

• 工业生物技术 •

使用动态分子开关调控大肠杆菌生产莽草酸

侯建岫^{1,2}, 高聪^{1,2}, 陈修来^{1,2}, 刘立明^{1,2}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

侯建岫, 高聪, 陈修来, 等. 使用动态分子开关调控大肠杆菌生产莽草酸. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2104–2112.

Hou JS, Gao C, Chen XL, et al. Using dynamic molecular switches for shikimic acid production in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2104–2112.

摘要: 莽草酸是大肠杆菌合成芳香族氨基酸的中间代谢物, 也是抗流感药物“达菲”的重要合成前体。合成莽草酸需要截断莽草酸途径, 导致芳香族氨基酸无法合成, 因此面临细胞生长受到抑制的问题。使用动态调控策略通过将细胞生长和莽草酸的合成相互分离, 可以提高菌株的生产性能。通过使用生长偶联型启动子和降解决定子 (Degrons), 组建动态分子开关。利用该动态分子开关实现细胞生长与莽草酸合成分离, 在 5 L 发酵罐中经过 72 h 发酵得到了 14.33 g/L 的莽草酸。结果表明, 这种动态分子开关可以通过调控靶蛋白丰度来改变碳流量平衡, 使菌株获得更优秀的生产性能。

关键词: 分子开关, 大肠杆菌, 莽草酸, 碳代谢流

Using dynamic molecular switches for shikimic acid production in *Escherichia coli*

Jianshen Hou^{1,2}, Cong Gao^{1,2}, Xiulai Chen^{1,2}, and Liming Liu^{1,2}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Shikimic acid is an intermediate metabolite in the synthesis of aromatic amino acids in *Escherichia coli* and a synthetic precursor of Tamiflu. The biosynthesis of shikimic acid requires blocking the downstream shikimic acid consuming pathway that leads to inefficient production and cell growth inhibition. In this study, a dynamic molecular switch was constructed by using growth phase-dependent promoters and degrens. This dynamic molecular switch was used to uncouple cell growth from shikimic acid synthesis, resulting in the production of 14.33 g/L shikimic acid after 72 h fermentation. These results show that the dynamic molecular switch could redirect the carbon flux by regulating the abundance of target enzymes,

Received: February 22, 2020; **Accepted:** April 8, 2020

Supported by: National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-08), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21808083, 21978113).

Corresponding author: Liming Liu. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-08), 国家自然科学基金 (Nos. 21808083, 21978113) 资助。

for better production.

Keywords: molecular switch, *Escherichia coli*, shikimic acid, carbon metabolic flux regulation

莽草酸 (Shikimic Acid, SA) 是植物和细菌中芳香族氨基酸生物合成途径的中间代谢物, 也是抗流感药物磷酸奥司他韦 (达菲) 合成的中间体^[1-2]。目前在大肠杆菌中合成莽草酸的策略包括中断莽草酸途径以减少消耗、增加前体物质浓度、强化生产路径等手段。例如刘向磊等通过中断莽草酸途径 (敲除 *aroK* 和 *aroL* 基因)、强化生产路径 (过表达基因 *aroB*、*aroE* 和 *aroG*)、增加前体物质 (过表达 *tktA* 和 *ppsA* 基因) 等手段积累 27.41 g/L 莽草酸^[3]。Rodriguez 等通过中断莽草酸途径 (敲除 *aroK* 和 *aroL* 基因), 增加前体物质 (过表达 *tktA* 和敲除 *pykF* 基因) 同时过表达路径酶基因, 生产 43 g/L 莽草酸^[4]。以上策略面临的问题是生产莽草酸必须添加丰富的有机氮源, 因为阻断莽草酸路径后, 在基本培养基中细胞生长受到阻碍。而动态调控手段可以自主实现细胞生长与产物合成的分离, 为莽草酸的生物合成提供了新的策略。

为了实现代谢流的动态调控, 目前的转录水平的分子开关根据响应信号的不同分为 3 类^[5], 即环境回路^[6] (温度, 光照和 pH)、细胞外回路^[7] (群体感应) 和细胞内回路^[8-10] (感知生理状态和胞内代谢产物)。这些策略可以改变代谢状态^[6], 减少对细胞有害中间体积累^[10]。例如, 利用动态开关控制丙二酰辅酶 A 的供应使脂肪酸产量提高了 2.1 倍^[8]。由于缺乏翻译后水平的调控, 代谢流被定向到新的路径时, 原路径的酶仍然存在于细胞中^[11-13], 导致转录水平调节的响应时间很长, 代谢流的调节被延迟。

因此, 可以将转录水平和翻译后水平的调控策略结合组建具备低能耗和响应快速的开关。在本文中, 使用生长期的启动子和蛋白质降解标签^[14-17] 构建调控开关, 并将调控开关应用到莽草酸合成中, 菌株进入稳定期后动态降解莽草酸激酶并开

始积累莽草酸, 实现了细胞生长与产物合成之间的代谢流平衡分配。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

本研究使用的大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 *E. coli* MG1655 为实验室保藏, 启动子 Promoter J21339 (P9) 的序列为 TTGACAGCTAGC TCAGTCCTAGGTATAAT。本文所用质粒列于表 1。

1.2 培养基

大肠杆菌的常规培养在 LB 培养基中进行, 莽草酸发酵在无机盐培养基中进行。

LB 培养基: 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L NaCl, pH 7.0。LB 固体培养基额外添加 20 g/L 的琼脂。

M9 培养基: 葡萄糖 40 g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 15.11 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、NH₄Cl 1 g/L、NaCl 0.5 g/L、微量元素 1 mL/L、MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L。

NBS 培养基: 葡萄糖 40 g/L、KH₂PO₄ 3.5 g/L、K₂HPO₄ 5.0 g/L、(NH₄)₂HPO₄ 3.5 g/L、CaCl₂·2H₂O 15 mg/L、微量元素 1 mL/L、MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L、维生素 B1 0.5 mg/L、盐酸甜菜碱 1 mmol/L。

AM1 培养基: 葡萄糖 40 g/L、(NH₄)₂HPO₄ 2.63 g/L、NH₄H₂PO₄ 0.87 g/L、KCl 0.15 g/L、微量元素液 1 mL/L、MgSO₄·7H₂O 0.37 g/L。

MM 培养基: 葡萄糖 40 g/L、NH₄Cl 2.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L、KH₂PO₄ 6.0 g/L、MOPS 8.4 g/L、NaCl 0.5 g/L、MgSO₄ 0.24 g/L、微量元素 1 mL/L、维生素 B1 1.01 g/L。

微量元素: FeCl₃·6H₂O 2.4 g/L、CoCl₂·6H₂O 0.3 g/L、CuCl₂ 0.15 g/L、ZnCl₂·4H₂O 0.3 g/L、NaMnO₄ 0.3 g/L、H₃BO₃ 0.075 g/L、MnCl₂·4H₂O 0.5 g/L, 溶于 0.1 mol/L HCl。

表 1 本研究使用的菌种与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain	<i>E. coli</i> genotype/plasmid	Source
JM109	<i>E. coli</i> , <i>recA1 mcrB⁺ hsdR17</i>	Lab storage
rpsL-LAA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsL} - <i>egfp</i> -LAA-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsL-DAS	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsL} - <i>egfp</i> -DAS-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsL-DAS+4	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsL} - <i>egfp</i> -DAS+4-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsL-DAS+8	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsL} - <i>egfp</i> -DAS+8-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsL-GSD	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsL} - <i>egfp</i> -GSD-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsL	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsL} - <i>egfp</i> -P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsA-LAA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>egfp</i> -LAA-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsA-DAS	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>egfp</i> -DAS-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsA-DAS+4	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>egfp</i> -DAS+4-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsA-DAS+8	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>egfp</i> -DAS+8-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsA-GSD	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>egfp</i> -GSD-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>egfp</i> -P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnA-LAA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>egfp</i> -LAA-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnA-DAS	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>egfp</i> -DAS-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnA-DAS+4	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>egfp</i> -DAS+4-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnA-DAS+8	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>egfp</i> -DAS+8-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnA-GSD	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>egfp</i> -GSD-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>egfp</i> -P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnC-LAA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>egfp</i> -LAA-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnC-DAS	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>egfp</i> -DAS-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnC-DAS+4	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>egfp</i> -DAS+4-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnC-DAS+8	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>egfp</i> -DAS+8-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnC-GSD	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>egfp</i> -GSD-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rrnC	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>egfp</i> -P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsT-LAA	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsT P1} - <i>egfp</i> -LAA-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsT-DAS	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsT P1} - <i>egfp</i> -DAS-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsT-DAS+4	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsT P1} - <i>egfp</i> -DAS+4-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsT-DAS+8	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsT P1} - <i>egfp</i> -DAS+8-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsT-GSD	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsT P1} - <i>egfp</i> -GSD-P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
rpsT	JM109, Amp ^r , pPMB1-P _{rpsT P1} - <i>egfp</i> -P _{Lac} UV5- <i>mKate2</i>	This study
SA1	<i>E. coli</i> MG1655, Cm ^r , <i>AptsHlcr::ZmgIf</i> , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i>	Lab storage
SA2	<i>E. coli</i> MG1655, Cm ^r , <i>AptsHlcr::ZmgIf</i> , <i>ΔaroL::tktA</i> , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i>	This study
SA3	<i>E. coli</i> MG1655, Cm ^r , <i>AptsHlcr::ZmgIf</i> , <i>ΔaroL::tktA</i> , <i>ΔaroK</i> , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i>	This study
SA31	SA3, Amp ^r , Cm ^r , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i> , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>aroK</i> -LAA	This study
SA32	SA3, Amp ^r , Cm ^r , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i> , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>aroK</i> -DAS+4	This study
SA33	SA3, Amp ^r , Cm ^r , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i> , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>aroK</i> -DAS+8	This study
SA34	SA3, Amp ^r , Cm ^r , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i> , pPMB1-P _{rrnA P1} - <i>aroK</i> -GSD	This study
SA35	SA3, Amp ^r , Cm ^r , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i> , pPMB1-P _{rrnC P1} - <i>aroK</i> -DAS	This study
SA32S	SA3, Amp ^r , Cm ^r , p15A-P _{p9} - <i>aroG^{fbt}</i> -P _{p9} - <i>tktA</i> -P _{p9} - <i>aroB^{opt}</i> - <i>aroE</i> , pPMB1-P _{rpsA P1} - <i>aroK</i>	This study

1.3 动态分子开关的构建及表征

1.3.1 动态分子开关构建

使用全质粒 PCR 等分子生物学方法^[18]在 GFP 的 C 末端与 5 种 degron 融合组建 GFP-LAA、GFP-DAS、GFP-DAS+4、GFP-DAS+8、GFP-GSD 5 种质粒。使用 *Sal* I 和 *Hind* III 限制性内切酶将融合有降解标签的 GFP 片段插入到含有生长偶联型启动子表达框的质粒中,构建 25 种动态分子开关。

1.3.2 荧光强度检测

将相应的质粒转化到大肠杆菌 JM109 菌株中,挑取单菌落接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中过夜培养。将过夜培养后的种子液,以 1:100 (V/V) 的比例接种于含有 50 mL LB 的 250 mL 摇瓶中,在 37 °C、200 r/min 下培养,将此时设为 0 h,每隔 2 h 取 200 μ L 培养液作为样品采用 SpectraMax M3 酶标仪检测样品的荧光强度。检测绿色荧光蛋白 GFP 时,激发波长为 (488 \pm 10) nm,发射波长为 (511 \pm 10) nm。检测红色荧光蛋白 mKate2 的激发波长为 (588 \pm 10) nm,发射波长为 (640 \pm 10) nm。

1.3.3 菌落水平检测

为了在菌落水平上进行延时荧光成像,将构建的质粒转化至大肠杆菌 JM109 菌株中,将其接种到带有抗生素的 LB 培养基中过夜活化。然后取过夜活化后的菌液 5 μ L 接种到含有琼脂的 LB 平板上,置于 37 °C 培养,时间设为 0 h。使用超灵敏荧光成像系统 iBright FL1000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 在 GFP (488/510 nm) 和 Texas Red (595/615 nm) 下进行荧光成像。GFP 和 mKate2 的曝光时间为 50 ms,每隔 2 h 拍照一次。

1.4 莽草酸发酵条件

1.4.1 摇瓶发酵

挑取单菌落到含有 25 mL LB 培养基的摇瓶中,37 °C、200 r/min 培养 12 h,然后取 200 μ L 种子液接种到含有氨苄青霉素 100 mg/L 和氯霉素 30 mg/L 的 50 mL NBS 培养基中,于 37 °C、200 r/min 的条件下培养 72 h,每隔 12 h 取样检测莽草酸。

1.4.2 5 L 发酵罐补料发酵

挑取单菌落到含有 25 mL LB 中,30 °C、200 r/min 培养 12 h,再将培养液接种于 50 mL 种子培养基中,37 °C、200 r/min 培养 12 h。然后将 200 mL 种子液接种到装有 1.7 L 发酵培养基、氨苄青霉素终浓度 100 mg/L,氯霉素终浓度 30 mg/L 的 5 L 发酵罐中,在 35 °C、pH 7.0、溶氧 30% 的条件下发酵。以氨水调控 pH。每隔 4 h 取样检测发酵液中的葡萄糖和莽草酸的含量。

1.5 分析方法

1.5.1 莽草酸激酶活性检测

莽草酸激酶活性测定,将菌株在 NBS 培养基中培养,每 12 小时收集一次,12 000 \times g 离心 10 min,然后重悬于 0.05 mol/L 巴比妥缓冲液 (pH 7.0) 中。菌液通过超声处理裂解,12 000 \times g 离心 10 min。以牛血清蛋白为标准品,通过 Bradford 法测定蛋白质浓度。在含有 4 μ mol/L ATP、1 μ mol/L SA、10 μ mol/L NaF、5 μ mol/L MgCl₂、25 μ mol/L 巴比妥缓冲液 (pH 9.0) 的 1 mL 混合液中测量莽草酸激酶活性。1 U 的酶活性定义为在上述条件下每分钟消耗 1 μ mol/L SA 所需的量。

1.5.2 莽草酸 HPLC 检测方法

采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析莽草酸和葡萄糖的浓度,采用安捷伦 1260 高效液相系统 (Agilent Technologies, USA),配备 Aminex HPX-87H 分析柱 (300 mm \times 7.8 mm; 9 μ m; 美国 Bio-Rad)。样品在 12 000 \times g 离心 10 min,然后使用 0.22 μ m 过滤膜对收集的上清液进行过滤。流动相为 5 mmol/L H₂SO₄,流速 0.5 mL/min。用 210 nm 紫外检测器检测莽草酸,用示差折光检测器检测葡萄糖。

2 结果与分析

2.1 动态分子开关的组建和表征

动态分子开关由生长偶联型启动子 (GPP)、

靶蛋白和降解标签 (ssrA) 组成 (图 1A)。生长偶联型启动子在生长期开启靶蛋白转录, 进入稳定期后停止转录。降解标签可以控制靶蛋白被大肠杆菌持续降解。在生长期启动子和降解标签的双重作用下, 分子开关可以实现靶蛋白在生长期转录表达, 进入稳定期后被逐渐降解。

在本研究中, 通过将 5 种生长偶联型启动子 (rpsL、rpsT P1、rpsA P1、rrnA P1 和 rrnC P1)^[14-15] 和 5 个强度的降解决定子 (LAA、DAS+4、DAS+8、GSD 和 DAS)^[16-17,19] 装配至 GFP 表达框

中, 获得 25 种动态分子开关。对 25 种分子开关的 GFP 荧光强度检测后, 选择荧光曲线与 X 轴的积分作为评价指标, 用于表征不同分子开关的强度, 25 种分子开关按照积分的强度一共可以分成 5 个梯度 (图 1B)。在每种强度梯度中, 选择代表性分子开关用于后续实验, 即 rrnC-DAS (积分: 60 000)、rrnA-GSD (积分: 40 000)、rrnA-DAS+8 (积分: 30 000)、rpsA-DAS+4 (积分: 10 000)、rpsA-LAA (积分: 5 000) 5 种分子开关 (图 1C)。对选定的 5 种分子开关进行可视化的荧光成像表

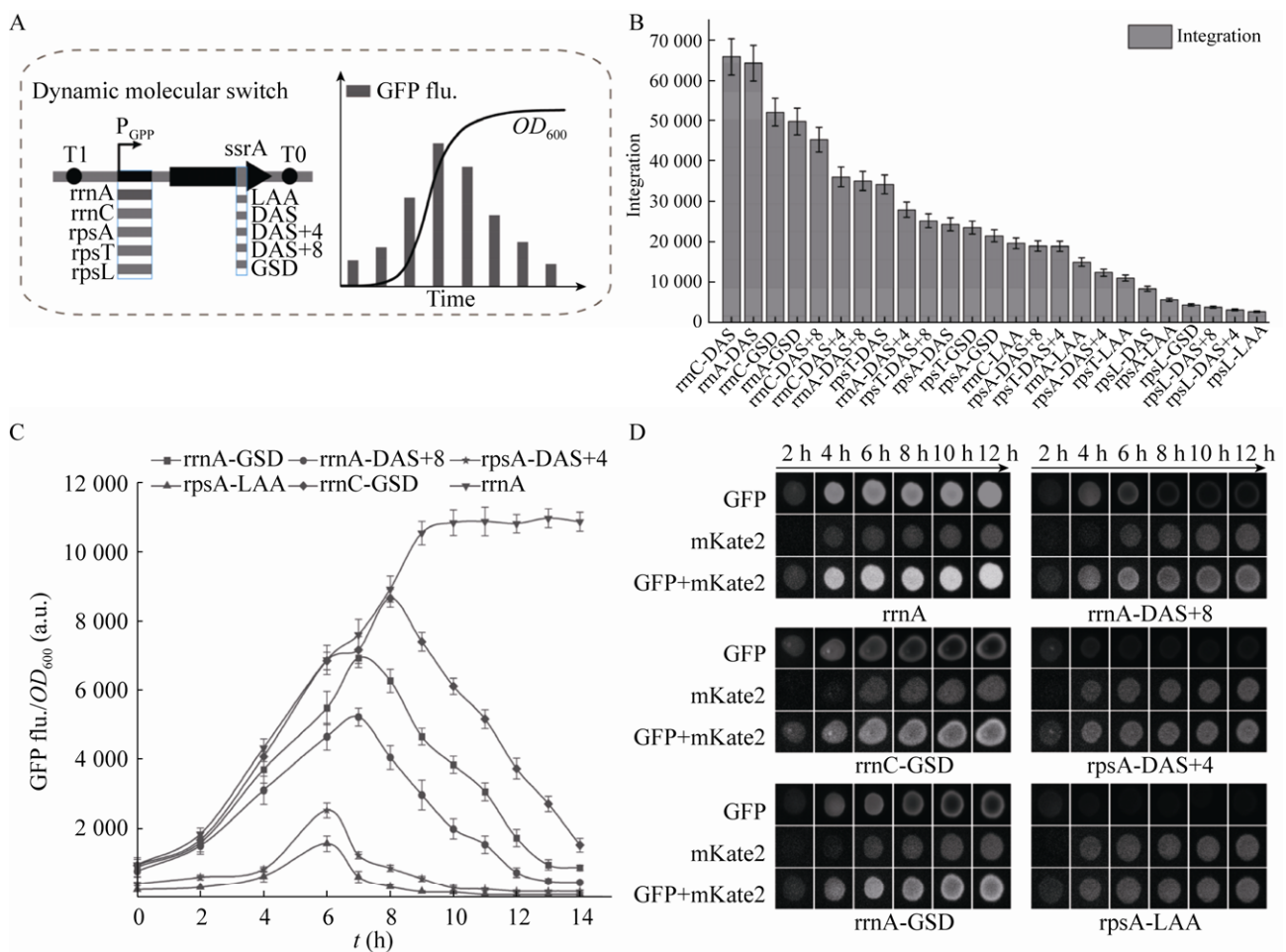


图 1 动态分子开关的组建和表征

Fig. 1 Dynamic molecular switch design and characterization. (A) The dynamic turn-off switch design. (B) The integration of GFP expression level of 25 dynamic turn-off switches in the X-axis direction. (C) The fluorescence abundance curve of 5 selected representative combinations. (D) The time-lapse fluorescence imaging at the colony level. GFP is a fluorescence image in GFP channel, mKate2 is a fluorescence image in mKate2 channel. GFP+mKate2 is an image in two kinds of fluorescence channels.

征, 取过夜培养的菌液 5 μL , 点种到平板中, 每隔 2 h 分别对 GFP 和 mKate2 进行荧光拍照, 不携带降解标签的菌株 (*rrnA*) 作为对照菌株, 由组成型启动子控制的红色荧光蛋白 mKate2 作为每种分子开关的对照蛋白。实验结果如图 1D 所示, 对照蛋白 mKate2 在培养阶段的荧光强度逐渐增加; 随着 5 种分子开关的强度逐渐降低, 可以观察到每种分子开关控制的 GFP 荧光强度逐渐减弱: *rrnC*-DAS 和 *rrnA*-GSD 在培养 8 h 观察到 GFP 明显的降解现象, 而强度更低的 *rrnA*-DAS+8 在培养 6 h 后可以观察到降解现象, 最弱的 *rpsA*-LAA 在 6 h 后无法观察到绿色荧光。由此表明, 可视化荧光表征的结果与分子开关的积分强度一致。

2.2 莽草酸生产菌株的构建

大肠杆菌的莽草酸合成途径如图 2A 所示, 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 经过 DAHP 合酶 (*aroG* 编码) 催化为 DAHP (3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸), 再经过 3-脱氢奎尼酸合成酶 (*aroB* 编码) 和莽草酸脱氢酶 (*aroE* 编码) 等酶的催化最终合成莽草酸。莽草酸会被莽草

酸激酶 (*aroL* 和 *aroK* 编码的同工酶) 催化为莽草酸-3-磷酸, 进而被合成为 3 种必需的芳香族氨基酸。为了获得莽草酸生产菌株, 利用代谢工程手段对大肠杆菌 MG1655 进行改造: (1) 使用来源于 *Z. mobilis* 的 *glf*^[20] 在基因组上替换 *ptsHIcrr*, 构建菌株 SA1, *ptsHIcrr* 基因编码大肠杆菌的 PTS 系统 (消耗 PEP 将葡萄糖转运至胞内), PTS 系统被 *glf* 替换可以增加前体物质的浓度, 同时回补由于 PTS 系统破坏导致的葡萄糖吸收速率下降; (2) 以 SA1 为基础在基因组上敲除 *aroL*, 构建菌株 SA2; (3) 在 SA2 基础上在进一步敲除 *aroK* 构建菌株 SA3。构建质粒 BEGA, 强化表达路径酶基因 *aroB*、*aroG*、*tktA* 和 *aroE*。在质粒 BEGA 中 *aroB* 的第 3 个密码子经过优化 (AGG 突变为 CGT), 以增加表达量; *aroG* 编码的第 146 位氨基酸 Asp 突变为 Asn, 消除反馈抑制。

将质粒 BEGA 分别转化至 SA1、SA2、SA3 三种菌株内并对其发酵性能进行评价, 在补充有机氮源的 M9 培养基 (额外添加酵母提取物 5 g/L) 中发酵 72 h。实验结果如图 2B 所示, SA1 的产量

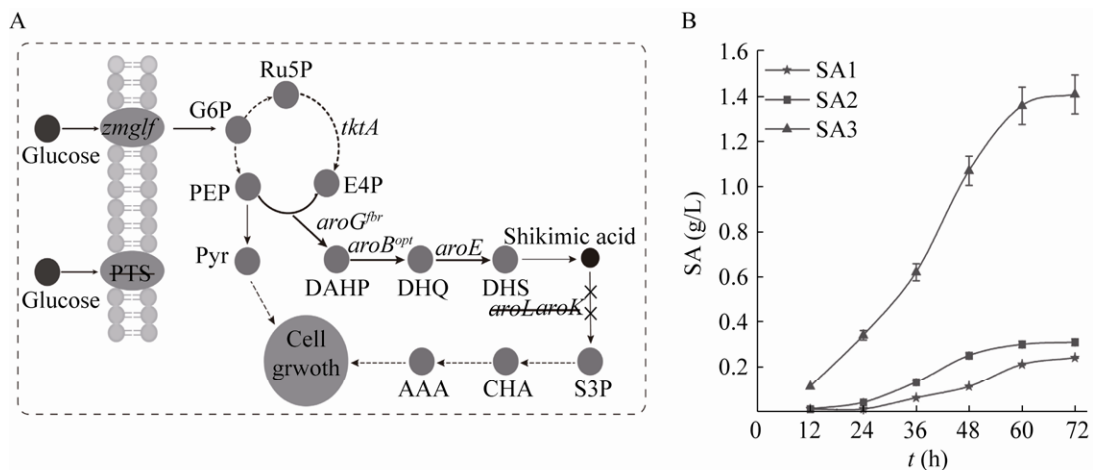


图 2 构建莽草酸生产途径

Fig. 2 Engineering shikimic acid biosynthetic pathway. (A) The synthesis pathway of shikimic acid. (B) Shikimic acid production of engineered strain. PTS: phosphotransferase system; *Zmglf*: glucose facilitator; *tktA*: transketolase A; *aroG*^{fab}: DAHP synthase; *aroB*^{opt}: DHQ synthase; *aroD*: DHQ dehydratase; *aroE*: shikimic acid dehydrogenase; *aroK/aroL*: shikimic acid kinase I/II; PYR: pyruvate; G6P: glucose 6-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; E4P: erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; Ru5P: Ribulose-5-phosphate; DHQ: 3-dehydroquinic acid; DHS: 3-dehydroshikimate; S3P: shikimate-3-phosphate; CHA: chorismic acid.

为 0.24 g/L, SA2 的产量是 0.31 g/L, SA3 的产量为 1.41 g/L。只敲除 *aroL* 的菌株 SA2 产量是 SA1 的 1.29 倍, 仅为 SA3 的 0.22 倍, 结果表明菌株仅敲除 *aroL* 无法彻底阻断莽草酸的下游代谢途径。而在其基础上改造的 SA3 通过彻底阻断莽草酸的代谢, 使产量得到极大提升。

2.3 使用动态分子开关生产莽草酸

将编码的莽草酸激酶的 *aroK* 作为靶基因, 安装到先前构建的 5 种动态分子开关中 (图 3A), 再将 5 种分子开关和质粒 BEGA 转化至 SA3 菌株内, 构建莽草酸生产菌株 SA31、SA32、SA33、SA34 和 SA35。以 SA3 为对照组, 经过 72 h 发酵后, 结果如图 3B 所示: (1) 对照组 SA3 因为不能表达 *aroK* 导致不能在无机盐培养基中生长, OD_{600} 仅为 0.04, 几乎无法检测莽草酸浓度; (2) 菌株 SA31-SA35 的 OD_{600} 分别达到 2.39、3.26、

4.04、5.02 和 6.48, 莽草酸产量分别为 0.48 g/L、1.56 g/L、0.87 g/L、0.49 g/L 和 0.43 g/L; (3) 菌株 SA31-SA35 所携带的分子开关强度逐渐增强, 莽草酸激酶的表达量增加, 导致最终 OD_{600} 变高, 而莽草酸产量呈现先增加再下降的趋势。由于 SA32 菌株实现了细胞生长和莽草酸合成的平衡, 将用于后续的研究中。

对最优菌株 SA32 在 M9、NBS、AM1 和 MM 等无机盐培养基中的生产性能进行评价, 结果如图 3C 和 3D 所示: 经过 24 h 摇瓶发酵, M9、NBS、AM1 和 MM 培养基中的莽草酸产量均在 0.35 g/L 左右; 经过 48 h 的发酵, 4 种培养基中莽草酸的产量分别为 1.21 g/L、1.12 g/L、0.82 g/L 和 0.54 g/L, M9 培养基产量最高; 经过 60 h 的发酵, 4 种培养基的莽草酸产量分别为 1.39 g/L、1.48 g/L、1.01 g/L 和 0.73 g/L, NBS 培养基的产量迅速增加, 超过

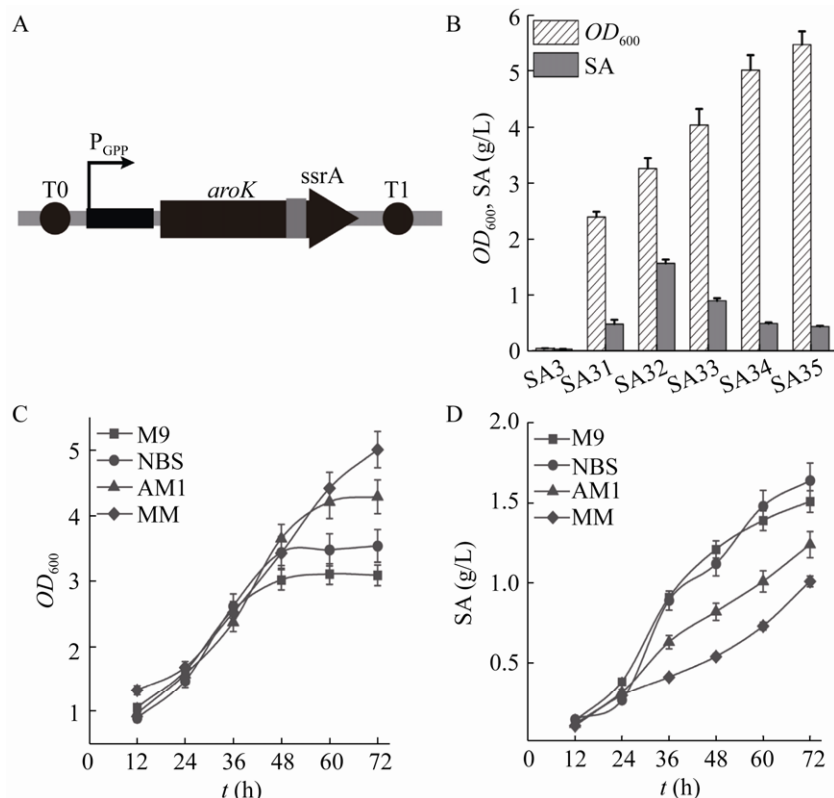


图 3 使用动态分子开关生产莽草酸

Fig. 3 Production of shikimic acid using molecular switches. (A) Using molecular switches expressing *aroK*. (B) Effect of different combinations of the molecular switches on titer and cell growth in NBS medium. (C) and (D) The OD_{600} and shikimic acid titer in medium optimization test.

M9 培养基; 经过 72 h 的发酵, 4 种培养基的最终 OD_{600} 分别为 3.09、3.54、4.29 和 5.01, 莽草酸的最终产量分别为 1.51 g/L、1.64 g/L、1.24 g/L 和 1.01 g/L。上述结果表明 NBS 培养基是最适合莽草酸发酵的无机盐培养基。

2.4 分子开关的效率和适用性检测

为了评价莽草酸生产过程中分子开关的效率, 对发酵过程中莽草酸激酶的活性进行检测, 实验在 500 mL 摇瓶中进行, 因为对照组 SA3 菌株不含有动态分子开关, 导致其无法在 NBS 培养基中正常生长, 而对照组 SA32S 表达 *aroK* 时不携带降解标签, 导致在整个培养阶段的莽草酸激酶活性都处于较高的状态 (图 4A、图 4B)。对于最优菌株 SA32, 在动态分子开关的作用下, 生长期 (0–48 h) 莽草酸激酶的活性从 5.73 U/mg 增加至 25.06 U/mg, 稳定期 (48–72 h) 后活性降至 2.55 U/mg。由于莽草酸激酶失活, 菌株无法在基本培养基中继续生长, 导致生长停滞而莽草酸不断积累, 这一结果证明动态分子开关可实现细胞生长与莽草酸的生产相互分离。

为了验证分子开关在不同规模反应器中的适用性, 最优菌株 SA32 在 5 L 发酵罐中进行发酵测试。结果如图 4C 所示, 菌株在发酵罐中经过 24 h 生长到达稳定期, 同时莽草酸在发酵 24 h 后迅速积累, 经过 72 h 发酵, 产量升高到 14.33 g/L (得率为

0.22 g/g 葡萄糖), 比 500 mL 摇瓶发酵的产量提升 8.73 倍。结果表明, 本研究中将细胞生长和化学品合成解偶联的动态分子开关适用于较大规模发酵。

3 讨论

莽草酸的生产过程中面临着细胞生长受限制的问题, 本文选择平衡细胞生长和产物合成的代谢流为解决方案。我们利用生长期启动子和内源蛋白降解系统构建了模块化、可调的动态分子开关。将 GFP 整合到动态分子开关内, 可以实现 GFP 在生长期积累, 进入稳定期后逐渐被降解。然后将该开关应用到大肠杆菌的体内代谢途径中, 在 5 L 发酵罐上经过 72 h 发酵最终生产 14.33 g/L 莽草酸。

在调节水平方面, 其他类型的调控如生物传感器^[21]仅能在转录水平进行调节; 而本文使用的动态开关可以在转录水平和翻译后水平同时调节蛋白丰度, 具有高效和低能耗的优点。在组成元件方面, 其他类型的调控回路如群体感应回路^[17,22]需要引入外源蛋白; 而本文的开关根据细胞的生理状态和营养条件对代谢流进行调控^[15,23], 组成开关的元件均为内源性转录因子和内源蛋白水解酶^[14,19], 极大地减轻了宿主的代谢负担。在今后的研究中, 可以利用合成生物学手段, 组建启动子突变文库, 进一步优化动态分子开关的动态范围和强度, 为精确调控代谢流提供解决方案。

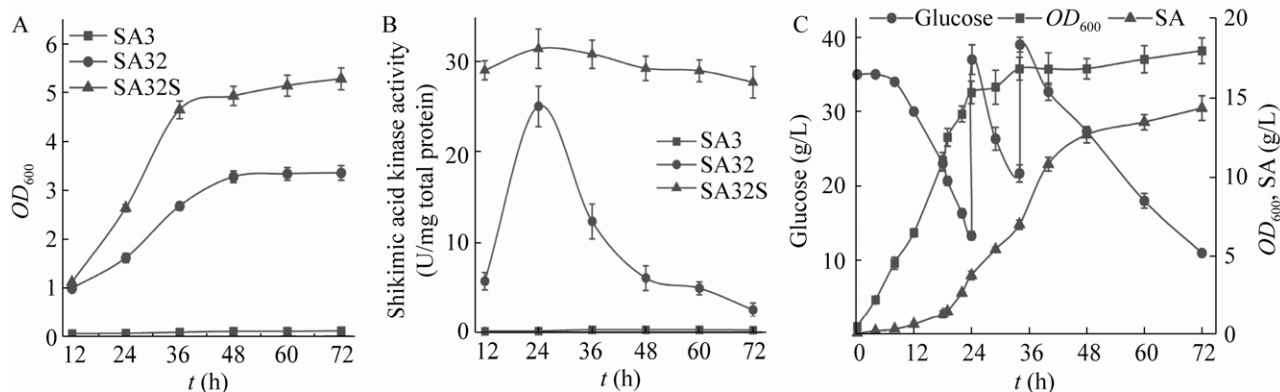


图 4 分子开关的效率和适用性

Fig. 4 Efficiency and applicability of molecular switches. (A, B) The OD_{600} and SA kinase activity in efficiency test. (C) Shikimic acid production of engineered strain SA32 in bioreactor.

REFERENCES

- [1] Farina V, Brown JD. Tamiflu: the supply problem. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(44): 7330–7334.
- [2] Kim HK, Park KJJ. A new efficient synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53(13): 1561–1563.
- [3] Liu XL. Production of shikimic acid and resveratrol in *Escherichia coli* based on synthetic biology[D]. Shanghai: China State Institute of Pharmaceutical Industry, 2016 (in Chinese).
刘向磊. 合成生物学技术改造大肠杆菌生产莽草酸及白藜芦醇[D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2016.
- [4] Rodriguez A, Martínez JA, Báez-Viveros JL, et al. Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and *pykF*. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 86.
- [5] Zhang FZ, Keasling J. Biosensors and their applications in microbial metabolic engineering. *Trends Microbiol*, 2011, 19(7): 323–329.
- [6] Zhou L, Niu DD, Tian KM, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2012, 14(5): 560–568.
- [7] Kim EM, Woo HM, Tian T, et al. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2017, 44: 325–336.
- [8] Xu P, Li LY, Zhang FM, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11299–11304.
- [9] Chen XL, Liu LM. Gene circuits for dynamically regulating metabolism. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(8): 751–754.
- [10] Dahl RH, Zhang FZ, Alonso-Gutierrez J, et al. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(11): 1039–1046.
- [11] Larrabee KL, Phillips JO, Williams GJ, et al. The relative rates of protein synthesis and degradation in a growing culture of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1980, 255(9): 4125–4130.
- [12] Belle A, Tanay A, Bitincka L, et al. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 13004–13009.
- [13] Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, et al. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*, 2003, 4(9): 117.
- [14] Hirvonen CA, Ross W, Wozniak CE, et al. Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, 183(21): 6305–6314.
- [15] Lemke JJ, Sanchez-Vazquez P, Burgos HL, et al. Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(14): 5712–5717.
- [16] McGinness KE, Baker TA, Sauer RT. Engineering controllable protein degradation. *Mol Cell*, 2006, 22(5): 701–707.
- [17] Shin Y, Davis JH, Brau RR, et al. Single-molecule denaturation and degradation of proteins by the AAA+ ClpXP protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(46): 19340–19345.
- [18] Casini A, Storch M, Baldwin GS, et al. Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(9): 568–576.
- [19] Hersch GL, Baker TA, Sauer RT. SspB delivery of substrates for ClpXP proteolysis probed by the design of improved degradation tags. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12136–12141.
- [20] Tang JL, Zhu XN, Lu J, et al. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2513–2520.
- [21] Yang YP, Lin YH, Wang J, et al. Sensor-regulator and RNAi based bifunctional dynamic control network for engineered microbial synthesis. *Nat Commun*, 2018, 9: 3043.
- [22] Soma Y, Hanai T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production. *Metab Eng*, 2015, 30: 7–15.
- [23] Mallik P, Paul BJ, Rutherford ST, et al. DksA is required for growth phase-dependent regulation, growth rate-dependent control, and stringent control of *fis* expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2006, 188(16): 5775–5782.

(本文责编 郝丽芳)