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquininate; DHS: 3-dehydroshikimate; PCA: protocatechuic acid; CA: catechol; MA: *cis,cis*-muconic acid; *aroZ*: 3-dehydroshikimate dehydratase gene; *aroY*: protocatechuate decarboxylase gene; *catA*: catechol 1,2-dioxygenase gene; *aroE*: 3-dehydroshikimate dehydrogenase gene; *aroF^{FBR}*: DAHP synthase mutant (with tyrosine feedback-inhibition resistance^[22]); *tktA*: transketolase gene; *pyk*: pyruvate kinase gene; *pgi*: phosphoglucose isomerase gene; *galP*: galactose permease gene; *glkA*: glucose kinase gene; *pts*: phosphotransferase system genes. Solid-line arrows, endogenous pathways; dotted-line arrows, exogenous (synthetic) pathways.

1 材料与方方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本试验所用菌株与质粒如表 1 所示。生产 DHS 的出发菌株大肠杆菌 WJ060 是实验室前期构建的菌株。

1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素 (工作浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氯霉素 (工作浓度 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、壮观霉素 (工作浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 回收试剂盒购自康为世纪公司;TransStart Fast *Pfu* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术

表 1 本研究的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains	Relative characteristics	Sources
WJ060	3-hydroshikimate producing strain	Lab collection
MA13	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA14	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA15	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA16	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA17	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA18	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA19	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA20	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA21	WJ060 <i>ldhA::P1-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA22	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA23	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA24	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA25	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA26	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA27	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA28	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA29	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA30	WJ060 <i>ldhA::P2-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA31	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA32	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA33	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P1-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA34	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA35	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA36	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P2-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
MA37	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P1-catA-T7</i>	This study
MA38	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P2-catA-T7</i>	This study
MA39	WJ060 <i>ldhA::P3-aroZ-T7-P3-aroY-T7-P3-catA-T7</i>	This study
Plasmids		
pKD8.243	<i>aroZ</i> , <i>aroY</i> , Cm ^R	[7]
p4-P76A	<i>PL25-P76A</i> , Spe ^R	[14]
pEASY-cat-sacB-ap	Kan ^R , <i>cat</i> , <i>sacB</i>	[23]
pKD46-dnaQ	Amp ^R , containing <i>dnaQ</i> mutant; <i>dnaQ</i> from [16]	Lab collection

有限公司; 2×*Taq* PCR MasterMix, DNA marker 购自 Biomed 公司; 3-脱氢莽草酸 (DHS) 标准品购自美国 Sigma 公司; 原儿茶酸 (PCA) 标准品购自 Aldrich 公司; 儿茶酚 (CA) 标准购自国药集团化学试剂有限公司; 顺,顺-粘康酸 (MA) 标准品购自 Aldrich 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

液体 LB 培养基 (g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10 (固体 LB 加入 1.5%琼脂粉) 摇瓶发酵培养基 (g/L): KH_2PO_4 3.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6.5, MgSO_4 0.12, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.5, CaCl_2 0.011, 硫酸素 0.005。每升摇瓶发酵培养基添加 1 mL 的微量元素 (g/L) 包括 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.16, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.015, ZnCl_2 0.02, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, H_3BO_3 0.05, 每升微量元素添加 10 mL 浓盐酸。

发酵罐发酵种子培养基 (g/L) 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 葡萄糖 10; 发酵罐发酵培养基 (g/L): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.077 5, 柠檬酸 2, 酵母抽提物 1。每升发酵罐发酵培养基添加 1 mL 微量元素 (g/L) 包括 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.004 5, Na_2SO_4 0.02, ZnSO_4 0.006 4, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.004, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.000 6。

1.2 方法

1.2.1 重组片段的构建

整合到基因组中的由低强度到高强度的组成型启动子 (P1: 5'-TTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCTTTTGGTGCAGTCAGTTTAAACCAGGAAACAGCT-3', P2: 5'-TTATCTCTGGCGGTGT

TGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCTGAGGTGGCTTATTATTCGTTTAAACCA GGAAACAGCT-3', P3: 5'-TTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCGTATTGTTAGCATGTACGTTTAAACCAGGAAACAGCT-3')^[24]与 *aroZ* 以及 T7 终止子串联表达重组片段构建如下: 1) 第一步同源重组片段的构建: 以 pEASY-cat-sacB-ap 为模板利用引物 *ldhA*-cat-sacB-s/*ldhA*-cat-sacB-a 进行扩增, 获得带有 40 bp 同源臂的 *ldhA*-cat-sacB-*ldhA* DNA 片段。2) 第二步同源重组片段的构建: 以 pKD8.243 为模板利用 *ldhA*-P1-*aroZ*-s、*ldhA*-P2-*aroZ*-s、*ldhA*-P3-*aroZ*-s/*ldhA*-T7-*aroZ*-a 分别进行扩增, 获得带有 40 bp 同源臂的 *ldhA*-P1/2/3-*aroZ*-T7-*ldhA* DNA 片段, 通过两步同源重组的方法实现目标片段对 *ldhA* 的无痕替换。具体构建片段与整合流程如图 2A 所示。

用上述方法获得带有 40 bp 同源臂的 *aroZ*-T7-cat-sacB-*ldhA*、*aroZ*-T7-P1/2/3-*aroY*-T7-*ldhA* 以及 *aroY*-T7-cat-sacB-*ldhA*、*aroY*-T7-P1/2/3-catA-T7-*ldhA* DNA 片段。本研究中所用引物见表 2。

1.2.2 MA 细胞工厂的构建

通过在产 3-脱氢莽草酸的大肠杆菌 WJ060 基因组上 *ldhA* 位点上依次整合 3 种不同强度的组成型启动子组合调控的 3 个外源基因 (*aroZ*、*aroY*、*catA*), 成功构建了 27 株 MA 工程菌 MA13-MA39, 组合调控示意图如图 2B 所示。

1.2.3 MA 高通量测定方法的建立

基于 MA 在 260 nm 处有很好的紫外吸收性质, 配制浓度为 0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L、0.8 g/L 以及 1 g/L 的 MA 标准品, 通过在酶标仪测定其

260 nm 的紫外吸光度值,以 MA 标准品浓度为横坐标,紫外吸光度值为纵坐标,绘制 MA 标准溶液的浓度 y 与吸光度 x 的标准曲线,每组实验 3 次平行。

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
ldhA-cat-sacB-s	TAAAATATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGTGACGGAAGATCACTTC
ldhA-cat-sacB-a	ATCTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGAATCAAAGGGAAAACCTGTCC
ldhA-P1-aroZ-s	TAAAATATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTTTATCTCTGGCGGTGTTGACA <u>AGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCTTTTGGTGCGTCAGTCAGTTAAACCAGGA</u> <u>AACAGCTATGCTGCGCTCTATCGCC</u>
ldhA-P2-aroZ-s	TAAAATATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTTTATCTCTGGCGGTGTTGACA <u>AGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCACTGGCTCGTAATTTATTGTTAAACCAGGA</u> <u>AACAGCTATGCTGCGCTCTATCGCC</u>
ldhA-P3-aroZ-s	TAAAATATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTTTATCTCTGGCGGTGTTGACA <u>AGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCGTATTGTTAGCATGTACGTTAAACCAGGA</u> <u>AACAGCTATGCTGCGCTCTATCGCC</u>
ldhA-T7-aroZ-a	ATCTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGACAAAAAACCCCTCAAGACC CGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTACTAACAATACTGCATCGC
aroZ-T7-cat-sacB-s	GCGATGCAGTATTGTTAGTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT TTTTGGTGACGGAAGATCACTTC
aroZ-T7-P1-aroY-s	GCGATGCAGTATTGTTAGTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT TTTTGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCTTTT GTGCGTCAGTCAGTTAAACCAGGAAACAGCTATGACCGCACCGATTGAG
aroZ-T7-P2-aroY-s	GCGATGCAGTATTGTTAGTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT TTTTGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCACTGG CTCGTAATTTATTGTTAAACCAGGAAACAGCTATGACCGCACCGATTGAG
aroZ-T7-P3-aroY-s	GCGATGCAGTATTGTTAGTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT TTTTGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCGTATT GTTAGCATGTACGTTAAACCAGGAAACAGCTATGACCGCACCGATTGAG
ldhA-T7-aroY-a	ATCTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGACAAAAAACCCCTCAAGACC CGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTATTATTTGCGCTACCCTG
aroY-T7-cat-sacB-s	CAGGGTAGCGCAAAAATAATAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT TTTTGGTGACGGAAGATCACTTC
aroY-T7-P1-catA-s	CAGGGTAGCGCAAAAATAATAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT TTTTGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCTTTT GGTGCGTCAGTCAGTTAAACCAGGAAACAGCTATGGAAGTTAAAATATTC
aroY-T7-P2-catA-s	CAGGGTAGCGCAAAAATAATAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT TTTTGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCACTG GCTCGTAATTTATTGTTAAACCAGGAAACAGCTATGGAAGTTAAAATATTC
aroY-T7-P3catA-s	CAGGGTAGCGCAAAAATAATAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT TTTTGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCGTAT TGTTAGCATGTACGTTAAACCAGGAAACAGCTATGGAAGTTAAAATATTC
ldhA-T7-catA-a	ATCTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGACAAAAAACCCCTCAAGACC CGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTACCACGTCTAGCGGTGTAA

The underlined is the sequence of synthetic promoter corresponding to the primer name.

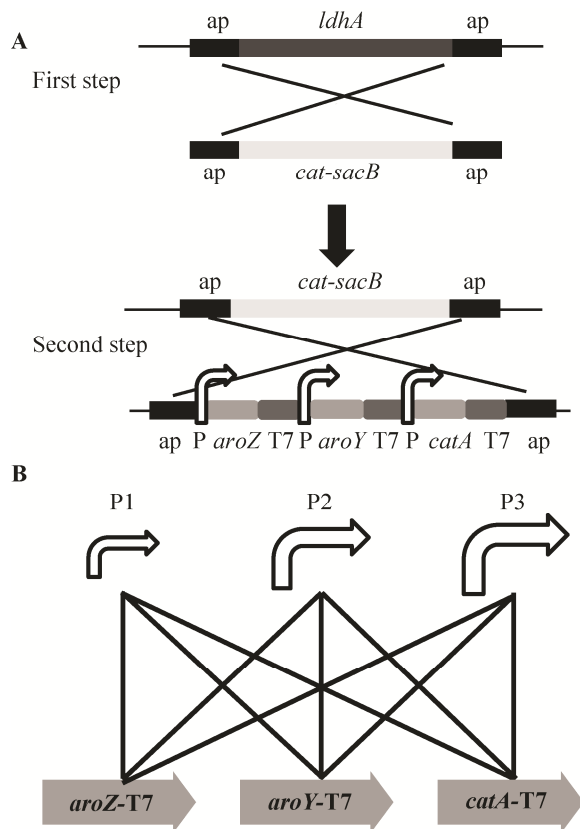


图 2 重组片段的整合与组合调控示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the integration and combination regulation of recombination fragment. (A) Schematic diagram of the integration of recombination fragment. (B) Schematic diagram of combination regulation. ap: homology arm; P: synthetic promoter; T7: T7 terminator; *ldhA*: lactate dehydrogenase gene; *cat-sacB*: chloramphenicol selective marker gene and suicide gene *sacB* for counter-selection.

1.2.4 MA 细胞工厂的高通量筛选优化

基于突变 *dnaQ* 的基因组复制工程构建文库^[16]，在 MA30 中转入温敏型质粒 pKD46-*dnaQ* (由 *dnaQ* 突变体替换 pKD46 中的 *exo*、*bet*、*gam*) 后于 30 °C 连续传代 4 次，每代时 12 h，从而构建了 MA30 突变体文库。从文库中分离单菌落，经过活化后，在无菌的 96 深孔板中 37 °C、220 r/min 发酵 24 h，取每个文库中近千个样本

的发酵液在 96 孔板中于酶标仪上检测其 260 nm 处的紫外吸光度值，并对吸光度值高于对照的最高突变工程菌进行摇瓶发酵验证，从而实现了高通量筛选的目的。

1.2.5 摇瓶发酵与发酵罐补料发酵

摇瓶发酵生产 MA：将保存于 -80 °C 的工程菌在加有氨苄青霉素的平板上划线，培养过夜，挑取单菌落到含有 3 mL LB 的试管中，30 °C、200 r/min 培养 12 h，测 OD_{600} 值，保证起始 $OD_{600}=0.4$ ，按相应比例接种到 10 mL 摇瓶发酵培养基中 (100 mL 摇瓶)，接种时添加 2% 葡萄糖，37 °C、220 r/min 培养 24 h，收集菌液用于 MA 产量的测定。

发酵罐补料发酵生产 MA：选取摇瓶发酵中 MA 产量最高的菌株进行发酵罐放大培养。将保存于 -80 °C 的工程菌在加有氨苄青霉素的平板上划线，培养过夜，挑取单菌落到含有 3 mL LB 的试管中，30 °C、200 r/min 培养 12 h，再将 3 mL 培养液接种于 200 mL 种子培养基 (1 L 摇瓶) 中，37 °C、250 r/min 培养 12 h，然后将 200 mL 种子全部接种于装有 1.8 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中，在 37 °C、pH 6.5、溶氧 40% 的条件下发酵，通过氨水调控 pH。严格控制培养基中残糖含量低于 1 g/L。从 6 h 开始，每隔 6 h 取样检测发酵液中葡萄糖、DHS、PCA、CA 以及 MA 含量。

1.2.6 代谢产物和菌体量检测

利用高效液相色谱来确定发酵液中葡萄糖消耗量，DHS、PCA、CA 以及 MA 积累量。发酵液稀释适当倍数后取 1 mL 于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液制样，上液相。检测条件：VWD 检测器，Innoval C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)，流动相 A 为水 磷酸=1 000 1

(占 80%) ,B 为甲醇 (占 20%) ,流速 0.8 mL/min ,柱温 30 °C ,检测波长分别为 210 nm 以及 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 DHS、PCA、CA 以及 MA 等标准品构建 HPLC 标准曲线。以水作为空白 ,用分光光度计测定 OD_{600} 值作为单位时间的菌体量。

2 结果与分析

2.1 MA 细胞工厂的构建

为了构建基因组整合型的 MA 细胞工厂 ,选择实验室前期构建的产 3-脱氢莽草酸大肠杆菌 WJ060 为出发菌株。该菌株是在野生型大肠杆菌 ATCC8739 中 ,通过弱化调控 *aroE*、*aroF* 突变体替换解除反馈抑制作用、强化调控 *tktA*、*galP/glkA* 替换 PTS 以及弱化调控 *pyk* 和 *pgi* 后获得 ,可高效生产 3-脱氢莽草酸 ,摇瓶产量超过 3 g/L (图 1)。结合理性设计原则 ,在产 3-脱氢莽草酸的大肠杆菌 WJ060 基因组上 ,通过替代乳酸脱氢酶基因 *ldhA* ,依次整合 3 种不同强度的组成型启动子组合调控的 3 个外源基因 (*aroZ*、*aroY*、*catA*) ,成功构建了 27 株 MA 工程菌 ,实现了外源基因在 WJ060 基因组上的表达 ,结果如图 3 所示。对 MA 及其副产物产量分析表明 ,在 MA 产量前三的工程菌 (*E. coli* MA21、*E. coli* MA27 以及 *E. coli* MA30) 中 *catA* 的表达均由高强度组成型启动子 P3 调控 ,而在 MA 产量最低的 3 株工程菌 (*E. coli* MA13、*E. coli* MA22 以及 *E. coli* MA31) 中 *aroY* 以及 *catA* 的表达均由弱强度组成型启动子 P1 调控 ,其副产物 DHS、PCA 以及 CA 在不同程度上均有较多积累 *catA* 基因的表达强度影响 MA 的生产强度 ;*E. coli* MA30 产量最高达到 1.7 g/L ,其副产物 DHS 因其 *aroZ* 的表达由中等强度组成型启动子

P2 调控 ,未完全转化到 PCA 而积累 0.067 g/L ,由于 *aroY* 和 *catA* 的表达均受到高强度组成型启动子 P3 调控 ,PCA 和 CA 基本上都转化成 MA 而没有积累 ;由 3 个最强的 P3 启动子分别调控 3 个外源基因表达的 *E. coli* MA39 产量少于 *E. coli* MA30 ,与预期不一致 ,其原因在于 *E. coli* MA39 生长情况明显较弱 ,不利于 MA 的积累 ;同时结合 27 株工程菌的生长情况分析 ,MA 产量较高的工程菌 (*E. coli* MA21、*E. coli* MA27 以及 *E. coli* MA30) 其生长情况明显较弱 ,相反 ,MA 产量较低的工程菌 (*E. coli* MA13、*E. coli* MA22 以及 *E. coli* MA31) 其生长情况反而较好 ,MA 产量的积累对 MA 工程菌的生长有明显的抑制作用。通过构建一系列的 MA 细胞工厂 ,成功得到 1 株生长较好、产量较高的 MA 工程菌 MA30。

2.2 MA 高通量测定方法的建立

为了提高 MA 细胞工厂的生产能力 ,期望通过基因组复制工程 ,筛选得到产能提高的 MA 突变株。然而 ,利用产物 HPLC 分析等检测方法难以进行庞大的文库筛选 ,需要高通量的检测和筛选方法。由此 ,基于 MA 在 260 nm 处有良好的紫外吸收性质 ,我们测试了 MA 在 260 nm 吸光度值与标准品浓度之间的关系 ,发现实验测得的吸光度值 y 与标准 MA 溶液浓度 x 之间的关系为 $y=2.703 2x+4.406 8$,相关系数的平方 R^2 为 0.990 5 ,线性关系良好 (图 4)。因此 ,利用紫外检测的方法可以用来实现对生产 MA 的突变体文库快速、准确地筛选。

2.3 MA 细胞工厂的优化

2.3.1 MA 细胞工厂的高通量筛选

第一轮筛选 :以 *E. coli* MA30 作为出发菌株 ,基于 *dnaQ* 突变体的基因组复制工程构建了

MA 突变文库后, 利用 MA 高通量筛选方法, 对文库进行酶标仪检测 260 nm 处的紫外吸光度值 (图 5A)。在含有 950 个样本的 *E. coli* MA30

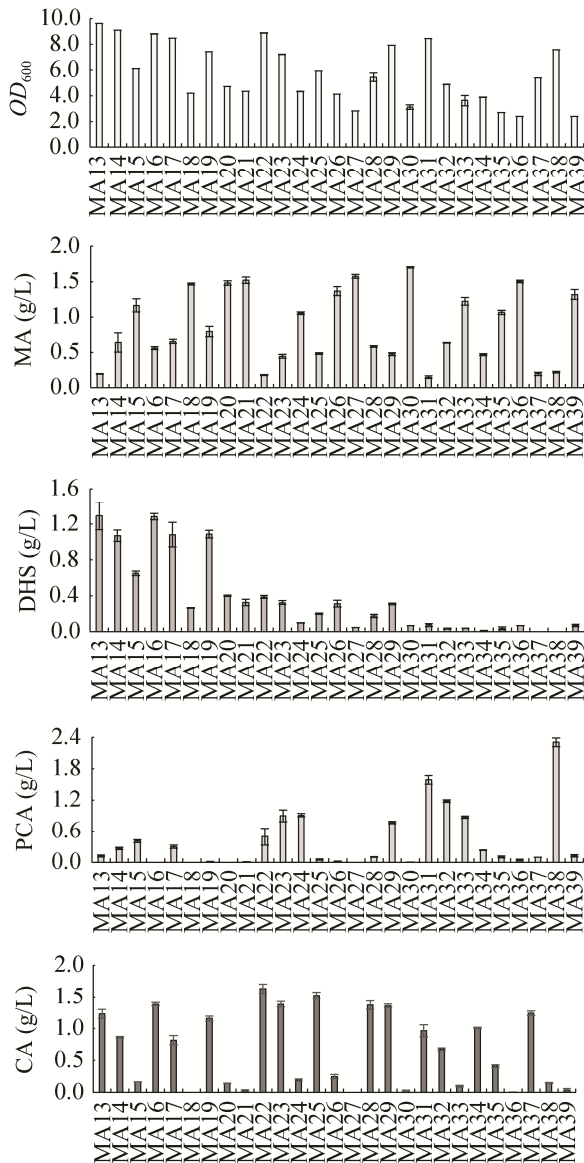


图 3 整合不同强度组成型启动子表达 *aroZ*、*aroY* 和 *catA* 的工程菌的 MA 产量

Fig. 3 MA production of strains with synthetic promoters of different strengths which express *aroZ*, *aroY* and *catA*. DHS: 3-dehydroshikimate; PCA: protocatechuic acid; CA: catechol; MA: *cis, cis*-muconic acid.

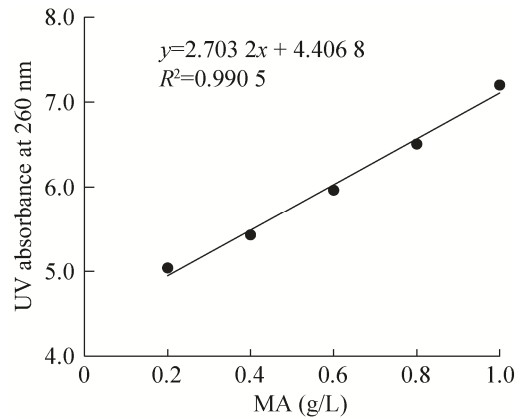


图 4 紫外检测 MA 的标准曲线

Fig. 4 Standard curve of *cis, cis*-muconic acid by UV detection.

文库中, 筛选得到紫外吸收值大于 MA30 共 351 个, 占文库 37%, 并经过摇瓶发酵验证, 得到了 MA 产量提高的突变体 *E. coli* MA30-G1。

第二轮筛选: 为了进一步提高 *E. coli* MA30-G1 的生产能力, 以 *E. coli* MA30-G1 作为出发菌株, 基于 *dnaQ* 突变体的基因组复制工程构建文库后, 利用 MA 高通量筛选方法, 对文库进行酶标仪检测 260 nm 处的紫外吸光度值 (图 5B)。在含有 950 个样本的 *E. coli* MA30-G1 文库中, 筛选得到紫外吸收值大于 *E. coli* MA30-G1 的突变体共 171 个, 占文库 18%, 并经过摇瓶发酵验证, 得到了 MA 产量进一步提高的突变体 *E. coli* MA30-G2。

2.3.2 筛选得到的进化菌株摇瓶发酵评价

为了同时评价筛选得到的 *E. coli* MA30-G1, *E. coli* MA30-G2 以及对照 *E. coli* MA30 生产 MA 的情况, 对其进行摇瓶发酵评价 (图 6)。通过基因组复制工程与高通量筛选方法的结合, 先后成功筛选得到了 MA 产量较 *E. coli* MA30 提高 4% 的 *E. coli* MA30-G1 较 *E. coli* MA30-G1

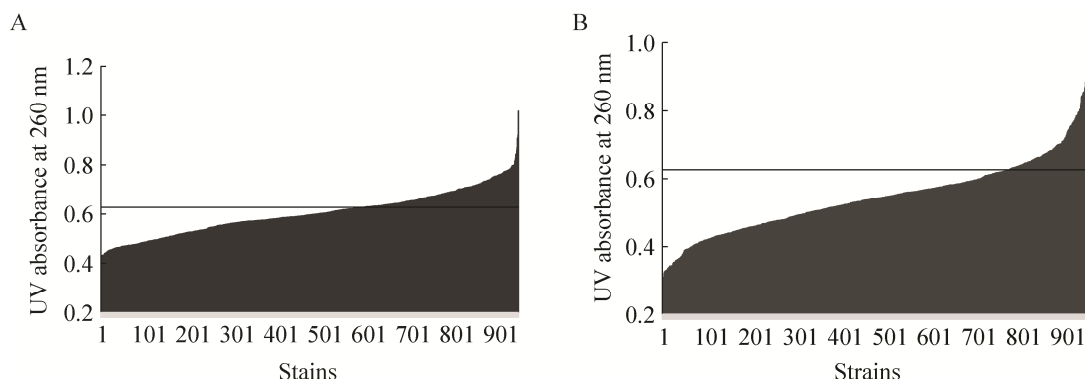


图5 MA 突变体的紫外吸光度值

Fig. 5 The value of UV absorbance at 260 nm of MA mutants. (A) The value of UV absorbance of MA30 mutants (Solid black line: the value of UV absorbance of MA30). (B) The value of UV absorbance of MA30-G1 mutants (Solid black line: the value of UV absorbance of MA30-G1).

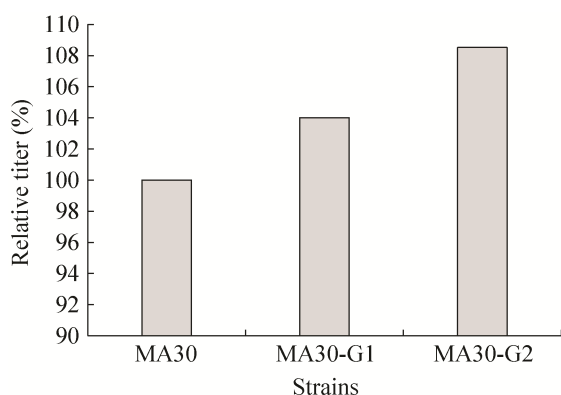


图6 大肠杆菌 MA30-G1 和 MA30-G2 相对于 MA30 的粘康酸产量提高率

Fig. 6 The increase titer of *cis, cis*-muonic acid between *E. coli* MA30-G1, MA30-G2 and MA30.

产量进一步提高 4.3% 的 *E. coli* MA30-G2, 从而最终得到的 *E. coli* MA30-G2 较 *E. coli* MA30 产量提高了 8.5%。因而, 我们利用基因组复制辅助工程与 MA 高通量筛选方法, 实现了快速、便捷的 MA 文库构建与筛选, 并成功筛选到 MA 细胞工厂产能进一步提高的 *E. coli* MA30-G2。

2.3.3 MA30-G2 的 5 L 发酵罐分批补料发酵评价

为了进一步研究工程菌生产 MA 的性能,

选取 *E. coli* MA30-G2 作为出发菌株, 进行 5 L 发酵罐分批补料发酵 (图 7)。经过 72 h 的发酵, MA 产量最高为 11.5 g/L, PCA、CA 以及其他的副产物含量几乎为 0 g/L, 而 DHS 积累了 2.7 g/L, 转化率 8.1% mol/mol, 其原因在于在 *E. coli* MA30-G2(P2、P3 和 P3 分别调控 3 个外源基因的表达) 中的 *aroZ* 由中等强度的启动子 P2 调控, 致使 DHS 无法完全转化到 PCA 而积累了下来。通过放大发酵, *E. coli* MA30-G2 的 MA 产量得到了进一步的提高, 较 *E. coli* MA30 提高了 6.7 倍。随着 MA 产量的不断增加, OD_{600} 在 30 h 达到最大值为 19.4 之后一直在降低, 78 h 时降到 12.4。一方面, 由于发酵后期, 菌体处于衰亡期, 死亡数大大超过新生数, 总活菌数明显下降, 生理代谢活动趋于停滞; 另一方面可能由于 MA 的积累对 *E. coli* MA30-G2 造成了很大的生长压力, 抑制其生长。后续我们可以通过对 *E. coli* MA30-G2 进行 MA 耐受性适应性进化, 提高菌株对 MA 的耐受性, 从而进一步提高 MA 工程菌的生产能力。

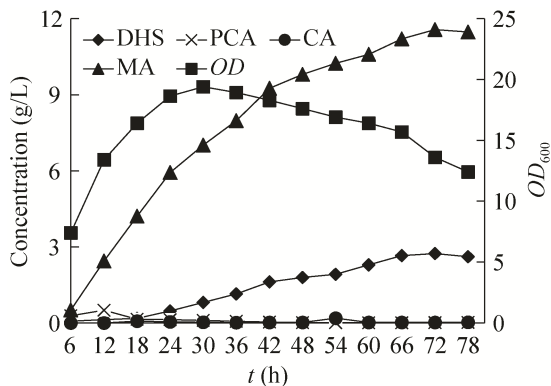


图7 MA30-G2的5 L发酵罐分批补料发酵
Fig. 7 MA30-G2 in 5 L fed-batch fermentation.

3 讨论

本研究先后采用了理性设计原则以及基因组复制工程对产3-脱氢莽草酸的大肠杆菌WJ060进行改造与优化,包括了在WJ060基因组中的 $ldhA$ 位点上,依次整合3种不同强度的组成型启动子组合调控的3个外源基因($aroZ$ 、 $aroY$ 、 $catA$)的理性设计以及MA工程菌基于基因组复制工程构建文库与基于紫外检测MA方法构建的高通量筛选方法进行筛选的非理性设计,从而得到了27株MA工程菌中MA产量最高的*E. coli* MA30以及产量进一步提高的*E. coli* MA30-G2。

根据理性设计原则,在不同强度的组成型启动子组合调控3个外源基因表达而构建的27株MA工程菌中,*E. coli* MA30(由P2、P3和P3组成型启动子分别调控3个外源基因的表达)在简单的无机盐摇瓶发酵培养基中经过24 h发酵,产量达到1.7 g/L,实现了MA生产过程无需添加额外的营养物质,也成功避免了质粒表达外源基因时存在的易丢失现象,极大降低了MA生产成本,为异源合成MA以及MA工业化生产提供参考。然而,基于理性设计原则的代谢工程方法虽然可以通过对宿主的代谢网络

中的特定基因位点进行遗传改造,来实现微生物向着指定表型区域定向跃进,但是,很难实现基因组上多个位点的同时扰动来增强表型的目的。

于是,我们基于 $dnaQ$ 突变体的基因组复制工程构建了1个含有将近千个突变体的文库,实现了在*E. coli* MA30的基因组上多位点的同时扰动,并利用已构建的高效、便捷的MA紫外检测和筛选方法,经过两轮的筛选,成功筛选得到MA产量逐步提高的*E. coli* MA30-G1和*E. coli* MA30-G2,在摇瓶发酵中*E. coli* MA30-G2的MA产量较*E. coli* MA30提高了8.5%。对*E. coli* MA30-G2进行5 L发酵罐的分批补料发酵,经过72 h的发酵,MA产量达到最高为11.5 g/L较*E. coli* MA30产量提高了6.7倍,从而证实了基因组复制工程与MA高通量筛选方法能够高效而有效地提高MA工程菌的生产能力。

本研究中,*E. coli* MA30-G2在含有较高浓度的MA时生长明显受到抑制,后续可以通过对*E. coli* MA30-G2进行耐受性适应性进化,提高其耐受性,进一步提高*E. coli* MA30-G2的生产能力。借助基因组复制工程,我们筛选得到的*E. coli* MA30-G1和*E. coli* MA30-G2以及原始菌株*E. coli* MA30进行基因组重测序,期望通过序列对比以及功能性基因的差异性分析整个代谢网络的差异性,从而为后续反向代谢工程操作提高MA产量提供参考。

REFERENCES

- [1] Xie NZ, Liang H, Huang RB, et al. Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 615–622.
- [2] Bui V, Frost JW. Process for preparing hexamethylenediamine and polyamides therefrom: WO, 141993. 2012-10-18.
- [3] Coudray L, Bui V, Frost JW, et al. Process for

- preparing caprolactam and polyamides therefrom: US, 9073867. 2015-07-07.
- [4] Tino P, Markus S, Michael B, et al. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. *J Biotechnol*, 2013, 167: 75–84.
- [5] Jung HM, Jung MY, Oh MK, et al. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for the production of *cis, cis*-muconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 5217–5225.
- [6] Pandeeti EV, Siddavattam D. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. DS002 and cloning sequencing of partial *cata* gene. *Indian J Microbiol*, 2011, 51(3): 312–318.
- [7] Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Amer Chem Soc*, 1994, 116: 399–400.
- [8] Lin YH, Sun XX, Yuan QP, et al. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2014, 23: 62–69.
- [9] Zhang HR, Pereira B, Li Z, et al. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(27): 8266–8271.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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 Amer Chem Soc*, 1996, 118(46): 11587–11591.
- [13] 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.
- [14] Han L, Liu P, Wu Y, et al. Engineering catechol 1,2-dioxygenase by design for improving the performance of the *cis, cis*-muconic acid synthetic pathway in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 13435–13446.
- [15] Luan GD, Cai Z, Li Y, et al. Genome replication engineering assisted continuous evolution (GREACE) to improve microbial tolerance for biofuels production. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 137–145.
- [16] Luan GD, Cai Z, Gong F, et al. Developing controllable hypermutable *Clostridium* cells through manipulating its methyl-directed mismatch repair system. *Protein Cell*, 2013, 11: 854–863.
- [17] Vardon DR, Franden MA, Johnson CW, et al. Adipic acid production from lignin. *Energy Environ Sci*, 2015, 8: 617–628.
- [18] Yocum RR, Gong W, Dole S, et al. Production of muconic acid from genetically engineered microorganisms: WO, 116244. 2013-01-29.
- [19] Van Duuren JB, Wijte D, Karge B, et al. PH-stat fed-batch process to enhance the production of *cis, cis*-muconate from benzoate by *Pseudomonas putida* KT2440-JD1. *Biotechnol Prog*, 2012, 28: 85–92.
- [20] Kaneko A, Ishii Y, Kirimura K. High-yield production of *cis, cis*-muconic acid from catechol in aqueous solution by biocatalyst. *Chem Lett*, 2011, 40(4): 381–383.
- [21] Bui V, Lau MK, Macrae D, et al. Methods for producing isomers of muconic acid and muconate salts: US, 8809583. 2013-08-19.
- [22] Umbarger HE. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 1978, 47: 533–606.
- [23] Gong ZJ, Peng YF, Zhang YT, et al. Construction and optimization of *Escherichia coli* for producing rhamnolipid biosurfactant. *Chin J Biotech*, 2015, 31(7): 1050–1062 (in Chinese).
巩志金, 彭彦峰, 张煜婷, 等. 产鼠李糖脂生物表面活性剂大肠杆菌的构建与优化. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1050–1062.
- [24] Lu J, Tang JL, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455–2462.

(本文责编 陈宏宇)