

# 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-高丝氨酸

张博, 姚臻豪, 柳志强, 郑裕国

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

张博, 姚臻豪, 柳志强, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产 L-高丝氨酸. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1287-1297.

Zhang B, Yao ZH, Liu ZQ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-homoserine production. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1287-1297.

**摘要:** L-高丝氨酸是一种非必需氨基酸, 在工业生产中常被用作重要的平台化合物和添加剂。为提高产物合成效率, 本文以实验室构建的 L-高丝氨酸高产工程菌大肠杆菌 *Escherichia coli* H0-0 作为底盘菌株进行代谢改造。首先对 *ppc* 和 *pyc<sub>cg</sub><sup>P458S</sup>* 基因进行过表达来优化柠檬酸循环, 然后通过 *thrA<sup>C1034T</sup>* 和 *lysC<sub>cg</sub><sup>C932T</sup>* 提高产物的合成效率, 随后对 *iclR* 基因进行了敲除以减少副产物的积累。同时导入 *scrA*、*scrB*、*scrK* 三个蔗糖代谢基因使大肠杆菌能利用蔗糖作为碳源进行发酵。L-高丝氨酸产量从 3.2 g/L 提高至 11.1 g/L, 本研究也为 L-高丝氨酸的工业化生产奠定了基础。

**关键词:** L-高丝氨酸, 平台化合物, 柠檬酸循环, 过表达, 副产物, 蔗糖

## Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-homoserine production

Bo Zhang, Zhenhao Yao, Zhiqiang Liu, and Yuguo Zheng

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** L-Homoserine is a non-essential amino acid that is often used as an important platform compound and additive in industrial production. To improve the production efficiency, a previously constructed L-homoserine producing strain *E. coli* H0-0 was used as a chassis for further metabolic modification. Firstly, the *ppc* and *pyc<sub>cg</sub><sup>P458S</sup>* genes were overexpressed to optimize the Krebs's cycle. Subsequently, *thrA<sup>C1034T</sup>* and *lysC<sub>cg</sub><sup>C932T</sup>* were overexpressed to improve the product synthesis, followed by inactivation of *iclR* gene to reduce the accumulation of by-products. The introduction of three sucrose metabolism genes, *scrA*, *scrB* and *scrK*, enabled *E. coli* to ferment sucrose. The titer of L-homoserine increased from 3.2 g/L to 11.1 g/L.

**Keywords:** L-homoserine, platform compound, Krebs's cycle, overexpressing, by-products, sucrose

L-高丝氨酸 (L-homoserine, 2-amino-4-hydroxybutyric acid, HS) 是苏氨酸、甲硫氨酸和

胱硫醚生物合成的中间代谢物。拥有丰富的生物活性, 因此被广泛地应用于医药、饲料和美妆等

**Received:** July 20, 2020; **Accepted:** September 9, 2020

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901400), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31700095, 31971342).

**Corresponding author:** Zhiqiang Liu. Tel: +86-571-88320630; Fax: +86-571-88320614; E-mail: microliu@zjut.edu.cn  
国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901400), 国家自然科学基金 (Nos. 31700095, 31971342) 资助。

产品的生产<sup>[1-2]</sup>。此外 L-高丝氨酸还是一种重要的平台化合物，可以通过化学法转化为四氢叶酸、高丝氨酸环二酮哌嗪等多种产品<sup>[3]</sup>。目前 L-高丝氨酸的主要生产方式为化学合成<sup>[4-5]</sup>。

根据文献记载，Matsunosuke 等将来自植物中和动物肝脏中的刀豆酸进行水解后获得了天然高丝氨酸<sup>[6-7]</sup>。1907 年 Fischer 和 Blumenthal 使用化学法首次合成了高丝氨酸，随后 Marvin 从结构和性质上解释并验证了 Fischer 的研究<sup>[3]</sup>。时至今日，仍主要以丁内酯为原料通过化学法生产 L-高丝氨酸，但是存在原料成本高、流程复杂等缺点。1984 年 Plachy 等使用苏氨酸缺陷型谷氨酸棒杆菌进行蔗糖

发酵得到了高丝氨酸<sup>[8]</sup>。Li 等使用基因编辑技术构建得到了一株高丝氨酸高产的大肠杆菌 HM4 (pBR $metL$ -pNrhtA)，其在 500 mL 摇瓶中发酵得到 2.12 g/L 的产量。在敲除工程菌株的外转运蛋白基因 *tdcC* 后得到菌株 HM5 (pBR $metL$ -pNrhtA)，经过补料发酵得到了 39.9 g/L 的高丝氨酸<sup>[9]</sup>。与化学法相比发酵法的原料成本低、步骤少。

大肠杆菌拥有明确的基因背景、清晰的代谢网络、较短的生长周期，所以被用于多种天然产物的发酵生产。在正常情况下大肠杆菌中 L-高丝氨酸的合成路径如图 1 所示：首先，葡萄糖经过糖酵解后以乙酰辅酶 A 的形式进入柠檬酸循环后

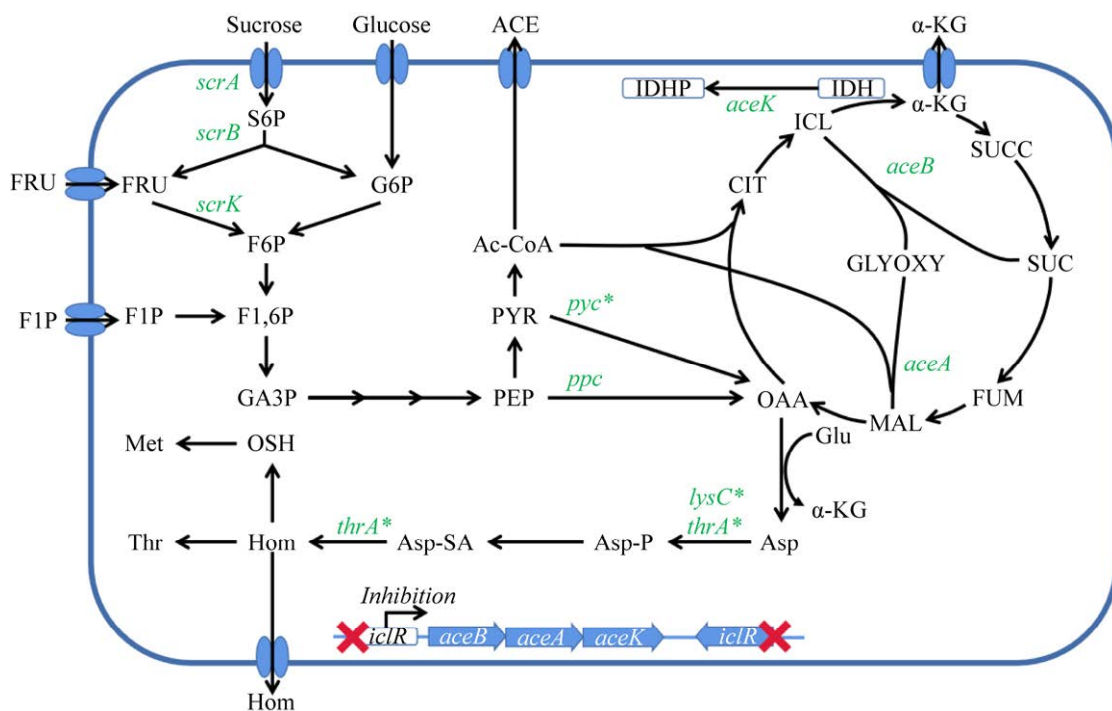


图 1 工程菌株中 L-高丝氨酸代谢途径改造示意图

Fig. 1 L-homoserine biosynthetic pathway in L-homoserine-producing strain. S6P: sucrose-6-phosphate; G6P: glucose-6-phosphate; FRU: fructose; F6P: fructose-6-phosphate; F1,6P: fructose-1,6-diphosphate; GA3P: 3-phosphoglyceraldehyde; PEP: phosphoenolpyruvate; PYR: pyruvate; Ac-CoA: acetyl-CoA; ACE: acetic acid; OAA: oxalacetic acid; CIT: citric acid; ICL: isocitric acid;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutaric acid; SUCC: succinyl-CoA; SUC: succinic acid; MAL: L-malate; Asp: L-aspartic acid; Asp-P: aspartyl-phosphate; Asp-SA: L-aspartate-4-semialdehyde; Glu: glutamic acid; Hom: homoserine; Met: methionine; Lys: lysine; Thr: threonine; *scrA*: sucrose-specific transporter subunit IIABC; *scrB*: sucrose-6-phosphate hydrolase; *scrK*: fructokinase; *ppc*: phosphoenolpyruvate carboxylase; *pyc\**: mutated pyruvate carboxylase, P458S; *iclR*: DNA-binding transcriptional repressor; *aceA*: isocitrate lyase; *aceB*: malate synthase A; *aceK*: isocitrate dehydrogenase phosphatase; *thrA\**: mutated aspartokinase I and homoserine dehydrogenase I, C1034T; *lysC\**: mutated aspartokinase III, C932T; IDH: isocitrate dehydrogenase; IDHP: isocitrate dehydrogenase (phosphorylated).

转化为草酰乙酸参与到高丝氨酸的合成中。首先在天冬氨酸转氨酶作用下转化为天冬氨酸。天冬氨酸在天冬氨酸激酶 (由 *thrA*、*metL*、*lysC* 编码)、天冬氨酸半醛脱氢酶 (由 *asd* 编码)、高丝氨酸合成酶 (由 *thrA*、*metL* 编码) 作用下催化为 L-高丝氨酸<sup>[10]</sup>。

L-高丝氨酸在野生型大肠杆菌中不易积累<sup>[11]</sup>。在前期工作中,本实验室利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术敲除了旁路代谢的相关基因 (*metB*、*thrB*、*metA*、*lysA*) 和调节基因 (*metJ*), 将 *metL* 基因的天然启动子替换为 Trc 启动子, 并且敲除转运基因 *metI* 构建得到了高产菌株 *E. coli* H0-0。该菌株经过 48 h 葡萄糖发酵后能积累 3.2 g/L 产物, 同时产生大量乙酸和  $\alpha$ -酮戊二酸。这是因为柠檬酸循环和产物合成效率偏低所致。

本研究以大肠杆菌 *Escherichia coli* H0-0 为底盘菌株, 使用 CRISPR-Cas9 基因编辑和质粒过表达技术对柠檬酸循环、产物合成、乙醛酸循环和蔗糖代谢这 4 个模块进行了改造: 首先将 *ppc* 基因 (编码磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶) 的天然启动子替换为 Trc 启动子<sup>[12]</sup>, 又通过质粒过表达了突变基因 *ppc*<sub>cg</sub><sup>P458S</sup> (*ppc*\*)<sup>[13]</sup>。基因 *ppc* 和 *ppc*\* 分别编码磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶, 这两种酶可以减少乙酰辅酶 A 积累, 增加柠檬酸循环的物质输入<sup>[14-15]</sup>。然后过表达 *thrA*<sup>C1034T</sup> (*thrA*\*) 和 *lysC*<sub>cg</sub><sup>C932T</sup> (*lysC*\*) 基因, *thrA*\* 编码抗反馈抑制的天冬氨酸激酶 III 和高丝氨酸脱氢酶 I 融合蛋白, *lysC*\* 编码抗反馈抑制的天

冬氨酸激酶 I<sup>[16]</sup>。*thrA*\* 和 *lysC*\* 的过表达将提高产物的合成速率, 能减少草酰乙酸、柠檬酸等副产物的积累。随后敲除乙醛酸途径转录调控因子基因 *iclR* 来强化乙醛酸循环, 从而来强化菌株对乙酰辅酶 A 的利用能力<sup>[17]</sup>。最后, 为了让菌株能利用高效易得的蔗糖进行发酵, 外源导入了蔗糖代谢基因<sup>[18]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

本试验所用菌株与质粒如表 1 和表 2 所示。

#### 1.1.2 主要试剂

卡那霉素 (工作浓度 50 mg/mL)、氯霉素 (工作浓度 25 mg/mL)、壮观霉素 (工作浓度 50  $\mu$ g/mL) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; TransStart Fast *Pfu* DNA 聚合酶购自昆明诺唯赞生物科技有限公司; Clone Express<sup>TM</sup> II 一步克隆试剂盒 C112 和 C113 购自昆明诺唯赞生物科技有限公司。质粒小量快速提取试剂盒、2 $\times$ Taq PCR MasterMix、DNA Marker 购自北京康为世纪生物科技有限公司; L-高丝氨酸标准品购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 5 (固体培养基加入 2% 琼脂粉)。

表 1 本研究所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relative characteristics	Sources
pCas	repA101(Ts) <i>kan</i> Pcas-cas9 <i>ParaB</i> -Red <i>lacI</i> <sup>q</sup> P <sub>trc</sub> -sgRNA-pMB1	Lab collection
pTarget	pMB1 <i>aadA</i> sgRNA	Lab collection
pTrc99a	Trc-promo, <i>kan</i> , <i>lacI</i> , <i>ori</i>	Lab collection
pACYC*	Trc-promo, <i>lac</i> operator, p15A <i>ori</i> , <i>cmr</i> , <i>lacI</i>	Lab collection
ppyc*	<i>cmr</i> , p15A <i>ori</i> , <i>trc-ppc</i> *, <i>lacI</i>	This study
pSCR	<i>trc-scrA</i> , <i>scrB</i> , <i>scrK</i> , <i>lacI</i> , <i>kan</i>	This study
pACP	p15A <i>ori</i> <i>trc-thrA</i> * <i>lysC</i> * <i>ppc</i> *, <i>lacI</i>	This study

表 2 本研究所用的菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Relative characteristics	Sources
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> , $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ), $\lambda$ <sup>-</sup>	Beijing TransGen
<i>E. coli</i> H0-0	<i>E. coli</i> W3110 derivative $\Delta$ <i>metI</i> , $\Delta$ <i>metJ</i> , $\Delta$ <i>thrB</i> , $\Delta$ <i>metB</i> , $\Delta$ <i>metA</i> , $\Delta$ <i>lysA</i> , <i>Trc-metL</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> H1-0	<i>E. coli</i> H-0 derivative, <i>Trc-ppc</i>	This study
<i>E. coli</i> H2-0	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, <i>Trc-ppc</i> harboring <i>ppyc</i> *	This study
<i>E. coli</i> H3-0	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, <i>Trc-ppc</i> harboring pACP	This study
<i>E. coli</i> H4-0	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, <i>Trc-ppc</i> , $\Delta$ <i>iclR</i> harboring pACP	This study
<i>E. coli</i> H5-0	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, <i>Trc-ppc</i> , $\Delta$ <i>iclR</i> harboring pACP and pSCR	This study
<i>E. coli</i> H0-5	<i>E. coli</i> H0-0 harboring pSCR	This study
<i>E. coli</i> H0-2	<i>E. coli</i> H0-0 harboring <i>ppyc</i> *	This study
<i>E. coli</i> H0-4	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, $\Delta$ <i>iclR</i>	This study
<i>E. coli</i> H3-1	<i>E. coli</i> H0-0 harboring pACP	This study
<i>E. coli</i> H4-3	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, <i>Trc-ppc</i> , $\Delta$ <i>iclR</i> harboring <i>ppyc</i> *	This study
<i>E. coli</i> H4-23	<i>E. coli</i> H0-0 derivative, <i>Trc-ppc</i> , $\Delta$ <i>iclR</i>	This study

摇瓶葡萄糖发酵 MS 培养基 (g/L): 葡萄糖 40, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, 酵母粉 4, CaCO<sub>3</sub> 15。微量元素 (mg/L) 包括: CaCl<sub>2</sub> 40, FeSO<sub>4</sub> 40, MnSO<sub>4</sub> 20, CoCl<sub>2</sub> 8, ZnSO<sub>4</sub> 4, CuCl<sub>2</sub> 2, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1。

摇瓶蔗糖发酵 MS 培养基 (g/L): 蔗糖 70, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, 酵母粉 4, CaCO<sub>3</sub> 15。微量元素 (mg/L) 包括: CaCl<sub>2</sub> 40, FeSO<sub>4</sub> 40, MnSO<sub>4</sub> 20, CoCl<sub>2</sub> 8, ZnSO<sub>4</sub> 4, CuCl<sub>2</sub> 2, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1。

氨基酸 (g/L) 包括: 蛋氨酸 0.2, 苏氨酸 0.2, 赖氨酸 0.02。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养方法

摇瓶发酵生产 L-高丝氨酸: 挑取单菌落到有 5 mL LB 的试管中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 取 200  $\mu$ L 接种到 10 mL MS 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 或 48 h 或 72 h, 再选取合适的时间点取样测定 OD<sub>600</sub> 以及柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乙酸、草酰乙酸和 L-高丝氨酸的浓度。

### 1.2.2 代谢产物和菌体量检测

利用氨基酸分析仪来检测发酵液中的 L-高丝氨酸等氨基酸的浓度, 以高效液相色谱测定发酵液中的小分子酸浓度。取发酵液 1 mL 于 12 000 r/min

离心 5 min 后分离上清和沉淀。将沉淀用水进行冲洗并离心分离后使用 20% 的乙酸悬浮去除沉淀中的碳酸钙。最后用 1 mL 水悬浮后用分光光度计于 600 nm 处测定 OD<sub>600</sub> 值作为单位时间的菌体量。

取发酵上清用水稀释一定倍数后用液相和氨基酸分析仪分别检测胞外的副产物和产物积累量。

副产物检测条件: Aminex HPLC(BIO-RAD) 色谱柱, 流动相为 8.3% (m/m) 硫酸。

产物检测条件: 全自动氨基酸分析仪 (SYKAM S-433D, 德国)

样品均有 3 个以上平行样, 结果取平均值。用 L-高丝氨酸、柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乙酸、草酰乙酸标品配制标准液并绘制标准曲线。

### 1.2.3 蔗糖代谢基因表达载体的构建

在 NCBI 网站上获得了来自变形链球菌 *Streptococcus mutans* UA159 蔗糖代谢基因 *scrA*、*scrB*、*scrK* 的序列, 由金斯瑞生物科技有限公司负责密码子优化后合成到了质粒载体上。

以合成的质粒载体为模板, 用引物 *scrA*-F 和 *scrA*-R/*scrB*-F 和 *scrB*-R/*scrK*-F 和 *scrK*-R 分别进行扩增后使用 NEB (北京) 有限公司的 Dpn I 消化模板并纯化获得具有同源臂的 *scrA*、*scrB*、*scrK*

序列。以实验室保存的 pTrc99a 质粒为模板, 用引物 pTrc99a-F 和 pTrc99a-R 进行扩增获得线性化的 pTrc99a 质粒片段 (图 2)。纯化后用一步克隆试剂盒 Clone Express™ II 的 C113 系列产品进行多片段连接, 将连接产物转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  后, 用引物 p99a-F 和 p99a-R 进行菌落 PCR 挑取阳性菌落测序验证后获得重组质粒 pSCR。

#### 1.2.4 突变基因表达载体的构建

以谷氨酸棒杆菌基因组为模板, 分别用引物 *pyc-F* 和 *pyc-R*、*lysC-F* 和 *lysC-R* 进行扩增消化并纯化后获得 *pyc<sub>cg</sub>*、*lysC<sub>cg</sub>* 基因片段 (表 3)。以大肠杆菌 *E. coli* W3110 基因组为模板, 用引物 *thrA-F* 和 *thrA-R* 进行扩增消化并纯化后获得 *thrA* 基因片段。

突变过程以 *pyc* 为例: 首先以 *pyc* 基因为模板分别使用引物 *pyc\*-1* 和 *pyc\*-2*、*pyc\*-3* 和 *pyc\*-4*

进行扩增获得 *pyc\** 片段 A 和 *pyc\** 片段 B, 使用 Axygen 胶回收试剂盒进行纯化后将 *pyc\** 片段 A 和 *pyc\** 片段 B 作为模板, 以 *pyc\*-1* 和 *pyc\*-4* 作为引物进行融合 PCR, 纯化后获得具有同源臂的 *pyc\** 基因片段。具有同源臂的 *thrA\** 和 *lysC\** 基因片段可通过类似方法获得。

以 *pyc\** 基因片段为模板, 使用引物 *ppyc\*-F* 和 *pyc\*-4* 进行扩增并纯化后获得 *pyc\*s* 基因片段。

用实验室保存的 pACYC\* 质粒为模板以引物 pACYC184\*-F 和 pACYC184\*-R 进行扩增获得线性的载体片段并纯化。将线性的载体片段用一步克隆试剂盒 Clone Express™ II 的 C113 系列产品与 *pyc\**、*thrA\** 和 *lysC\** 进行多片段连接。将线性的载体片段用一步克隆试剂盒 Clone Express™ II 的 C112 系列产品与 *pyc\*s* 进行单片段连接。将以

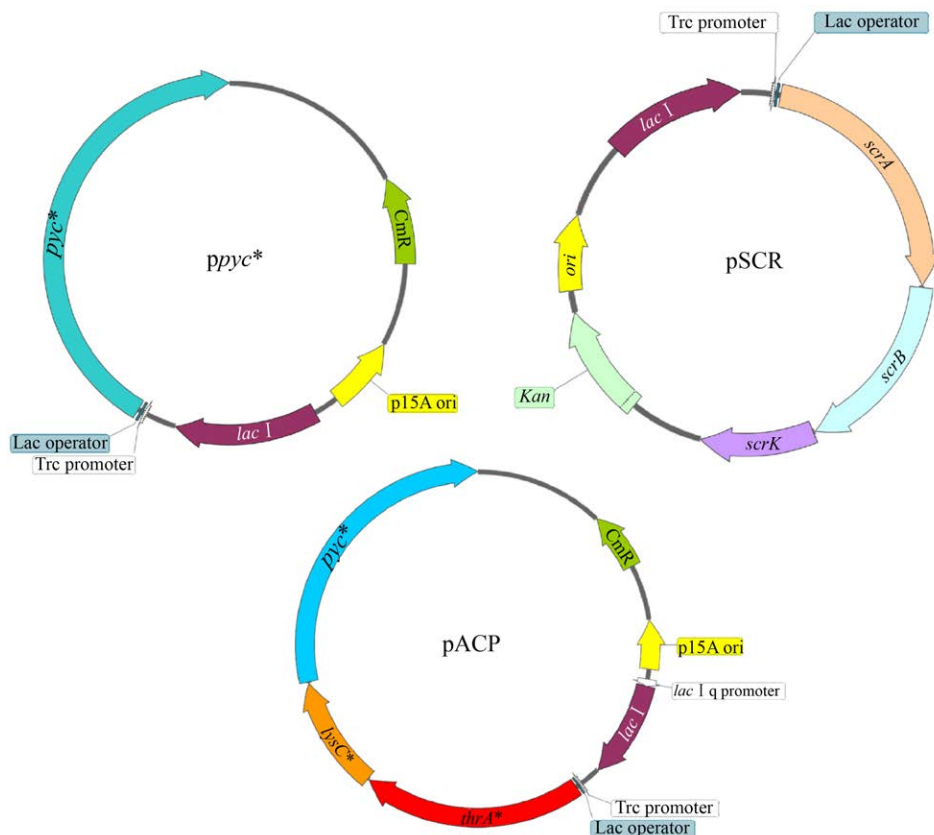


图 2 文中所用质粒的图谱

Fig. 2 Diagram of recombinant plasmids used in this study.

表 3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

Target gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>ppc</i>	pTD <i>ppc</i> -F	CCGAAGTGGTGAAGTACTGTACCGAAGCGCCGTTTATTC	39
	pTD <i>ppc</i> -R	CGGTATCGTTTGATAGCCCTGTAATTATACCTAGGAC	37
	p <i>Tppc</i> -1	CTTTTTTTGAATTCTCTAGACCGAAGTGGTGAAGTACTGTACCGAAGCG	49
	p <i>Tppc</i> -2	GCCGGATGATTAATTGTCAAAAAGCCACGTAAAAGCGGTGACGTCA	45
	p <i>Tppc</i> -3	ATCATCCGGCTCGTATAATGCAGGGCTATCAAACGATAAGATGGG	45
	p <i>Tppc</i> -4	GGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGGCTGGTTGTGTTTCGTAGTCAGC	46
	T- <i>ppc</i> -F	GTTTGCTCAACGATGCATTGGC	22
	T- <i>ppc</i> -R	CTTCCAGCCATGCCTGTGTC	20
<i>lysCcg</i>	<i>lysC</i> -F	GTGGCCCTGGTCGTAC	16
	<i>lysC</i> -R	TTAGCGTCCGGTGCC	15
<i>thrA</i>	<i>thrA</i> -F	ATGCGAGTGTTGAAGTTCG	19
	<i>thrA</i> -R	TCAGACTCCTAACTTCCATGAG	22
<i>lysCcg</i> *	<i>lysCcg</i> *-1	GTTAGGAGTCTGAAGGAAGGAGATATACGTGGCCCTGGTCGTAC	44
	<i>lysCcg</i> *-2	GAAGGTGATGTCGGTGGTG	19
	<i>lysCcg</i> *-3	CATCACCTTCACCTGCC	17
	<i>lysCcg</i> *-4	GTGAGTCGACACGTATATCTCCTTCCCTTAGCGTCCGGTGCC	42
<i>thrA</i> *	<i>thrA</i> *-1	CACAGGAAACAGACCATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGG	38
	<i>thrA</i> *-2	CCACGGAAATACGGGCGCGTG	21
	<i>thrA</i> *-3	GTATTTCCGTGGTGCTGATTACGCAATCATCTTC	34
	<i>thrA</i> *-4	CATAGAGCCGGCAATGTATATCTCCTTCCCTCAGACTCCTAACTTCCATGAG	52
<i>iclR</i>	pTD <i>iclR</i> -F	CCGAAGTGGTGAAGTACTGTACCGAAGCGCCGTTTATTC	39
	pTD <i>iclR</i> -R	CGGTATCGTTTGATAGCCCTGTAATTATACCTAGGAC	37
	p <i>TiclR</i> -1	CTTTTTTTGAATTCTCTAGACCGAAGTGGTGAAGTACTGTACCGAAGCG	49
	p <i>TiclR</i> -2	GCCGGATGATTAATTGTCAAAAAGCCACGTAAAAGCGGTGACGTCA	45
	p <i>TiclR</i> -3	ATCATCCGGCTCGTATAATGCAGGGCTATCAAACGATAAGATGGG	45
<i>iclR</i>	p <i>TiclR</i> -4	GGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGGCTGGTTGTGTTTCGTAGTCAGC	46
	T- <i>iclR</i> -F	GTTTGCTCAACGATGCATTGGC	22
	T- <i>iclR</i> -R	CTTCCAGCCATGCCTGTGTC	20
<i>pyc</i>	<i>pyc</i> -F	GTGTCGACTCACACATCTTC	20
	<i>pyc</i> -R	TTAGGAAACGACGACGATCAAG	22
<i>pyc</i> *	<i>pyc</i> *-1	GTGTCGACTCACACATCTTCAACG	24
	<i>pyc</i> *-2	AGTGATCGGCAATGAATCCGGT	22
	<i>pyc</i> *-3	GTGCGAGTGATCGGCAATG	19
	<i>pyc</i> *-4	CAGCCAAGCTTTTAGGAAACGACGACGATC	30
	<i>ppyc</i> *-F	GAAACAGACCGTGTGCGACTCACACATCTTC	30
pT-seq-F	GGCCTTTTGCTCACATGTTT	20	
pT-seq-R	TAGCACGATCAACGGCACTG	20	
Target-C-F	CTGCAGAAGCTTAGATCTATTACCC	25	
Target-C-R	TCTAGAGAATTCAAAAAAGCACCG	25	
T-Trc-R	CGAGCCGGATGATTAATTGTC	21	
pACYC184*-seq-F	GCACTCCCCTTCTGGATAAT	20	
pACYC184*-seq-R	GGCGATTTGTCCTACTCAG	20	
pACYC*P-F	GTGTCGACTCACACATCTTCAAC	23	
pACYC*P-R	GGTCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATC	28	
pTrc99a-F	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGG	22	
pTrc99a-R	CAATTCACACAGGAAACAGACC	23	
pACYC184*-F	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATC	25	
pACYC184*-R	GGTCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATC	28	

上连接产物转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  后, 用引物 pACYC184\*-F 和 pACYC184\*-R 进行菌落 PCR, 根据产物条带长度挑取阳性菌落送测验证后获得重组质粒 pACP 和 p $ppc^*$ 。

### 1.2.5 基因敲除和启动子的替换

在 *E. coli* H0-0 等菌株中通过 CRISPR-Cas9 系统编辑 *ppc*、*iclR* 基因。以 Trc 启动子替换基因 *ppc* 的原有启动子, 敲除 *iclR* 基因。操作流程按照文献[19]所述。使用引物 pT $ppc$ -1 和 T-Trc-R, pT $iclR$ -1 和 pT $iclR$ -4 进行 PCR 验证, 根据产物条带长度挑取阳性菌落测序验证后获得相应的菌株。

## 2 结果与分析

### 2.1 柠檬酸循环的优化

L-高丝氨酸高产菌 *E. coli* H0-0 发酵过程中副产物积累情况如图 3 所示。其中乙酸和  $\alpha$ -酮戊二酸为主要的副产物, 乙酸积累 9.8 g/L,  $\alpha$ -酮戊二酸积累 4.0 g/L, 草酰乙酸积累 0.2 g/L。

为了减少乙酸的积累, 通过基因组启动子替换和质粒导入的方法过表达了 *ppc* 和 *pyc^\** 基因。如图 3 所示, 这两种基因编码的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶能分别将磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸催化为草酰乙酸, 促进柠檬酸循环

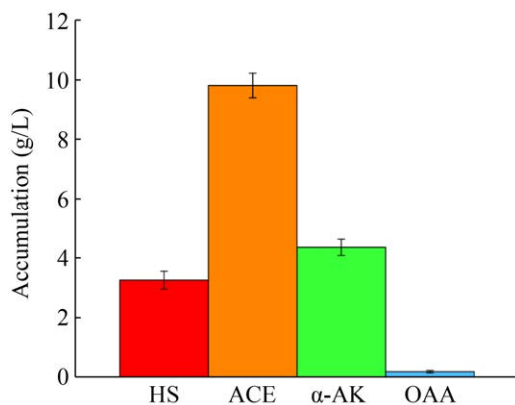


图 3 底盘菌株摇瓶发酵过程中高丝氨酸、乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、草酰乙酸的积累情况

Fig. 3 Production of L-homoserine (HS), acetic acid (ACE), and  $\alpha$ -ketoglutaric acid ( $\alpha$ -KG) by the chassis strain in shake flask fermentation at 48 h.

物质输入。在工程菌株中过表达 *ppc* 和 *pyc^\** 基因后进行 48 h 摇瓶发酵, 发酵结果如图 4 所示。

*ppc* 基因的过表达促进了柠檬酸循环的物质输入, 菌体量增加, 产量提高。随着磷酸烯醇式丙酮酸到草酰乙酸代谢通量的增加, 在一定程度上也缓解了乙酰辅酶 A 节点处的溢流代谢。菌株 *E. coli* H0-1 产量达到 5.5 g/L, 乙酸减少至 9.0 g/L, 草酰乙酸积累 2.9 g/L。

*pyc^\** 基因的质粒过表达能将部分丙酮酸转化为草酰乙酸, 促进产物的合成。丙酮酸到乙酰辅酶 A 的代谢通量也随之减少, 明显减少了乙酸的积累。在菌株 *E. coli* H0-2 中, 产量达到 4.4 g/L, 乙酸积累减少至 2.6 g/L, 草酰乙酸积累 1.0 g/L。

在菌株 *E. coli* H2-0 中, 将 *ppc* 和 *pyc^\** 基因进行了组合过表达。乙酸积累减少至 2.1 g/L, 产量提高至 5.9 g/L。 *ppc* 和 *pyc^\** 基因的作用产生了叠加, 但产量提高受到了限制。

### 2.2 强化产物的合成

为了将柠檬酸循环中积累的物质转化为产物, 对 *lysC^\** 和 *thrA^\** 基因进行了过表达以提高产物的合成速率。 *thrA^\** 编码抗反馈抑制的天冬氨酸激酶 III 和高丝氨酸脱氢酶 I 融合蛋白, *lysC^\** 编码

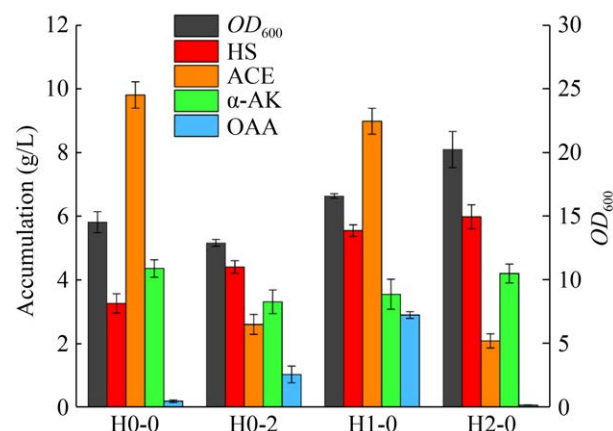


图 4 在菌株中过表达 *ppc* 和 *pyc^\** 后产物高丝氨酸及副产物乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、草酰乙酸的积累情况

Fig. 4 Production of L-homoserine and by-products when *ppc* and *pyc^\** were overexpressed.



抗反馈抑制的天冬氨酸激酶 I，这两种基因的过表达将促进产物合成。在 *ppyc\** 质粒上连接 *lysC\** 和 *thrA\** 基因获得质粒 pACP 后转入工程菌株进行 48 h 摇瓶发酵。发酵结果如图 5 所示。

在菌株 *E. coli* H0-0 和 *E. coli* H1-0 中分别导入 pACP 质粒后，产量都出现了明显的提高，乙酸、草酰乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸积累下降。比较菌株 *E. coli* H3-1 和 *E. coli* H3-0 可知，在过表达 *lysC\** 和 *thrA\** 基因时，柠檬酸循环物质输入量越大，产量提高越明显。

最终菌株 *E. coli* H3-0 经过发酵后产量提高至 8.6 g/L，乙酸积累降低至 1.4 g/L， $\alpha$ -酮戊二酸积累降低至 3.0 g/L。

### 2.3 强化乙醛酸循环

经过以上对柠檬酸循环和产物合成的改造产量获得了明显的提高，但副产物乙酸和  $\alpha$ -酮戊二酸仍未降低至理想浓度。所以将 *iclR* 基因敲除来强化乙醛酸循环，提高工程菌株对乙酰辅酶 A 的利用能力，同时减少流向  $\alpha$ -酮戊二酸的碳流。转录调节蛋白 ICLR 能抑制乙醛酸循环相关基因 *aceA*、*aceB*、*aceK*、*iclR* 的转录。其中异柠檬酸裂解酶 (ACEA) 可以将异柠檬酸裂解为乙醛酸

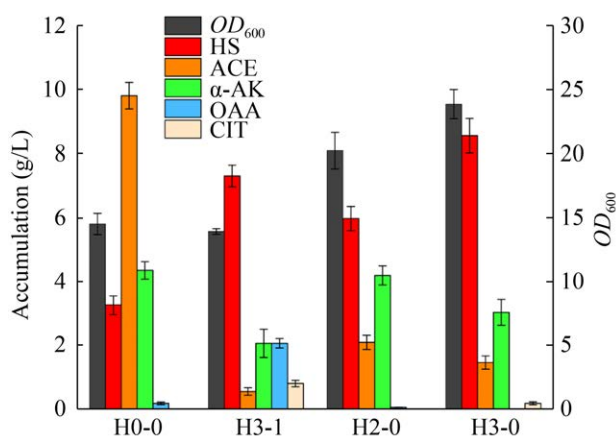


图 5 在菌株中组合过表达基因 *thrA\** 和 *lysC\** 后产物高丝氨酸与副产物乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸的积累情况

Fig. 5 Production of L-homoserine and by-products when *thrA\** and *lysC\** were overexpressed. CIT: citric acid.

和琥珀酸，苹果酸合成酶 (ACEB) 可以使用乙酰辅酶 A 合成苹果酸，异柠檬酸脱氢酶磷酸化酶 (ACEK) 能将异柠檬酸脱氢酶磷酸化使其失活。在工程菌株中敲除 *iclR* 基因后进行 48 h 摇瓶发酵，发酵结果如图 6 所示。

在菌株 *E. coli* H0-4 经过 48 h 发酵后产量和副产物未明显增加的情况下，菌体量达到了 43。这证明了乙醛酸循环也能增加柠檬酸循环的物质供给。在其他高产菌株中敲除 *iclR* 基因后，产量均获得了 16%–42% 的提高，乙酸积累低于 0.6 g/L。说明敲除 *iclR* 基因后，菌株能高效地将乙酰辅酶 A 用于苹果酸和琥珀酸的合成，随后参与到产物的合成中。但在 *iclR* 基因敲除的菌株中  $\alpha$ -酮戊二酸的积累却未出现明显的减少，只有菌株 *E. coli* H4-3 出现了明显的下降。据此猜测  $\alpha$ -酮戊二酸作为产物合成过程中关键的氨基载体，无法通过碳流调节实现减少。最终，在菌株 *E. coli* H4-0 中产量达到了 9.9 g/L，乙酸积累 0.6 g/L， $\alpha$ -酮戊二酸积累 3.2 g/L。

### 2.4 蔗糖发酵

碳源是发酵中的关键因素，蔗糖发酵有着更高的效率并且已经推广用于部分产品的发酵生产。Lu 等使用蔗糖发酵琥珀酸在副产物明显减少的同时产率达到 80% (g/g 蔗糖)<sup>[20]</sup>。菌株 FTR-SH

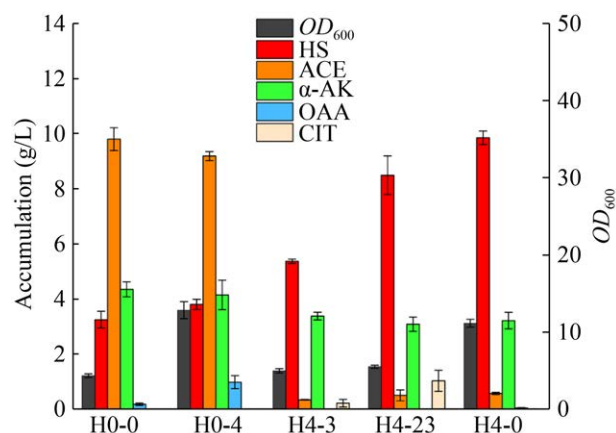


图 6 在菌株中敲除 *iclR* 基因后产物高丝氨酸与副产物乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、草酰乙酸和柠檬酸的积累情况

Fig. 6 Production of L-homoserine and by-products when *iclR* was knocked out.



使用蔗糖进行发酵生产 *O*-琥珀酰高丝氨酸达到了 65.5% (g/g 蔗糖) 的相对产率<sup>[4]</sup>。在优化了工程菌株的代谢路径后, 碳源摄入速率和菌株内外的发酵环境限制了产量的提高。所以参照 Ju 等的专利中所述的蔗糖利用改造思路构建了蔗糖代谢质粒 pSCR<sup>[18]</sup>。首先在底盘菌株中导入质粒 pSCR 分别进行了葡萄糖发酵和蔗糖发酵, 结果如图 7 所示。可以发现: 葡萄糖发酵时, 菌株 *E. coli* H0-5 产量和菌体量略低于菌株 *E. coli* H0-0。蔗糖发酵时, 菌株 *E. coli* H0-0 生长缓慢、产量低, 无法有效利用蔗糖。而菌株 *E. coli* H0-5 的产量达到了 5.0 g/L, 高于底盘菌株进行葡萄糖发酵时的产量。虽然蔗糖代谢基因的导入造成了一定的负担, 但总体来说蔗糖作为碳源进行发酵时更利于菌株的生长与产物的合成。

在工程菌株 *E. coli* H4-0 中转入质粒 pSCR 后进行 72 h 蔗糖发酵, 每 24 h 测定发酵液成分, 结果如图 8 所示。在发酵前期菌体生长较为缓慢, 但在中后期逐渐升高, 最终  $OD_{600}$  值达到了 40。在发酵的前中后期菌株主要积累的物质依次为柠檬

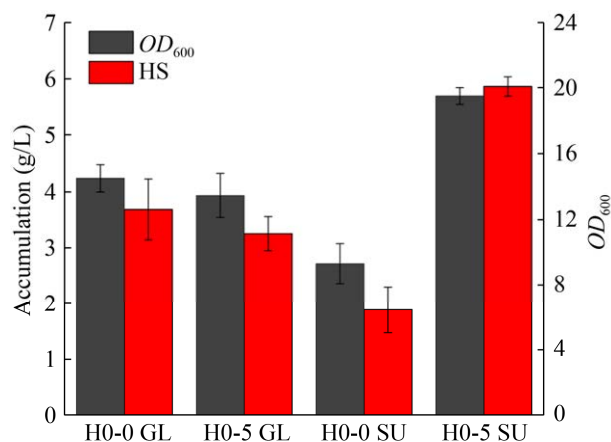


图 7 蔗糖代谢途径的导入对产量和菌体量的影响  
Fig. 7 Effect of introducing sucrose metabolic pathway on the production of L-homoserine and biomass. H0-0 GL: strain *E. coli* H0-0 fermented in glucose; H0-5 GL: *E. coli* H0-5 fermented in glucose; H0-0 SU: strain *E. coli* H0-0 fermented in sucrose; H0-5 SU: strain *E. coli* H0-5 fermented in sucrose.

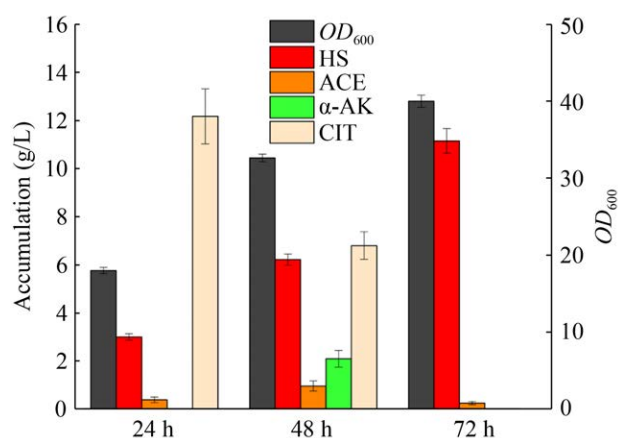


图 8 在蔗糖发酵的不同阶段产物高丝氨酸与副产物乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸的积累情况  
Fig. 8 Production of L-homoserine and by-products at different stages during sucrose fermentation.

酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、L-高丝氨酸。在前期蔗糖就已被高效地利用, 以柠檬酸的形式在发酵液中积累。在中后期随着菌体量的增加柠檬酸被用于产物的合成。发酵过程中未出现草酰乙酸积累。菌株 *E. coli* H5-0 经过 72 h 蔗糖发酵产量达到了 11.1 g/L。

### 3 讨论

碳源的利用和产物的合成是工程菌株在发酵过程中两个关键的环节, 两者之间的协调才能保证产物的积累。*ppc* 和 *pyc\** 基因的改造消除了乙酰辅酶 A 处的溢流代谢, 碳源可被顺利摄入。*thrA\** 和 *lysC\** 基因将柠檬酸循环中的草酰乙酸转化为产物。*iclR* 基因的敲除提高了菌株对酰辅酶 A 的利用能力。蔗糖代谢基因的导入则实现了碳源的高效摄入并改善了胞内的转录环境。这些改造都减少了副产物的积累, 逐步提高了产量。

蔗糖是一种来源广泛的碳源, 蔗糖代谢菌株的构建不仅进行了新的尝试, 也为资源利用提供了一种可行的路线。对于蔗糖发酵过程中表现出的高效性可以从以下两种角度来进行解释: (1) 蔗糖发酵的优势可能与转录调节蛋白 CRA 有关。CRA 蛋白可对大量基因进行转录调节, 这些基因涉及

碳代谢、能量代谢等<sup>[21-22]</sup>。而在代谢过程中由于蔗糖的水解和菌株的转运, 发酵液中会积累果糖。这些果糖代谢产生的果糖-1-磷酸会造成部分转录调节蛋白 CRA 失活, 菌株的代谢效率因此获得提高<sup>[22-24]</sup>。(2) 蔗糖发酵时由于蔗糖的自然水解, 发酵液中存在蔗糖、果糖、葡萄糖 3 种碳源。菌株可以通过对应的 PTS 系统对碳源进行摄入, 这提高了碳源摄入的效率。菌株在进行蔗糖代谢时所需的磷酸基团主要由磷酸烯醇式丙酮酸提供, 减少了从碳源摄入到丙酮酸代谢路径中 ATP 的消耗。

与葡萄糖发酵相比, 正因为存在这两种差异, 蔗糖发酵时细胞内磷酸烯醇式丙酮酸和  $\alpha$ -酮戊二酸的合成与消耗情况也发生了变化。在发酵前期胞内的磷酸烯醇式丙酮酸作为 PTS 系统的磷酸化供体被转化为丙酮酸。由于 *ppc* 和 *pyc\** 基因的过表达, 在磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸节点处不易发生溢流代谢。因此对碳源摄入的影响较小, 产生的丙酮酸也能被有效转化为草酰乙酸用于合成。这些变化有利于以丙酮酸为前体的氨基酸进行合成<sup>[23]</sup>。在蔗糖发酵过程中仅在 48 h 观察到  $\alpha$ -酮戊二酸积累, 与菌株转录环境的变化有着密切的联系。根据文献与 Biocyc 网站提供的数据, CRA 蛋白的部分失活将导致 *icd*、*sucA*、*sucB*、*lpd* 基因转录的变化, 最终减少了  $\alpha$ -酮戊二酸的合成量, 增加了消耗量。

在蔗糖发酵过程中菌株能更高效地将碳源用于菌体的增殖与产物的合成, 但在实验中过多的物质与能量被用于了细胞的增殖。若能平衡二者关系, 将实现产率的提高。

## REFERENCES

- [1] Bryant KI, Dilger RN, Parsons CM, et al. Dietary L-homoserine spares threonine in chicks. *J Nutr*, 2009, 139(7): 1298-1302.
- [2] Arezki NR, Williams AC, Cobb AJA, et al. Design, synthesis and characterization of linear unnatural amino acids for skin moisturization. *Int J Cosmet Sci*, 2017, 39(1): 72-82.
- [3] Armstrong MD. The Relationship between homoserine and its lactone. *J Am Chem Soc*, 1949, 71(10): 3399-3402.
- [4] Hong KK, Kim JH, Yoon JH, et al. *O*-succinyl-L-homoserine-based C4-chemical production: succinic acid, homoserine lactone,  $\gamma$ -butyrolactone,  $\gamma$ -butyrolactone derivatives, and 1,4-butanediol. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(10): 1517-1524.
- [5] Armstrong MD. The preparation of D- and L-homoserine. *J Am Chem Soc*, 1948, 70(5): 1756-1759.
- [6] Matsunosuke KA. DI-amino acid, canavanin, and a mono-amino acid, canalin. *J Biochem*, 1936, 25: 23-40.
- [7] Vähätalo ML, Virtanen AI, Marcker K, et al. Bound homoserine in fruits of cowberry and cranberry. *Acta Chem Scand*, 1957, 11: 747-748.
- [8] Plachý J, Ulbert S, Pelechová J, et al. Fermentation production of L-homoserine by *Corynebacterium* sp. and its possible use in the preparation of threonine and lysine. *Folia Microbiol*, 1985, 30(6): 485-492.
- [9] Li H, Wang BS, Zhu LH, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for L-homoserine production. *Proc Biochem*, 2016, 51(12): 1973-1983.
- [10] Yokota A, Ikeda M. Amino acid fermentation. Tokyo: Springer, 2017: 36-39.
- [11] Roe AJ, O'Byrne C, McLaggan D, et al. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 2002, 148(7): 2215-2222.
- [12] Izui K, Miwa T, Kajitani M, et al. Promoter analysis of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(1): 59-71.
- [13] Zhong WQ, Zhang Y, Wu WJ, et al. Metabolic Engineering of a homoserine-derived non-natural pathway for the *de novo* production of 1,3-propanediol from glucose. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(3): 587-595.
- [14] De Maeseneire SL, De Mey M, Vandedrinc S, et al. Metabolic characterisation of *E. coli* citrate synthase

- and phosphoenolpyruvate carboxylase mutants in aerobic cultures. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(23): 45-53.
- [15] Olajuyin MA, Yang MH, Thygesen A, et al. Effective production of succinic acid from coconut water (*Cocos nucifera*) by metabolically engineered *Escherichia coli* with overexpression of *Bacillus subtilis* pyruvate carboxylase. *Biotechnol Rep*, 2019, 24: e00378.
- [16] Wei L, Wang Q, Xu N, et al. Combining protein and metabolic engineering strategies for high-level production of *O*-acetylhomoserine in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(5): 1153-1167.
- [17] Ning YK, Wu XJ, Zhang CL, et al. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metabol Eng*, 2016, 36: 11-18.
- [18] Ju JY, Lee KH, Bae HA. Microorganism which produces L-amino acid and method for producing L-amino acid using the same: US, 8623620. 2010-02-16.
- [19] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 System. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [20] Lu CD, Xiong YY, Zhao JF, et al. Fermentation production of succinic acid from sucrose by engineered *Escherichia coli* JH208. *Adv Mater Res*, 2015, 1088: 503-506.
- [21] Ramseier TM, Bledig S, Michotey V, et al. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1995, 16(6): 1157-1169.
- [22] Son YJ, Phue J N, Trinh LB, et al. The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 52.
- [23] Lee JW, Choi S, Park JH, et al. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning  $\beta$ -fructofuranosidases and its application for L-threonine production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(4): 905-913.
- [24] Folly BB, Ortega AD, Hubmann G, et al. Assessment of the interaction between the flux-signaling metabolite fructose-1,6-bisphosphate and the bacterial transcription factors CggR and Cra. *Mol Microbiol*, 2018, 109(3): 278-290.

(本文责编 郝丽芳)