

• 工业生物技术 •

能量代谢工程促地衣芽胞杆菌 DW2 高效合成杆菌肽

张清¹, 朱杉¹, 崔乃香¹, 张博闻¹, 王志², 陈晓斌³, 刘军³, 李俊辉³, 蔡冬波¹,
杨之帆¹, 陈守文¹, 马昕¹

1 湖北大学 生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室 湖北省环境微生物工程技术研究中心, 湖北武汉 430062

2 湖北工业大学 生物工程与食品学院 发酵工程教育部重点实验室 工业微生物湖北省重点实验室, 湖北武汉 430068

3 绿康生化股份有限公司, 福建浦城 353400

张清, 朱杉, 崔乃香, 等. 能量代谢工程促地衣芽胞杆菌 DW2 高效合成杆菌肽. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1126–1137.

Zhang Q, Zhu S, Cui NX, et al. Enhanced production of bacitracin via energy metabolism engineering in *Bacillus licheniformis* DW2. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1126–1137.

摘要: 杆菌肽是一种主要由芽胞杆菌产生的广谱性环肽类抗生素, 目前广泛应用于兽药领域。能量代谢在微生物高效合成目的代谢产物中具有重要作用。文中以杆菌肽工业生产菌株地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* DW2 为出发菌株, 首先构建了呼吸链分支途径细胞色素 *bd* 泛醇氧化酶基因 *cydB* 缺失菌株, 发现 *cydB* 缺失后杆菌肽效价和胞内 ATP 浓度相比于对照菌株分别提高了 10.97% 和 22.96%。接着, 证实了强化表达另外一条呼吸链分支途径——细胞色素 *aa₃* 氧化酶基因 *qoxA* 能够提高杆菌肽合成水平, 其杆菌肽效价和胞内 ATP 浓度相比于对照菌株分别提高了 18.27% 和 34.00%。强化 ADP 合成供给也是促进胞内 ATP 积累的有效策略, 结果表明强化表达腺苷激酶 DcK 和腺苷酸激酶 AdK 均可以提高杆菌肽效价和胞内 ATP 浓度, 其中强化表达 DcK 效果较好, 其杆菌肽效价相比对照提高 16.78%。最后, 通过组合代谢工程育种, 在基因 *cydB* 缺失菌 DW2Δ*cydB* 基础上整合表达了 *qoxA* 和 *dck*, 得到工程菌株 DW2-CQD (DW2Δ*cydB*::*qoxA*::*dck*), 发酵结果表明, DW2-CQD 杆菌肽效价达到 954.25 U/mL, 相比于对照菌株提高了 21.66%, 单位菌体杆菌肽效价为 2.11 U/CFU, 相比对照提高了 11.05%。此外, DW2-CQD 胞内 ATP 浓度为 39.54 nmol/L, 相比于对照提高了 49.32%。结果证实能量代谢工程是提高杆菌肽发酵水平的有效策略, 提供了一株具有工业化应用前景的杆菌肽生产菌株。

关键词: 地衣芽胞杆菌, 杆菌肽, ATP 供给, 代谢工程

Received: October 14, 2019; **Accepted:** November 20, 2019

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900300).

Corresponding author: Xin Ma. E-mail: maxin@hubu.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900300) 资助。

Enhanced production of bacitracin via energy metabolism engineering in *Bacillus licheniformis* DW2

Qing Zhang¹, Shan Zhu¹, Naixiang Cui¹, Bowen Zhang¹, Zhi Wang², Xiaobin Chen³, Jun Liu³, Junhui Li³, Dongbo Cai¹, Zhifan Yang¹, Shouwen Chen¹, and Xin Ma¹

¹ Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

² Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

³ Lifecome Biochemistry Co. Ltd, Pucheng 353400, Fujian, China

Abstract: Bacitracin is a broad-spectrum cyclic peptide antibiotic, and mainly produced by *Bacillus*. Energy metabolism plays as a critical role in high-level production of target metabolites. In this study, *Bacillus licheniformis* DW2, an industrial strain for bacitracin production, was served as the original strain. First, our results confirmed that elimination of cytochrome *bd* oxidase branch via deleting gene *cydB* benefited bacitracin synthesis. Bacitracin titer and ATP content were increased by 10.97% and 22.96%, compared with those of original strain, respectively. Then, strengthening cytochrome *aa₃* oxidase branch via overexpressing gene *qoxA* was conducive to bacitracin production. Bacitracin titer and ATP content were increased by 18.97% and 34.00%, respectively. In addition, strengthening ADP synthesis supply is also proven as an effective strategy to promote intracellular ATP accumulation, overexpression of adenosine kinase DcK and adenylate kinase AdK could all improve bacitracin titers, among which, *dck* overexpression strain showed the better performance, and bacitracin titer was increased by 16.78%. Based on the above individual methods, a method of combining the deletion of gene *cydB* and overexpression of genes *qoxA*, *dck* were used to enhance ATP content of cells to 39.54 nmol/L, increased by 49.32% compared to original strain, and bacitracin titer produced by the final strain DW2-CQD (DW2Δ*cydB*::*qoxA*::*dck*) was 954.25 U/mL, increased by 21.66%. The bacitracin titer produced per cell was 2.11 U/CFU, increased by 11.05%. Collectively, this study demonstrates that improving ATP content was an efficient strategy to improve bacitracin production, and a promising strain *B. licheniformis* DW2-CQD was attained for industrial production of bacitracin.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, bacitracin, ATP supply, metabolic engineering

杆菌肽是一种由 12 个氨基酸组成的环肽类广谱型抗生素, 主要由地衣芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌产生^[1-2], 其组成氨基酸包含 Orn、D-Phe、His、D-Asp、Asn、Lys、D-Glu、Cys、Leu、Ile 和 Val 共 11 种^[1-4]。杆菌肽是由多种组分组成的混合物^[3], 包括杆菌肽 A、A1、B1、B2、B3、C、D……G 等, 其中 A、B1、B2 组分的生物活性约占其总生物活性的 95% 以上。杆菌肽由 7 个氨基酸组成的噁唑环组成, 这种独特的氨基酸结构使得其不易被蛋白酶降解, 且常以杆菌肽锌盐形式存在, 因而在自然界中稳定性较强^[1]。杆菌肽络合物可以与细菌细胞壁上的异戊烯焦磷酸结合^[5], 进而有效抑制细胞壁合成, 因此对革兰氏阳性菌和

部分革兰氏阴性菌具有显著抑制效果^[5-6], 现已广泛应用于兽药领域^[7-8]。目前, 杆菌肽生产水平较低, 摇瓶水平一般为 700–800 U/mL, 限制了杆菌肽的生产及应用推广。

与常规蛋白质合成机制不同, 杆菌肽是由非核糖体肽合成酶催化合成^[9-11]。杆菌肽合成的前体氨基酸会与腺嘌呤核苷三磷酸 (Adenosine triphosphate, ATP) 结合, 由该酶的 A 结构域催化生成活性氨酰-AMP, 进而生成杆菌肽。此外, ATP 是细胞代谢通用的能量载体, 在促进细胞生长、代谢产物合成、维持细胞内环境稳定、酶活性调节等多方面发挥着不可或缺的作用^[12-13]。目前, 能量代谢工程育种也得到人们的广泛关注。

通过强化来源于透明颤菌的血红蛋白 Vhb, 人们显著提高了芽胞杆菌中聚- γ 谷氨酸^[14]、透明质酸^[15]等产物的合成水平。鉴于芽胞杆菌高的维持代谢能^[16], 优化细胞呼吸链分支途径也有利于细胞维持代谢能的降低, 进而有利于目的产物的合成。Nicola 等^[16]通过敲除枯草芽胞杆菌 RB50 中呼吸链终端细胞色素 *bd* 氧化酶, 将维持代谢能降低了 40%, 进而提高了菌体生物量和核黄素产量。采用同样策略, Liu 等^[17]和 Cai 等^[18]分别显著提高了芽胞杆菌中 N-乙酰葡萄糖胺和聚- γ 谷氨酸产量。Zhao 等^[19]通过优化终端氧化酶表达水平, 使得大肠杆菌中 β -胡萝卜素产量提升 21%。

地衣芽胞杆菌 DW2 是一株杆菌肽工业生产菌株。之前的研究中, 本课题组通过强化底物利用^[15]、前体氨基酸 (鸟氨酸、赖氨酸、支链氨基酸等) 供给^[20]、辅因子再生^[12]等显著提高了杆菌肽产量, 但对于能量供给水平与杆菌肽合成的关系尚不明晰。本研究拟通过优化细胞呼吸链分支途径、强化 ATP 合成途径等能量代谢工程育种策略获得杆菌肽高产地衣芽胞杆菌工程菌株, 进而提高杆菌肽生产水平。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究出发菌株为杆菌肽工业生产菌株地衣芽胞杆菌 DW2, 其由绿康生化股份有限公司提供, 菌株保藏号为 CCTCC M2011344。本研究所用菌株和质粒见表 1。相关引物见表 2。

1.2 培养基

LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L, pH 为 7.0–7.2。

LB 固体培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L、琼脂 18 g/L, pH 为 7.0–7.2。

杆菌肽发酵培养基: 玉米淀粉 45 g/L、轻钙

6 g/L、硫酸铵 1 g/L、豆粕 100 g/L, 自然 pH。

1.3 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、dNTPs 购自北京全式金生物科技有限公司; DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒小提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒购自 Omega Bio-tek 公司; ATP 检测试剂盒购置于碧云天生物技术有限公司; 引物合成及序列测定均由北京擎科新业生物技术有限公司完成; 蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖购自 Spanish 公司; α -淀粉酶、抗生素 (Amp、Kan、Tet) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 豆粕、玉米淀粉、轻钙来源于绿康生化股份有限公司; 其他普通试剂 (国产分析纯) 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 地衣芽胞杆菌工程菌株构建

1.4.1 地衣芽胞杆菌游离表达菌株构建

地衣芽胞杆菌游离表达菌株 DW2/pHY-qoxA、DW2/pHY-adk 和 DW2/pHY-dck 的构建方法, 以 DW2/pHY-qoxA 为例。首先, 以枯草芽胞杆菌 168 基因组为模板, 使用引物 pHY-qoxA-1 和 pHY-qoxA-2, 扩增出 P43 强启动子。以地衣芽胞杆菌 DW2 为模板, 使用 pHY-qoxA-3/4 和 pHY-qoxA-5/6 分别扩增出 *qoxA* 基因和 *amyL* 终止子。重叠延伸 PCR 连接启动子、*qoxA* 基因和终止子 (pHY-dck-1/6)。随后, 用限制性内切酶 *Bam*H I/*Xba* I 酶切片段与质粒 pHY300PLK, 经酶连后转化大肠杆菌, 得到游离表达载体 pHY-qoxA。随后, pHY-qoxA 经电转化至地衣芽胞杆菌 DW2 中, 筛选得到的阳性转化子, 即为游离表达菌株 DW2/pHY-qoxA。采用同样的方法, 构建获得游离表达菌株 DW2/pHY-dck 和 DW2/pHY-adk。

1.4.2 地衣芽胞杆菌基因敲除菌株构建

地衣芽胞杆菌基因敲除菌株的构建方法, 以

cydB 缺失的地衣芽胞杆菌 DW2 Δ *cydB* 构建为例。以地衣芽胞杆菌 DW2 为模板, 使用引物 *cydB*-KF1/KR1 和 *cydB*-KF2/KR2 分别扩增 *cydB* 基因的上游和下游同源臂。重叠延伸 PCR 连接上下游同源臂。随后, 采用内切酶 *Sac* I/*Xba* I 酶切穿梭载体 T2(2)-Ori 和上下游同源臂片段, 经酶连、转化大肠杆菌, 验证并获得敲除载体 T2- Δ *cydB*。将该载体电转化至地衣芽胞杆菌 DW2 中, 经单-双交换, 验证并获得阳性转化子, 得到地衣芽胞杆菌 *cydB* 基因缺失菌株 DW2 Δ *cydB*。

1.4.3 地衣芽胞杆菌基因整合表达菌株构建

地衣芽胞杆菌基因整合表达菌株的构建方法可参照基因缺失菌株构建流程: 以基因 *qoxA* 整合表达菌株构建为例, 先以地衣芽胞杆菌 DW2 为模板, 分别扩增出整合载体的上下游同源臂以及 *qoxA* 基因表达盒。重叠延伸 PCR 连接上述 3 个片段, 后经过酶切、酶连构成整合表达载体 T2-::*qoxA*。随后, 将整合表达载体 T2-::*qoxA* 电转至地衣芽胞杆菌中, 经过单双交换, 验证并获得地衣芽胞杆菌 *qoxA* 基因整合表达菌株。

表 1 本研究所用的菌株与质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source/reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r</i> _K ⁻ , <i>m</i> _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TaKaRa Co., Ltd
<i>B. licheniformis</i> DW2	Bacitracin industrial production strain (CCTCC M2011344)	CCTCC
DW2 Δ <i>cydB</i>	Knockout of gene <i>cydB</i> in DW2	This study
DW2 Δ <i>qoxA</i>	Knockout of gene <i>qoxA</i> in DW2	This study
DW2/pHY300	DW2 containing plasmid pHY300PLK	This study
DW2/pHY- <i>qoxA</i>	DW2 containing plasmid pHY- <i>qoxA</i>	This study
DW2/pHY- <i>dck</i>	DW2 containing plasmid pHY- <i>dck</i>	This study
DW2/pHY- <i>adk</i>	DW2 containing plasmid pHY- <i>adk</i>	This study
DW2-CQ	<i>qoxA</i> integrated overexpression in DW2 Δ <i>cydB</i>	This study
DW2-CQD	<i>dck</i> integrated overexpression in DW2-CQ	This study
Plasmids		
pHY300PLK	<i>E. coli</i> - <i>Bacillus</i> shuttle vector; Amp ^r in <i>E. coli</i> , Te ^r in both <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i>	Lab collection
pHY- <i>qoxA</i>	Plasmid pHY300PLK containing P43 promoter, gene <i>qoxA</i> and <i>amyL</i> terminator	This study
pHY- <i>dck</i>	Plasmid pHY300PLK containing P43 promoter, gene <i>dck</i> and <i>amyL</i> terminator	This study
pHY- <i>adk</i>	Plasmid pHY300PLK containing P43 promoter, gene <i>adk</i> and <i>amyL</i> terminator	This study
T ₂ (2)-ori	<i>E. coli</i> - <i>B. licheniformis</i> shuttle vector, for gene knockout	Lab collection
T ₂ - <i>cydB</i>	T ₂ (2)-ori derivative containing homologous arms for disruption of <i>cydB</i>	This study
T ₂ - <i>qoxA</i>	T ₂ (2)-ori derivative containing homologous arms for disruption of <i>qoxA</i>	This study
T ₂ -:: <i>dck</i>	T ₂ (2)-ori derivative containing homologous arms and <i>dck</i> expression cluster, to overexpress <i>dck</i>	This study
T ₂ -:: <i>qoxA</i>	T ₂ (2)-ori derivative containing homologous arms and <i>qoxA</i> expression cluster, to overexpress <i>qoxA</i>	This study

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 The primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
pHY-F	GTTTATTATCCATACCCTTAC
pHY-R	CAGATTTTCGTGATGCTTGTC
T ₂ -L	ATGTGATAACTCGGCGTA
T ₂ -R	GCAAGCAGCAGATTACGC
cydB-KF1	GGCGAGCTCCACTGCAAAAGCAATATGAAG
cydB-KR1	GCTGACCCGTTTTCTAAAAGAAAGAAAAACCGATGAACAGC
cydB-KF2	GCTGTTTCATCGGTTTTTTCTTTCTTTTAGAAAACGGGTCAGC
cydB-KR2	GCTCTAGACATAAAAGTGATTAATAATCGGC
cydB-KYF	TCTGATGAAGAGCCAGCCGATGA
cydB-KYR	TTCTTAGTATGTGAACGGCTG
qoxA-KF1	CGGGATCCAAGCACATCCGAACGGCTATCA
qoxA-KR1	CGGAGACAACGGTTTATAGCCCAGCCGCCAATAAAAAAACG
qoxA-KF2	CGTTTTTTTTATTGGGCGGCTGGGCTATAAACCGTTGTCTCCG
qoxA-KR2	GCTCTAGAATCCGCCGATGACGAATGAAAT
qoxA-KYF	ATACAATCTCGGAAACGGAAC
qoxA-KYR	CAGCGTTGTCCAAGTGAACAT
pHY-qoxA-1	GCTCTAGAGCGGAATTTCCAATTTTCATG
pHY-qoxA-2	TAAATGCTCTGAACAAGAGGATCACGTGTACATTCCTCTC
pHY-qoxA-3	GAGAGGAATGTACACGTGATCCTCTTGTTTCAGAGCATTTA
pHY-qoxA-4	AAATCCGTCCTCTCTGCTCTTCTAGTGAGAATCTTGGTCTTCAGA
pHY-qoxA-5	TCTGAAGACCAAGATTCTCACTAGAAGAGCAGAGAGGACGGATTT
pHY-qoxA-6	CGGGATCCGATCACCCGCGATACCGTC
pHY-dck-1	GCTCTAGAGCGGAATTTCCAATTTTCATG
pHY-dck-2	CTTTCGGAATAGCATATACACTCATGTGTACATTCCTCTC
pHY-dck-3	GAGAGGAATGTACACATGAGTGTATATGCTATTCCGAAAG
pHY-dck-4	AAATCCGTCCTCTCTGCTCTTTTATCTTTGAATAGCTTCACTG
pHY-dck-5	CAGTGAAGCTATTCAAAGATAAAAAGAGCAGAGAGGACGGATTT
pHY-dck-6	CGGGATCCGATCACCCGCGATACCGTC
pHY-adk-1	GCTCTAGAGCGGAATTTCCAATTTTCATG
pHY-adk-2	GTCCCATTAAGACTAAGTTCATTTTCATGTGTACATTCCTCTC
pHY-adk-3	GAGAGGAATGTACACATGAAATGAACTTAGTCTTAATGGGAC
pHY-adk-4	GTCCGTCCTCTCTGCTCTTTTCAATTTGTCCCGGCTCCGA
pHY-adk-5	TCGGAGGCCGGGACAAATGAAAGAGCAGAGAGGACGGAC
pHY-adk-6	CGGGATCCGATCACCCGCGATACCGTC
T2-dck-1	CGGGATCCCGTGATAGGTGGTATGTTTTTCG
T2-dck-2	CTTTCGGAATAGCATATACACTCATGTGTACATTCCTCTC
T2-dck-3	GAGAGGAATGTACACATGAGTGTATATGCTATTCCGAAAG
T2-dck-4	AAATCCGTCCTCTCTGCTCTTCTAGTGAGAATCTTGGTCTTCAGA
T2-dck-5	CAGTGAAGCTATTCAAAGATAAAAAGAGCAGAGAGGACGGATTT
T2-dck-6	GCTCTAGAGCCGCAATAATGCCGTCGCACTGGC
T2-dck-KYF	AGCTTCAATGATACCCAAGCAGC
T2-dck-KYR	GCCTTGCTGAAATACATATA
T2-qoxA-1	GGACTAGTCC TGATAGGTGGTATGTTTTTCG
T2-qoxA-2	TAAATGCTCTGAACAAGAGGATCACGTGTACATTCCTCTC
T2-qoxA-3	GAGAGGAATGTACACGTGATCCTCTTGTTTCAGAGCATTTA
T2-qoxA-4	AAATCCGTCCTCTCTGCTCTTCTAGTGAGAATCTTGGTCTTCAGA
T2-qoxA-5	TCTGAAGACCAAGATTCTCACTAGAAGAGCAGAGAGGACGGATTT
T2-qoxA-6	GAAGATCTTCCGCAATAATGCCGTCGCACTGGC
T2-qoxA-KYF	GAGATTATTCGTAAAGCCGAGATG
T2-qoxA-KYR	CTGTCTCCCGTGTCTTTACCCG

1.5 杆菌肽发酵

种子培养：将保存于超低温冰箱中的菌株稀释涂布于带有相应抗性的固体 LB 平板上，37 °C 培养 12 h，随后挑取单菌落重新活化于相应抗性平板上。挑取平板上长好的单菌落接种于含 5 mL 液体 LB 培养基的 PA 瓶中，230 r/min、37 °C 条件下培养 12 h。再以 5% 接种量转接到含 20 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 三角瓶中，230 r/min、37 °C 条件下培养 6–7 h 后转接至发酵培养基中。

摇瓶发酵培养：种子液以 5% 接种量接至含 20 mL 杆菌肽发酵培养基的 250 mL 三角瓶中，230 r/min、37 °C 条件下培养 48 h。随后，测定发酵液 pH，pH 到 8.0 时即到发酵终点。发酵中每个菌株均设置 3 个平行。

1.6 分析方法

地衣芽胞杆菌生物量采用稀释涂布法测定。杆菌肽效价检测采用安捷伦 1260 液相色谱仪完成，色谱柱型号：Eclipse Plus C18 column (4.6 mm×250 mm, 3.5 μm)，流动相甲醇：乙腈：盐相为 60.4：4.6：35，进样体积为 20 μL；流速为 1 mL/min；柱温为 30 °C；紫外检测器波长为 254 nm。胞内 ATP 浓度使用 ATP 检测试剂盒测定，ATP 检测的取样点为 24 h。

杆菌肽合成对数期 (30 h) 的氨基酸浓度使用安捷伦 7890A 气相色谱仪测定。对于胞外氨基酸检测的预处理：吸取 2 mL 发酵液于离心管中，12 000 r/min、4 °C 离心 10 min，上清液过膜备用。对于胞内氨基酸检测的预处理：吸取 15 mL 发酵液于离心管中，1 500 r/min、4 °C 离心 10 min。吸取 8 mL 上清液与 10 mL 预冷 2.5% (W/V) 氯化钠迅速混匀，10 000 r/min、4 °C 离心 5 min，弃上清；沉淀用 10 mL 预冷 2.5% (W/V) 碳酸铵溶液洗涤 2 次，最后用 3 mL 预冷 80% (V/V) 甲醇溶液抽提 5 min，上清液冻干后加蒸馏水溶解备用。

衍生化处理：取 500 μL 样品，加入 10 μL 的 7 mol/L 氢氧化钠溶液和 500 μL 无水乙醇与吡啶

混合液 (体积比 4：1)，振荡混匀。加入 100 μL 氯甲酸乙酯后，超声 1 min，重复该操作一次；加入 500 μL 含 1% ECF 的氯仿溶液以及 200 μL 饱和碳酸氢钠溶液，振荡 1 min 后加入 40 μL 1% 乙酸苯乙酯。混合物静置 5 min，随后 3 000 r/min 离心 5 min，将下层溶液转移到含 0.1 g 硫酸钠的 EP 管中。3 000 r/min 离心 5 min，取上清溶液转移到气相瓶中。

气相色谱检测：色谱柱型号 Agilent HP-5 column (30 m×0.32 mm×0.25 μm)，检测器温度为 280 °C，进样体积 1 μL，气体流速为 1.5 mL/min。空气、氢气、氮气流速分别为 300 mL/min、30 mL/min、30 mL/min。

1.7 统计分析

所有的实验均至少重复 3 次，每次 3 个平行。采用 Origin 8.5 和 SPSS 18.0 进行数据处理和分析 (其中，*表示差异显著 ($P<0.05$)，**表示差异极显著 ($P<0.01$))。

2 结果与分析

2.1 基因 *cydB* 缺失对杆菌肽合成的影响

之前研究报道指出，枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌中均含有 4 种呼吸链末端氧化酶，分别为细胞色素 *caa₃* 氧化酶 (*ctaCDEF* 编码)、细胞色素 *bd* 氧化酶 (*cydABCD* 编码)、细胞色素 *aa₃* 氧化酶 (*qoxABCD* 编码)、YthAB 氧化酶 (*ythAB* 编码)^[16-17]。其中细胞色素 *bd* 氧化酶较为特殊，该酶不含有转运质子的跨膜通道，每转运 1 个电子仅能向外转移 1 个质子， H^+/e^- 为 1^[21-22]。因此，这条分支途径通常被认为是能耗比较高的途径 (图 1)。本研究中，我们通过构建 *cydB* 基因敲除载体，得到了 *cydB* 基因缺失菌株 DW2Δ*cydB*。随后，将 DW2 和 DW2Δ*cydB* 分别接种于 LB 培养基中，通过检测二者生长曲线发现，*cydB* 缺失后细胞生长速率快于野生菌 (图 2A)。结合之前的文献报道，说明 *cydB* 缺失降低了菌体维持代谢能，有利于菌体生长。

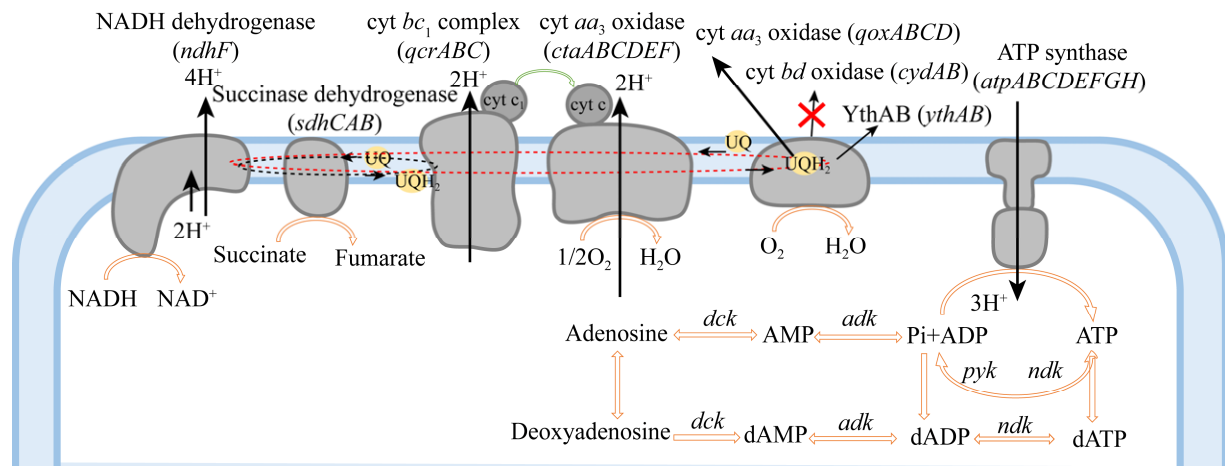


图1 地衣芽胞杆菌 DW2 呼吸电子传递链

Fig. 1 Respiratory electron transport chain of *Bacillus licheniformis* DW2.

随后, 将 DW2 和 DW2 Δ cydB 分别接种于杆菌肽发酵培养基中。分别检测其最高生物量、杆菌肽效价和胞内 ATP 浓度。由图 2B 可知, DW2 最大生物量 (24 h) 为 413.54×10^8 CFU/mL, *cydB* 缺失菌株生物量为 431.35×10^8 CFU/mL, 提高了 4.31%。*cydB* 缺失有利于杆菌肽合成, 其杆菌肽最高效价 (48 h) 提高了 10.97%。DW2 Δ cydB 单位菌体杆菌肽效价为 2.02×10^{-8} U/CFU, 相比于对照菌株 (1.90×10^{-8} U/CFU) 提高了 6.87%。此外, 通过对二者胞内 ATP 含量 (24 h) 检测发现, DW2 Δ cydB 中胞内 ATP 浓度达到 32.56 nmol/L, 相比于对照菌株 (26.48 nmol/L) 提高了 22.96% (图 2C)。由此可见, 缺失 *cydB* 可以提高胞内 ATP 供给水平, 进而有利于杆菌肽高产。

2.2 强化表达 *qoxA* 基因对杆菌肽合成影响

之前的研究中, 人们指出细胞色素 *bd* 氧化酶和 *aa₃* 氧化酶是芽胞杆菌中主要的两条呼吸链分支途径。人们之前已证实细胞色素 *bd* 氧化酶途径是能耗比较高的途径, 并通过缺失 *cydB* 提高了相关代谢产物的合成水平^[16-17,21]。然而, 细胞色素 *aa₃* 氧化酶与代谢产物合成的关系并未有人研究。本研究中, 我们分别构建了 *qoxA* 缺失及强化表达菌株 DW2 Δ qoxA 和 DW2/pHY-qoxA。

如图 3A 所示, 缺失 *qoxA* 基因后, 细胞生物量有所降低, 相比于对照菌株下降了 11.46%。而强化表达 *qoxA* 则能够显著提高菌体生长水平。随后, 将上述 4 种菌分别接种于杆菌肽发酵培养基中, 摇瓶发酵结果表明, *qoxA* 缺失菌株杆菌肽最高效价 (48 h) 为 693.24 U/mL, 相比于对照降低了 11.61%, 强化表达 *qoxA* 有利于杆菌肽合成, 其杆菌肽效价相比于对照提高了 18.27%, 单位菌体杆菌肽效价提高了 11.13%。此外, 通过对胞内 ATP 含量检测发现, *qoxA* 强化表达菌株的 ATP 浓度 (24 h) 达到 27.67 nmol/L, 相比于对照菌株 DW2/pHY300 (20.65 nmol/L) 提高了 34.00% (图 3)。综上, 细胞色素 *aa₃* 氧化酶在地衣芽胞杆菌呼吸链代谢中发挥着重要作用, 强化表达 *qoxA* 有利于 ATP 供给和杆菌肽合成。

2.3 强化表达 *dck* 基因提高杆菌肽合成水平

ADP 供给水平对于胞内 ATP 积累及代谢产物合成意义重大。为提高 ADP 合成水平进而提高胞内 ATP 浓度, 我们通过构建腺苷激酶 DcK、腺苷酸激酶 AdK 游离表达载体, 分别构建了 *dck* 和 *adk* 过表达菌株 DW2/pHY-dck 和 DW2/pHY-adk (图 1)。发酵结果表明, 过表达 *dck* 和 *adk* 均可以增强细胞内 ATP 供给水平, 同时杆菌肽效价相比

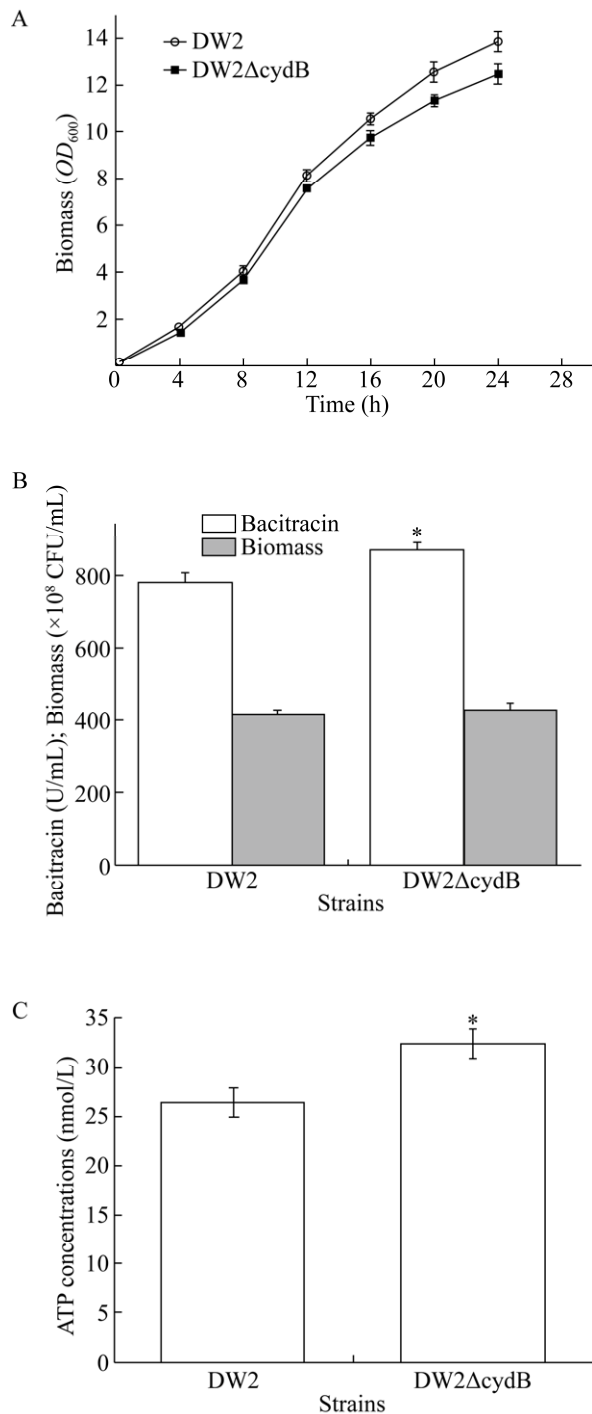


图2 *cydB* 缺失对细胞生长、杆菌肽效价及胞内 ATP 含量的影响

Fig. 2 Effects of deleting *cydB* on cell growth, bacitracin titer and intracellular ATP contents. (A) The growth curves in LB medium. (B) Bacitracin titers and biomass. (C) The intracellular ATP contents at 24 h. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

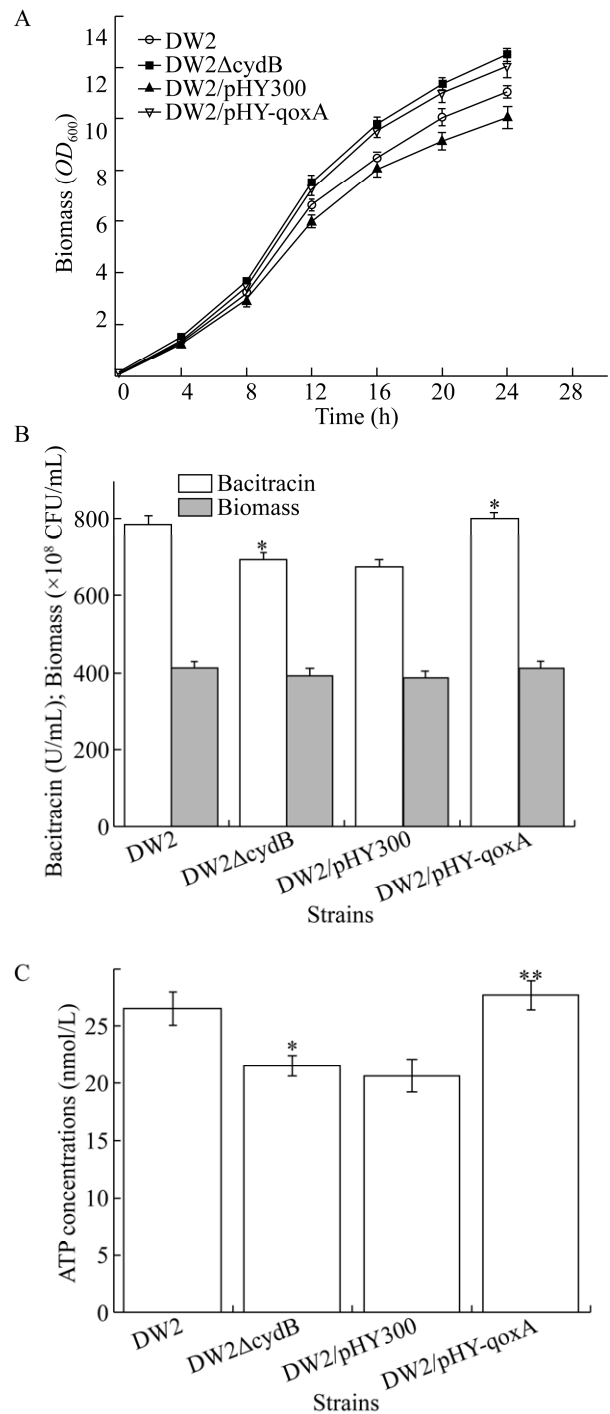


图3 缺失/强化表达 *qoxA* 对细胞生长、杆菌肽效价及胞内 ATP 浓度的影响

Fig. 3 Effects of deleting or overexpressing *qoxA* on cell growth, bacitracin titer and intracellular ATP content. (A) The growth curves in LB medium. (B) Bacitracin titers and biomass. (C) ATP contents at 24 h. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

于对照菌株也有一定提升, 其中强化表达 *dck* 的效果较好, 其杆菌肽效价相比于对照菌株提高了 16.78%, 单位菌体杆菌肽合成水平提高了 12.48% (图 4)。

2.4 组合代谢工程育种构建杆菌肽高产菌株

为进一步提高杆菌肽合成水平, 在明确单基因工程菌株发酵效果的基础上, 我们通过组合代谢工程育种, 进一步构建杆菌肽高产地衣芽胞杆菌工程菌株。首先, 通过构建 *qoxA* 基因整合表达载体, 在 DW2 Δ cydB 中成功整合表达了 *qoxA*, 得到工程菌株 DW2-CQ (DW2 Δ cydB::*qoxA*)。发酵结果表明, DW2-CQ 杆菌肽效价 (48 h) 达到 904.35 U/mL, 相比于对照菌株 DW2 和 DW2 Δ cydB 分别提高了 15.30% 和 3.96%, 胞内 ATP 含量

(24 h) 分别提高了 33.80% 和 8.81%。随后, 在 DW2-CQ 基础上进一步整合表达了 *dck*, 得到工程菌株 DW2-CQD (DW2 Δ cydB::*qoxA*::*dck*)。DW2-CQD 杆菌肽效价达到 954.25 U/mL, 相比于 DW2 提高了 21.66%, DW2-CQD 单位菌体杆菌肽效价达到 2.11 U/CFU, 相比于对照 (1.90 U/CFU) 提高了 11.05%。DW2-CQD 最高生物量为 451.53×10^8 CFU/mL, 相比于 DW2 提高了 9.19%, DW2-CQD 最高 ATP 浓度为 39.54 nmol/L, 相比于 DW2 提高了 49.32% (表 3)。

随后, 我们进一步检测了菌株 DW2 和 DW2-CQD 的杆菌肽合成曲线。由图 5 可知, DW2-CQD 的杆菌肽效价在整个发酵过程中均高于对照菌株, 最高值相对对照提高了 21.66%。

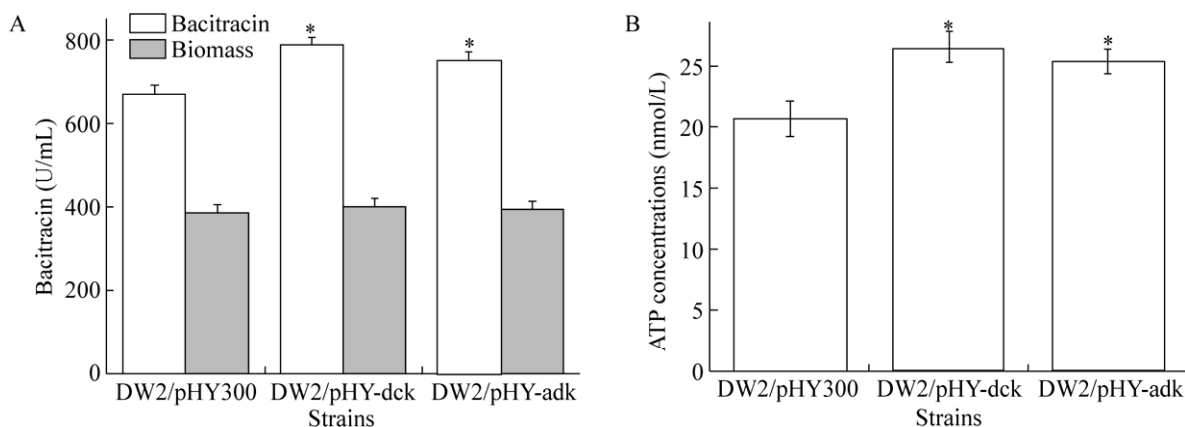


图 4 强化 ATP 合成途径对生物量、杆菌肽效价、胞内 ATP 浓度的影响

Fig. 4 Effects of enhancing ATP supply on biomass, bacitracin titer and intracellular ATP content. (A) Bacitracin titers and biomass. (B) ATP contents. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表 3 工程菌株的杆菌肽效价、单位菌体杆菌肽效价、生物量和 ATP 浓度

Table 3 Bacitracin titers, bacitracin titers of per cell, biomass and ATP contents of recombinant strains

Strains	Bacitracin titers (U/mL)	Bacitracin titers of per cell (U/CFU)	Biomass (10^8 CFU/mL)	ATP contents (nmol/L)
DW2	784.34 \pm 23.43	1.90 \pm 0.02	413.54 \pm 15.43	26.48 \pm 1.43
DW2 Δ cydB	874.35 \pm 18.76	2.02 \pm 0.03	431.35 \pm 16.53	32.56 \pm 1.52
DW2-BQ	904.35 \pm 21.54	2.05 \pm 0.02	441.54 \pm 18.54	35.43 \pm 1.74
DW2-BQD	954.25 \pm 22.25	2.11 \pm 0.02	451.53 \pm 19.34	39.54 \pm 0.56

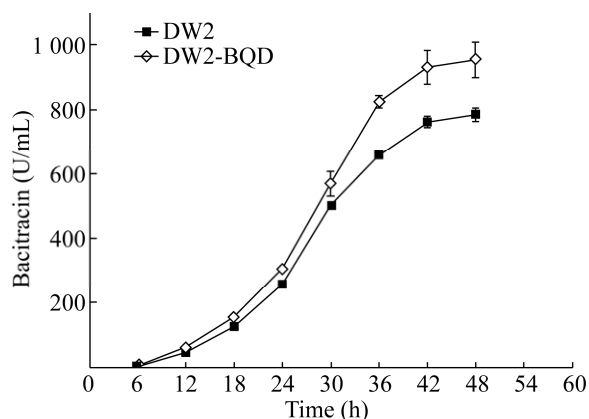


图 5 DW2 和 DW2-CQD 的杆菌肽合成曲线
Fig. 5 The bacitracin synthesis curves of DW2 and DW2-CQD.

紧接着,我们检测了菌株 DW2 和 DW2-CQD 在杆菌肽合成对数期 (30 h) 的胞内外前体氨基酸浓度。如图 6 所示,强化 ATP 供给有利于杆菌肽合成,因此杆菌肽前体氨基酸如异亮氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、赖氨酸等胞内浓度均有所下降,此外,其胞外前体氨基酸 (异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、赖氨酸) 浓度低于对照菌株。由此说明,更多的前体氨基酸被用于杆菌肽的生物合成,导致 DW2-CQD 中前体氨基酸浓度相比于对照有所降低。

3 结论与展望

本研究以工业生产菌株地衣芽胞杆菌 DW2 为出发菌株,针对目标产物杆菌肽合成过程中 ATP 供给不足的难题,通过优化呼吸链分支途径、强化 ATP 合成途径等策略,获得了工程菌株 DW2-CQD,与对照菌株 DW2 相比,该菌株胞内 ATP 含量和杆菌肽合成水平均显著提高。

芽胞杆菌是一种重要的工业微生物生产菌株,其可以合成具有应用价值的化工产品,如聚 γ -谷氨酸、透明质酸、乙偶姻、丁二醇等,也可以作为蛋白表达宿主,用于异源蛋白 (酶蛋白和活性多肽等) 高效生产。然而,芽胞杆菌高的维持代谢能是限制其代谢产物高效生产的重要限制因素。人们之前的研究已证实,芽胞杆菌呼吸链有 4 条分支途径,分别为细胞色素 *bd* 氧化酶、细胞色素 *caa*₃ 氧化酶、细胞色素 *aa*₃ 氧化酶及通过序列比对获得的 YthAB。其中,细胞色素 *bd* 氧化酶途径被认为是能耗比较高的途径,之前的研究中,人们通过阻断细胞色素 *bd* 氧化酶分支途径,减低芽胞杆菌维持代谢能,进而提高了核黄素、N-乙酰氨基葡萄糖、聚 γ -谷氨酸等产物合成水平。然而,另外 3 条途径在细胞维持能代谢调节方面

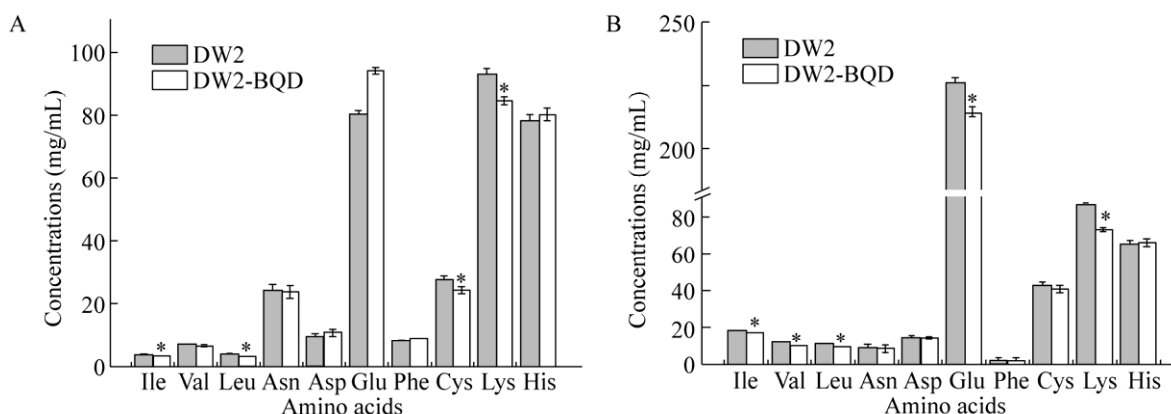


图 6 DW2 和 DW2-CQD 的胞内外前体氨基酸浓度
Fig. 6 The intracellular and extracellular concentrations of precursor amino acids of DW2 and DW2-CQD. (A) Intracellular. (B) Extracellular. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

的功能并不清楚。本研究通过对细胞色素 aa_3 氧化酶的功能进行初步研究,发现细胞色素 aa_3 氧化酶表达对于菌体生长及产物合成十分重要,强化表达细胞色素 aa_3 氧化酶有利于杆菌肽合成和胞内 ATP 积累。之前研究已证实细胞色素 bd 氧化酶和 aa_3 氧化酶是芽胞杆菌呼吸链的主要分支途径,而本研究的结果表明,与细胞色素 bd 氧化酶不同,细胞色素 aa_3 氧化酶则是能耗比较低的分支途径。因此,细胞色素 aa_3 氧化酶可以作为代谢工程改造的靶位点用于目的产物高产菌株的代谢工程育种。此外,尽管本课题之前的研究发现阻断 $ythAB$ 表达也会使得聚 γ -谷氨酸产量下降^[18],但 $YthAB$ 氧化酶与细胞代谢维持能力及目的产物合成的关系尚待研究。

本研究通过敲除细胞色素 bd 泛醇氧化酶亚基 $cydB$ 、强化表达细胞色素 aa_3 氧化酶亚基 $qoxA$,优化了地衣芽胞杆菌呼吸链途径,通过强化表达腺苷激酶基因 dck 提高了 ADP 合成水平。通过上述策略,胞内 ATP 含量达到 39.54 nmol/L,相比于对照提高了 49.32%,工程菌株 DW2-CQD 杆菌肽产量达到 954.25 U/mL,相比于对照提高了 21.66%。本研究证实能量代谢工程是提高杆菌肽合成水平的有效策略,同时提供了一株具有工业化应用前景的杆菌肽生产菌株。

REFERENCES

- [1] Drabløs F, Nicholson DG, Ronning M. EXAFS study of zinc coordination in bacitracin A. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1431(2): 433–442.
- [2] Haavik HI. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: effect of glucose. *J Gen Microbiol*, 1974, 81(2): 383–390.
- [3] Lin G. Determination of amino acid and inorganic ions in culture and its application in bacitracin fermentation process[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, 2006 (in Chinese).
林纲. 杆菌肽发酵过程中氨基酸等成分的测定方法研究和应用[D]. 上海: 上海医药工业研究院, 2006.
- [4] Li Y, Wu F, Cai DB, et al. Enhanced production of bacitracin by knocking out of amino acid permease gene *yhdG* in *Bacillus licheniformis* DW2. *Chin J Biotech*, 2018, 34(6): 916–927 (in Chinese).
李阳, 吴非, 蔡冬波, 等. 地衣芽胞杆菌 DW2 中敲除氨基酸转运蛋白基因 *yhdG* 提高杆菌肽产量. *生物工程学报*, 2018, 34(6): 916–927.
- [5] Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreulx D, et al. BcrC from *Bacillus subtilis* Acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem*, 2005, 280(32): 28852–28857.
- [6] Hancock RE. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(4): 209–218.
- [7] Zou FQ, Zeng D, Wen B, et al. Illumina Miseq platform analysis caecum bacterial communities of rex rabbits fed with different antibiotics. *AMB Express*, 2016, 6: 100.
- [8] Cai DB, Zhu J, Zhu S, et al. Metabolic engineering of main transcription factors in carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms for enhanced production of bacitracin in *Bacillus licheniformis*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(4): 866–875.
- [9] Konz D, Klens A, Schörgendorfer K, et al. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol*, 1997, 4(12): 927–937.
- [10] Hur GH, Vickery CR, Burkart MD. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(10): 1074–1098.
- [11] Winn M, Fyans JK, Zhuo Y, et al. Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(2): 317–347, doi: 10.1039/C5NP00099H.
- [12] Cai DB. Metabolic regulation mechanism and cofactor energy engineering for high-level production of poly- γ -glutamic acid in *Bacillus licheniformis*[D]. Wuhan: Hubei University, 2018 (in Chinese).
蔡冬波. 地衣芽胞杆菌高产聚 γ -谷氨酸的代谢调控及辅酶能量工程[D]. 武汉: 湖北大学, 2018.

- [13] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Essential biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2008: 624–629 (in Chinese).
王镜岩, 朱圣庚, 许长发. 生物化学教程. 北京: 高等教育出版社, 2008: 624–629.
- [14] Lu JF, Zhu Y, Sun HL, et al. Highly efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* R42 derived from heterologous expression of bacterial haemoglobin and mutant selection. Lett Appl Microbiol, 2016, 62(4): 316–322.
- [15] Zhu J, Cai DB, Xu HX, et al. Enhancement of precursor amino acid supplies for improving bacitracin production by activation of branched chain amino acid transporter BrnQ and deletion of its regulator gene *lrp* in *Bacillus licheniformis*. Synth Syst Biotechnol, 2018, 3(4): 236–243.
- [16] Zamboni N, Mouncey N, Hohmann HP, et al. Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. Metab Eng, 2003, 5(1): 49–55.
- [17] Liu YF, Zhu YQ, Ma WL, et al. Spatial modulation of key pathway enzymes by DNA-guided scaffold system and respiration chain engineering for improved *N*-acetylglucosamine production by *Bacillus subtilis*. Metab Eng, 2014, 24: 61–69.
- [18] Cai DB, Chen YZ, He PH, et al. Enhanced production of Poly- γ -glutamic acid by improving ATP supply in metabolically engineered *Bacillus licheniformis*. Biotechnol Bioeng, 2018, 115(10): 2541–2553.
- [19] Zhao J, Li QY, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. Metab Eng, 2013, 17: 42–50.
- [20] Wang Q, Zheng H, Wan X, et al. Optimization of inexpensive agricultural by-products as raw materials for bacitracin production in *Bacillus licheniformis* DW2. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 183(4): 1146–1157.
- [21] Von Wachenfeldt C, Hederstedt L. Respiratory cytochromes, other heme proteins, and heme biosynthesis//Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, Eds. *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells. Washington: ASM Press, 2002: 163–179.
- [22] Trumpower BL, Gennis RB. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. Annu Rev Biochem, 1994, 63: 675–716.

(本文责编 郝丽芳)