

细胞寿命在大肠杆菌细胞工厂构建中的应用

刘佳^{1,2}, 郭亮¹, 罗秋玲¹, 陈修来^{1,2}, 高聪^{1,2}, 宋伟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 药学院, 江苏 无锡 214122

刘佳, 郭亮, 罗秋玲, 等. 细胞寿命在大肠杆菌细胞工厂构建中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1277-1286.

Liu J, Guo L, Luo QL, et al. Application of chronological lifespan in the construction of *Escherichia coli* cell factories. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1277-1286.

摘要: 微生物细胞工厂以可再生资源为原料, 为工业化学品的可持续生产提供了一种有前景的替代方案。然而, 不适的外界环境显著影响了微生物细胞的存活率, 降低了微生物细胞工厂的生产性能。通过延长微生物细胞的时序寿命, 可以显著提升微生物细胞工厂的生产性能。首先, 基于存活率的变化建立了细胞时序寿命和半时序寿命的评价体系; 然后, 发现半胱氨酸、肌肽、氨基胍和氨基葡萄糖抗衰老药物可以使大肠杆菌 *Escherichia coli* 细胞的时序寿命分别延长 80%、80%、50% 和 120%; 最后, 延长 *E. coli* 时序寿命可以显著改善 *E. coli* 细胞工厂的生产性能, 可以用于改善具有本源代谢合成路径的 *E. coli* 细胞工厂的生产性能, 使乳酸和丙酮酸的得率分别提升 30.0% 和 25.0%, 也可以用于改善具有异源代谢合成路径的 *E. coli* 细胞工厂的生产性能, 使苹果酸的得率提升 27.0%。这些研究结果表明延长 *E. coli* 细胞寿命提供了一种潜在的改善细胞工厂的生产性能的方法。

关键词: 大肠杆菌, 微生物细胞工厂, 时序寿命, 抗衰老药物

Application of chronological lifespan in the construction of *Escherichia coli* cell factories

Jia Liu^{1,2}, Liang Guo¹, Qiuling Luo¹, Xiulai Chen^{1,2}, Cong Gao^{1,2}, Wei Song², and Liming Liu^{1,2}

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

2 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Microbial cell factories capable of producing valuable chemicals from renewable feedstocks provide a promising alternative towards sustainability. However, environmental stress remarkably affects the performance of microbial cell factories. By extending the chronological lifespan of microbial cells, the performance of microbial cell factories can be greatly improved. Firstly, an evaluation system for chronological lifespan and semi-chronological lifespan

Received: July 18, 2020; **Accepted:** October 16, 2020

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

Corresponding author: Liming Liu. Tel: +86-510-85197357; Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn
国家自然科学基金 (Nos. 21808083, 21978113), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-08) 资助。

was established based on the changes in survival rates. Secondly, the addition of anti-aging drugs such as cysteine, carnosine, aminoguanidine and glucosamine increased the chronological lifespan of *E. coli* by 80%, 80%, 50% and 120%, respectively. Finally, we demonstrated that extending the chronological lifespan of *E. coli* increased the yield of metabolites produced by *E. coli* cell factories with endogenous (lactic acid and pyruvic acid) or exogenous (malic acid) metabolic pathway by 30.0%, 25.0%, and 27.0%, respectively. The strategy of extending chronological lifespan of *E. coli* provides a potential approach for enhancing the performance of microbial cell factories.

Keywords: *Escherichia coli*, microbial cell factories, chronological lifespan, antiaging drugs

微生物细胞工厂提供了一种利用可再生资源生产工业化学品的的方法,可有效解决石油化工炼制和植物提取对自然资源的依赖与对环境的危害^[1-5]。为了提高微生物细胞工厂的效率,已开发多种工程策略,例如传统育种策略和理性代谢工程策略^[6]。最近 Chen 等^[1]提出一种技术结构概念——设计-构建-评价-优化 (Design-construction-evaluation-optimization, DCEO) 生物技术,用于调控碳流的流量、流向和速率,其包括发现和组合生化途径以构建生产目标化学品的合成路径,在宿主菌株中高效快速地组装代谢途径,通过确定理想条件和实际条件之间的差异精确地确定代谢瓶颈,并修改代谢途径以优化目标化学品的生产。使用 DCEO 生物技术可以显著提高工业菌株的代谢能力。事实上,微生物细胞工厂的效率取决于其代谢能力、生理状态和环境条件。

衰老是细胞生物体随年龄增长而发生退行性变化的总和^[7]。衰老的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 会使发酵过程中糖耗速率减慢,发酵周期延长,发酵过程中代谢产物不稳定,对于发酵过程有较大的影响,使用衰老的 *S. cerevisiae* 会给企业带来巨大的经济损失。衰老是一种渐变的形态和功能变化,会扰乱维持稳态的能力并增加细胞死亡的可能性。细胞老化是 *S. cerevisiae* 和 *Escherichia coli* 的最基本生理特征之一,可分为复制型和时序型的衰老。根据衰老的分类,*S. cerevisiae* 和 *E. coli* 的寿命可以分为 (1) 复制寿命 (Replicative lifespan, RLS), 其由衰老之前产生的子代细胞的数量决定^[8-9], 以及 (2) 时序寿

命 (Chronological lifespan, CLS), 在特定条件下,一定数量的不分裂的细胞所存活的时间^[9]。*S. cerevisiae* 在到达稳定期时,其只分裂 5-10 次,远小于其复制寿命的最大值 20-30 次^[10]。同样,*E. coli* 一个母细胞可以分裂上百次,而且在死亡之前其生长速率基本上没有变化^[8]。所以在分批发酵过程中微生物细胞远没有达到其复制寿命的最大值。CLS 也表示为静止细胞 (Stationary cells) 在非分裂状态下保持活力的能力^[11],在改变 CLS 的同时往往也增加了工程菌抗胁迫的能力。发酵主要是由非分裂的细胞完成,例如葡萄酒发酵过程中主要发生在酿酒酵母的非分裂时期^[12],采用延长酿酒酵母细胞的 CLS 可以提高细胞活力,改善了葡萄酒的生产^[12-14]。采用双输入四输出逻辑门工程化改造 *E. coli* 细胞的 CLS,可以使丁酸产量增加到 29.8 g/L^[2]。因此 CLS 与发酵更为相关,因此常采用工程化改造 CLS 提高工程菌的发酵性能^[12-13]。此外,添加外源性抗衰老药物,例如氨基胍和二甲双胍不仅可以增加 *S. cerevisiae* 的 CLS 而且可以增加 *E. coli* 的 CLS^[15-16]。

本研究以 *E. coli* 为模型,通过延长 *E. coli* 细胞的 CLS,用于改善 *E. coli* 微生物细胞工厂的生产性能。首先,基于存活率的变化建立了细胞 CLS 和 HCLS 的评价体系;其次,根据细胞 CLS 和 HCLS 的变化筛选出延长 *E. coli* 细胞 CLS 的抗衰老药物;最后,研究了延长 *E. coli* 细胞的 CLS 对具有本源和异源代谢合成路径 *E. coli* 细胞工厂发酵性能的影响。结果表明延长 *E. coli* 细胞寿命可以显著提升细胞工厂的生产性能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究所使用的菌株均列于表 1 中, LB 培养基和平板用于培养 *E. coli* 以进行存活率的检测。含有 50 g/L 葡萄糖的 NBS 无机盐培养基用于评价细胞工厂的发酵性能。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 酵母提取物 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 10 g/L, pH 自然, 固体培养基添加 2% 的琼脂。

NBS 培养基: 葡萄糖 40 g/L、 KH_2PO_4 3.5 g/L、 K_2HPO_4 5.0 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.5 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L、微量元素液 0.667 mL/L, 灭菌后补加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L、 VB_1 0.5 mg/L、盐酸甜菜碱 1 mol/L。

NBS 微量元素液配方: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.4 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L、 CuCl_2 0.15 g/L、 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L、 NaMnO_4 0.3 g/L、 H_3BO_3 0.075 g/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 溶于 0.1 mol/L HCl 中配制。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

从甘油管取 100 μL 菌液接种于 LB 培养基中 (20 mL/100 mL 的三角瓶), 在 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h。按照 1:100 (V/V) 的接种量转接到新鲜的 LB 培养基中, 同时添加相应的抗衰老药物 (抗衰老药物的工作浓度如表 2 所示), 在 37 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养。

1.2.2 存活率检测方法

从 LB 平板上挑选 2-3 个单菌落接种至 5 mL LB 培养基中, 在 200 r/min 中过夜培养。将上述培养物接种至 50 mL/250 mL 的三角瓶中培养

12 h。在 4 $^\circ\text{C}$ 、5 000 r/min 条件下离心, 采用过滤除菌的方式过滤上清液, 并收集菌体。菌体用无菌生理盐水洗涤两次, 用已过滤的上清液重悬洗涤后的菌体, 将菌体浓度控制在每 mL 约 1.5×10^9 个菌落形成单位 (CFU)。采用梯度稀释的方式获得菌落形成单位, 根据最后一次稀释后样品的菌落形成单位, 将 0 h 样品的存活率定为 100%, 用于评价细胞存活率的变化, 一直检测到存活率降低至 1%。

1.2.3 抗衰老药物的添加方法

根据 Pepper 等^[16]的报道, 选择肌肽、叶酸和氨基胍作为延长 *E. coli* 细胞寿命的抗衰老药物。根据 Burcham^[17]和 Storelli 等^[18]的报道, 选择氨基葡萄糖和二甲双胍作为延长 *E. coli* 细胞寿命的抗衰老药物。此外, 由于半胱氨酸包含关键的巯基 (硫醇基), 使其成为有效的抗氧化剂, 可以减少胞内活性氧的积累, 从而有效地减缓细胞损伤和细胞衰老^[19], 因此也选择作为延长 *E. coli* 细胞寿命的抗衰老药物。

不同抗衰老药物的工作浓度如表 2 所示, 其中肌肽、叶酸和氨基胍的工作浓度参考 Pepper 等^[16]的报道; 氨基葡萄糖的工作浓度参考 Fang 等^[20]的报道; 二甲双胍的工作浓度参考 Ruggiero-Lopez 等^[21]报道。此外, Awano 等^[22]报道过高浓度的半胱氨酸影响 *E. coli* 细胞抵抗氧化胁迫的能力, 本研究中通过预实验将半胱氨酸添加量控制在 1 mmol/L。

1.2.4 发酵实验

丙酮酸的发酵控制参考 Dong 等的报道^[23]。乳酸的发酵控制参考 Guo 等的报道^[6]。苹果酸的发酵控制参考 Hu 等的报道^[24]。

表 1 本实验所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains name	Strain characteristics	Source
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Wild type	ATCC
<i>E. coli</i> GL0002	<i>E. coli</i> ATCC 8739 $\Delta adhE \Delta ackA$	[6]
<i>E. coli</i> F0601	<i>E. coli</i> W3110 $\Delta ldhA \Delta poxB \Delta pflB \Delta pta-ackA \Delta adhE$	[23]
<i>E. coli</i> FH009	MG1655 $\Delta ptsG \Delta frdBC \Delta fumABC \Delta maeAB \Delta aspC \Delta ldhA \Delta adhE$	[24]
<i>E. coli</i> FH989	FH009 with pEM-CF59	[24]

表 2 本研究所用抗衰老药物

Table 2 Anti-aging drugs used in this study

Chemicals	Carnosine ^[16]	Folic acid ^[16]	Aminoguanidine ^[16]	Glucosamine ^[20]	Metformin ^[21]	Cysteine ^[16,22]
Working concentration	20 mmol/L	0.5 mmol/L	0.1 mmol/L	5 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L
Mother solution concentration	2 mol/L	0.05 mol/L	0.1 mol/L	0.5 mol/L	1 mol/L	1 mol/L
Cost (¥/L)	122.5	1.57	0.071	23.3	0.038	0.038

1.2.5 分析方法

丙酮酸、乳酸和苹果酸均采用高效液相色谱检测, 使用色谱柱为 Aminex HPX-87H (7.8 mm×300 mm; Bio-Rad), 在 30 °C 条件下采用 0.05 mmol/L 硫酸作为流动相, 进样量为 10 μL, 流速为 0.6 mL/min。

2 结果与分析

2.1 抗衰老药物对大肠杆菌存活率的影响

存活率是指每一个微生物细胞经过一定时间培养以后生存的机率, 存活率是研究细胞 CLS 的主要方法^[25-27]。因此, 我们首先检测了肌肽、叶酸、氨基胍、氨基葡萄糖、二甲双胍和半胱氨酸 6 种抗衰老药物对 *E. coli* 存活率的影响。此外, 利用代谢工程策略可以将 *E. coli* ATCC8739 改造为优秀的微生物细胞工厂, 已被用于改造生产苹果酸^[28]、琥珀酸^[28]、丁酸^[2]、莽草酸^[29]、葡萄糖二酸^[30]和聚乳酸-3-羟基丁酸^[31]等多种工业化学品, 因此本研究选择 *E. coli* ATCC8739 作为筛选抗衰老药物的模式微生物。如图 1 所示, 可以得出如下结论: (1) 培养 48 h 后, 抗衰老药物氨基胍、氨基葡萄糖、半胱氨酸和肌肽分别使 *E. coli* 的存活率增加了 9.8%、351.0%、56.9% 和 47.1%, 有研究表明微生物在生长过程中由非酶促反应积累的晚期糖基化终产物可以加速细胞衰老, 在原核微生物中, 抗衰老药物氨基胍、半胱氨酸、肌肽和叶酸可以抑制晚期糖基化的形成, 从而减缓细胞衰老, 延长细胞寿命^[16]; 半胱氨酸包含关键的巯基 (硫醇基), 使其成为有效的抗氧化剂, 可以减少胞内活性氧的积累, 从而有效地减缓细胞

损伤减缓细胞衰老^[19]。(2) 在培养 48–148 h 时间段内, 抗衰老药物氨基葡萄糖可以显著增加 *E. coli* 的存活率, 文献报道氨基葡萄糖可以作为脂质过氧化产物的丙二醛清除剂, 从而保护细胞并延缓其衰老^[20]; 氨基葡萄糖能够通过激活 AMP 活化蛋白激酶以降低葡萄糖代谢, 同时促进线粒体生物合成, 其机制为 N-乙酰氨基葡萄糖能够提高内质网蛋白内稳态, 进而起到延长细胞寿命的作用^[32], 所以氨基葡萄糖可以显著改善菌体的存活率。(3) 培养 120 h 后, 在相同的检测时间点, 实验组与对照组的 *E. coli* 存活率差异越来越小, 表明抗衰老药物增加存活率的能力随着培养时间的增加而逐渐减弱, 说明添加的抗衰老药物是参与了菌体自身的代谢而被消耗, 即抗衰老药

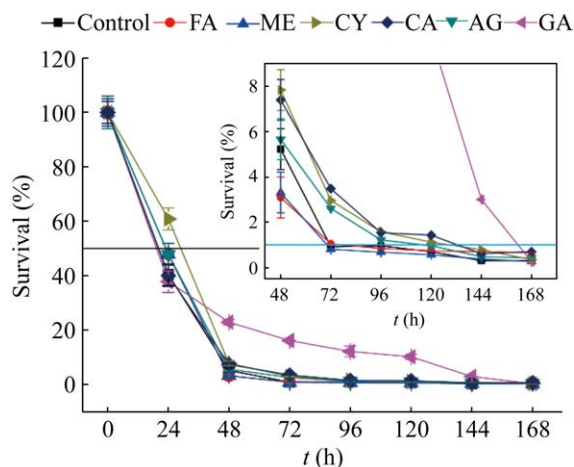
图 1 不同抗衰老药物对 *E. coli* 存活率的影响

Fig. 1 Effect of anti-aging drugs on the survival rate of *E. coli*. FA: folic acid; ME: metformin; AG: aminoguanidine; GA: glucosamine; CY: cysteine; CA: carnosine.

物维持菌体的存活率具有时效性,这也表明抗衰老药物只是延长了菌体存活的时间(延缓了菌体衰老),但是随着培养时间的进行菌体还是会老化(死亡)。

2.2 延长时序寿命的抗衰老药物的筛选

当 99%的酵母细胞在 YPD 培养板上无法形成菌落时,酵母在此之前存活的时间就是其时序寿命时间 CLS^[33]。借鉴酵母细胞 CLS 的概念,我们定义当 99%的 *E. coli* 在 LB 培养板上无法形成菌落时, *E. coli* 在此之前存活的时间就是其 CLS, CLS 越长说明该菌株存活能力越强。同时借鉴半衰期的概念,我们也定义当 50%的 *E. coli* 在 LB 培养板上无法形成菌落时, *E. coli* 在此之前存活的时间就是其半时序型寿命(Half chronological lifespan, HCLS), HCLS 越大说明该菌株活力越强。根据图 1 中 *E. coli* 的存活率的变化,计算出 *E. coli* 在添加不同抗衰老药物条件下的 HCLS,结果见图 2A:(1)添加抗衰老药物半胱氨酸对 *E. coli* 的 HCLS 延长效果最为明显,增加了 54%,达到 29.1 h;(2)添加叶酸、二甲双胍和氨基胍分别使 *E. coli* 的 HCLS 均增加 21.0%;(3)添加氨基葡萄糖使 *E. coli* 的 HCLS 短了 7.4%,而添加肌肽对 *E. coli* 的 HCLS 没有显著的作用效果。对 *E. coli* 的 HCLS 延长能力为:半胱氨酸>叶酸=二甲双胍=氨基胍。CLS 的变化如图 2B 所示:(1)添加抗衰老药物氨基葡萄糖对 *E. coli* 的 CLS 延长效果最为显著,增加了 1.2 倍;(2)添加半胱氨酸、肌肽和氨基胍分别使 *E. coli* 的 CLS 延长了 80.0%、80.0%和 50.0%;(3)添加叶酸和二甲双胍对 *E. coli* 的 CLS 延长了效果不明显,仅增加了 10.0%。因此,我们选择的 6 种抗衰老药物,对 *E. coli* 的 CLS 延长能力为:氨基葡萄糖>半胱氨酸=肌肽>氨基胍>叶酸=二甲双胍>对照组。

以上结果表明相同的抗衰老药物对 *E. coli* 的 HCLS 和 CLS 的作用效果是不同的。此外,根据抗衰老药物对 HCLS 的影响,我们选择半胱氨酸

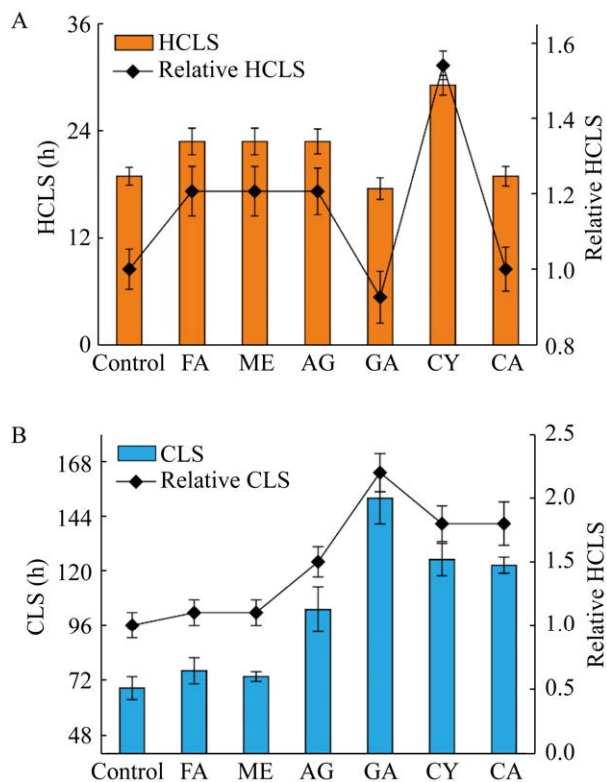


图 2 不同抗衰老药物对 *E. coli* 时序寿命的影响

Fig. 2 Effects of FA, ME, AG, GA, CY and CA on the HCLS and CLS of *E. coli*. (A) Effects of FA, ME, AG, GA, CY and CA on the HCLS of *E. coli*. (B) Effects of FA, ME, AG, GA, CY and CA on the CLS of *E. coli*.

进行下一步实验;其次,根据抗衰老药物对 CLS 的影响,我们选择氨基葡萄糖、氨基胍和肌肽进行下一步实验。

2.3 时序寿命对内源路径细胞工厂的影响

2.3.1 检测抗衰老药物延长时序寿命的适用性

为了评价延长 CLS 的抗衰老药物是否具有菌株特异性,我们检测半胱氨酸、氨基葡萄糖、氨基胍和肌肽 4 种抗衰老药物对不同 *E. coli* 细胞 CLS 的影响。*E. coli* F0601 (F0601) 是在 *E. coli* W3110 中敲除乳酸脱氢酶、丙酮酸氧化酶、丙酮酸甲酸裂解酶、磷酸乙酰转移酶-乙酸激酶和乙醇脱氢酶,获得一株产丙酮酸的 *E. coli*^[23],我们检测了半胱氨酸、氨基葡萄糖、氨基胍和肌肽 4 种抗衰老药物对 F0601 的 HCLS (图 3A) 和 CLS (图 3B)

的影响：4种抗衰老药物对 F0601 的 HCLS 延长能力为：肌肽>氨基胍>半胱氨酸>氨基葡萄糖；4种抗衰老药物对 F0601 的 CLS 延长能力为：氨基葡萄糖>肌肽>氨基胍>半胱氨酸。

E. coli GL0002 (GL0002) 是在 *E. coli* ATCC8739 中敲除乙酸激酶和乙醇脱氢酶获得的一株产乳酸的 *E. coli*^[6]，考察半胱氨酸、氨基葡萄糖、氨基胍和肌肽 4 种抗衰老药物对 GL0002 的 HCLS (图 3C) 和 CLS (图 3D)，4 种抗衰老药物对 GL0002 的 HCLS 延长能力为：肌肽>半胱氨酸>氨基葡萄糖>氨基胍；4 种抗衰老药物对 GL0002 的 CLS 延长能力为：肌肽>半胱氨酸>氨基胍>氨基葡萄糖。因此半胱氨酸、肌肽、氨基胍和氨基葡萄糖 4 种抗衰老药物提供了一种无菌株特异性的延长 *E. coli* 细胞 CLS 的方法。

2.3.2 时序寿命对内源路径细胞工厂的影响

为了评价延长 CLS 对 *E. coli* 细胞工厂发酵性

能的影响，考察添加抗衰老药物后 F0601 工程菌发酵性能的变化，对 F0601 发酵终点丙酮酸的产量和得率进行比较分析，结果如图 4 所示：(1) 相对于对照组，延长 CLS 可以不同程度地增加丙酮酸产量和得率；(2) 当添加半胱氨酸时丙酮酸的产量增加了 21.7%，达到了 17.4 g/L (对照组 14.3 g/L)，丙酮酸的得率增加了 25.0%，达到了 0.40 g/g (对照组 0.32 g/g)；(3) 当添加氨基胍、氨基葡萄糖和肌肽时，丙酮酸的产量分别为 15.8 g/L、16.7 g/L 和 15.8 g/L，相对于对照组分别增加了 10.5%、16.8% 和 10.5%。

进一步研究添加抗衰老药物对 GL0002 工程菌发酵性能的影响，对 GL0002 发酵终点乳酸的产量和得率进行了比较分析，由图 5 可知：(1) 延长 CLS 可以不同程度地改变乳酸产量；(2) 发酵 36 h，乳酸产量达到最大，其中添加氨基葡萄糖的实验组，乳酸产量增加 8.8%，达到了 23.4 g/L (对

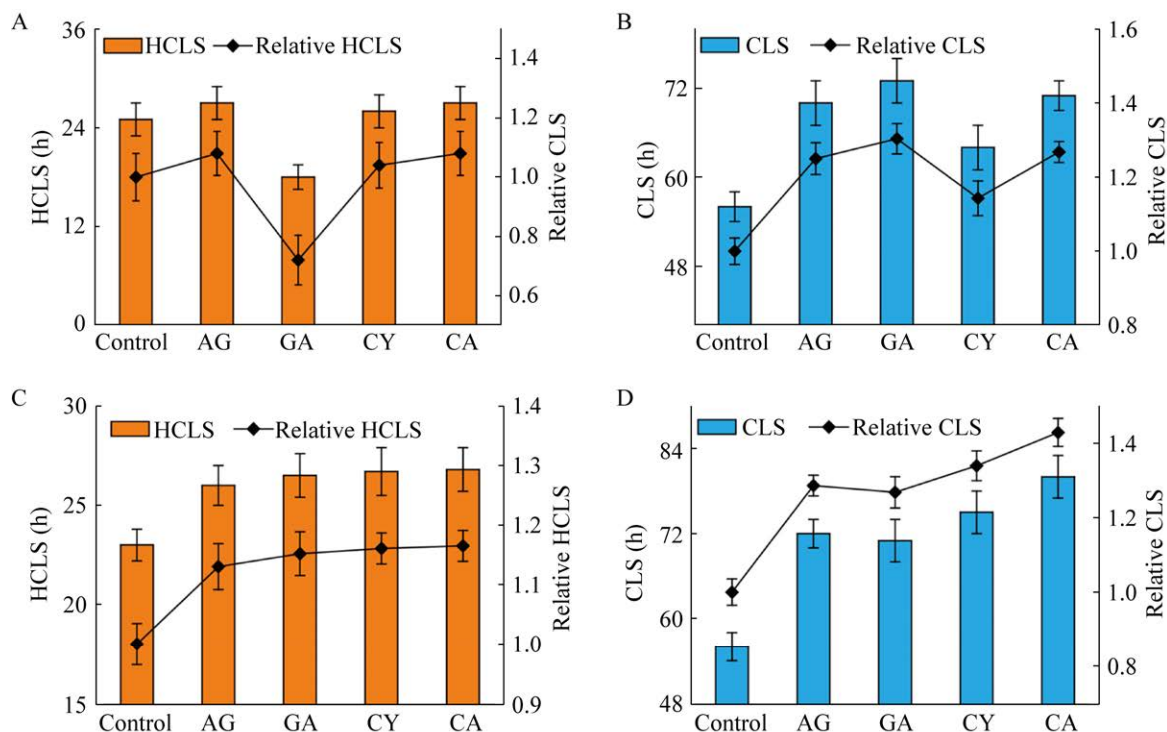


图 3 不同抗衰老药物对 F0601 和 GL0002 时序寿命的影响

Fig. 3 Effects of AG, GA, CY and CA on the HCLS and CLS of *E. coli*. (A) Effects of AG, GA, CY and CA on the HCLS of F0601. (B) Effects of AG, GA, CY and CA on the CLS of F0601. (C) Effects of AG, GA, CY and CA on the HCLS of GL0002. (D) Effects of AG, GA, CY and CA on the CLS of GL0002.

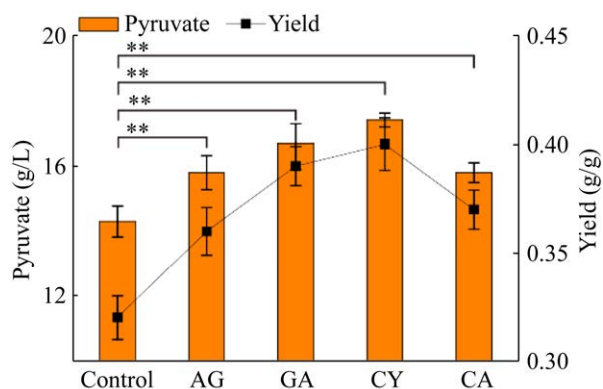


图4 不同抗衰老药物对 F0601 发酵性能的影响
Fig. 4 Effects of AG, GA, CY and CA on the fermentation performance of F0601.

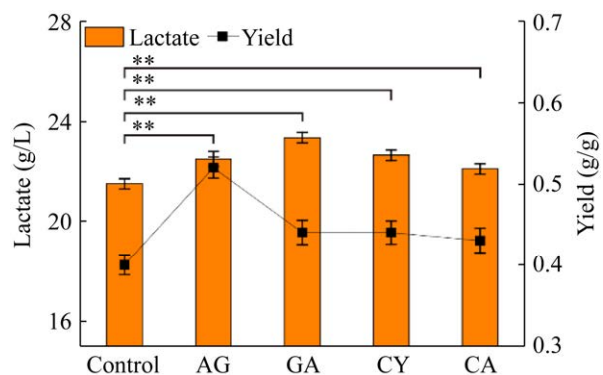


图5 不同抗衰老药物对 GL0002 发酵性能的影响
Fig. 5 Effects of AG, GA, CY and CA on the fermentation performance of GL0002.

照组 21.5 g/L); (3) 半胱氨酸和肌肽的实验组, 乳酸的产量相对于对照组分别增加了 5.6% 和 2.8%, 达到 22.7 g/L 和 22.1 g/L; (4) 添加氨基胍的实验组乳酸得率增加了 30%, 达到了 0.52 g/g (对照组 0.4 g/g); (5) 添加氨基葡萄糖、半胱氨酸和肌肽的实验组乳酸的得率分别为 0.44 g/g、0.44 g/g 和 0.43 g/g, 相较于对照组分别增加了 10.0%、10.0% 和 7.5%。

上述研究结果表明, 添加的抗衰老药物不仅增加了工程菌 F0601 和 GL0002 的 CLS, 而且也增加了丙酮酸和乳酸的产量与得率, 表明延长细胞 CLS 可以提高具有内源性代谢路径 *E. coli* 细胞工厂的生产性能。

2.4 时序寿命对异源路径细胞工厂的影响

E. coli FH989 (FH989) 是在 *E. coli* 中引入来源于集胞藻 PCC 6803 的 5-磷酸核酮糖激酶、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶、碳酸酐酶和来源于产琥珀酸放线杆菌的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶, 构建了一株产苹果酸工程菌^[24]。考察半胱氨酸、氨基葡萄糖、氨基胍和肌肽对工程菌 FH989 的发酵性能的影响, 图 6A 表示添加不同抗衰老药物对 FH989 菌体浓度的影响, 采用菌体浓度变化的趋势线来反应菌体死亡情况, 并定义趋势线的斜率代表菌体的死亡速率 (单位时间内菌体浓度的减少量), 斜率越小说明其死亡速率越大。由图 6A 可知: (1) 通过添加抗衰老药物延长 CLS 可以不同程度地减缓菌体的死亡; (2) 抗衰老药物减缓菌体的能力依次为肌肽>氨基葡萄糖>氨基胍>半胱氨酸。

在发酵终点 (72 h) 检测苹果酸产量和得率的变化 (图 6B), 可以得出以下结论: (1) 通过添加抗衰老药物延长 CLS 可以增加苹果酸的产量和得率; (2) 添加氨基胍、氨基葡萄糖、半胱氨酸和肌肽的实验组苹果酸的产量分别增加了 13.3%、20.0%、16.7% 和 17.6%, 达到了 45.6 g/L、48.2 g/L、47.3 g/L 和 46.9 g/L; (3) 添加氨基胍、氨基葡萄糖、半胱氨酸和肌肽的实验组苹果酸的得率分别增加了 27.0%、9.1%、12.3% 和 18.2%, 达到了 1.04 g/g、0.893 g/g、0.92 g/g 和 0.968 g/g。本研究获得的苹果酸产量和得率的最高产量都非常接近 Hu 等^[24]的报道苹果酸的产量 (51.8 g/L) 和得率 (1.08 g/g) 最大值。因此, 延长 CLS 也可以增加具有异源代谢路径的 *E. coli* 细胞工厂的生产性能。

3 讨论

通过添加抗衰老药物可以延长微生物细胞的 CLS, 同时改善细胞工厂的发酵性能。抗衰老药物半胱氨酸、肌肽、氨基胍和氨基葡萄糖提供一种无菌株特异性的延长 *E. coli* 细胞 CLS 和 HCLS 的方法。延长 *E. coli* 细胞 CLS 不仅可以增加具有

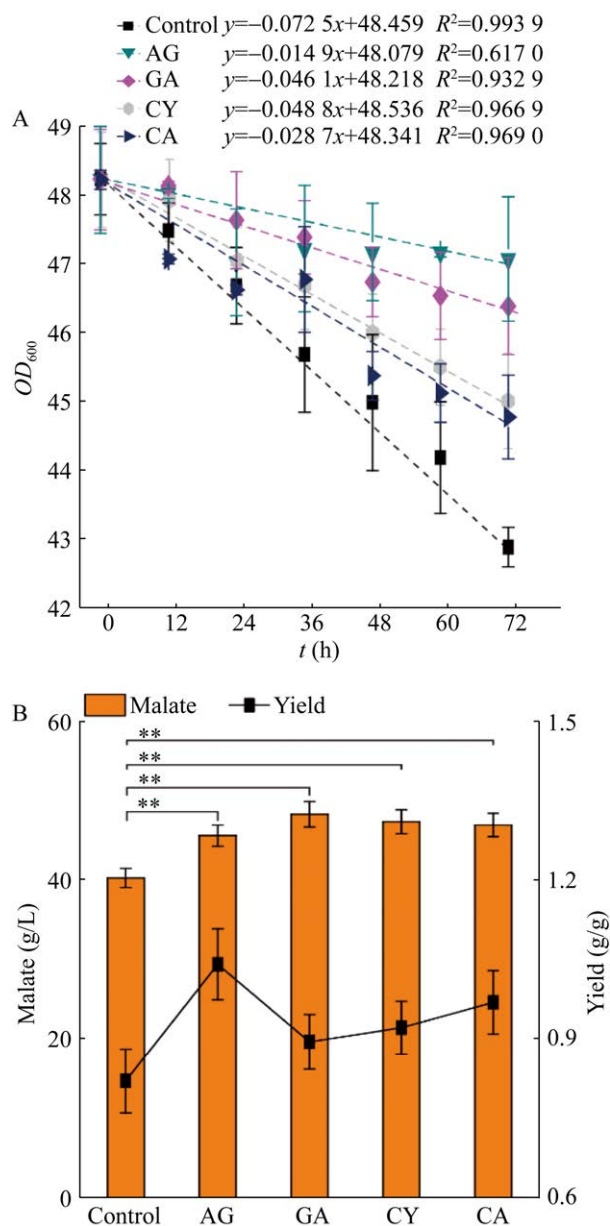


图6 不同抗衰老药物对FH989发酵性能的影响
Fig. 6 Effects of AG, CA, CY and CA on the fermentation performance of FH989. (A) Effects of AG, CA, CY and CA on the cell growth of FH989. (B) Effects of AG, CA, CY and CA on the malate production of FH989.

本源代谢路径的 *E. coli* 细胞工厂的性能用于改善乳酸和丙酮酸的生产,而且也可以增加具有异源代谢路径的 *E. coli* 细胞工厂的性能用于改善苹果酸的生产。Causey 等^[34]通过对 *E. coli* 进行基因工程

改造和发酵优化,在葡萄糖过量的情况下,使丙酮酸的产量和得率分别达到 65.8 g/L 和 0.75 g/g。Zhou 等^[35]通过对 *E. coli* 冗余代谢支路的去除,以及结合乳酸脱氢酶基因转录水平微调,使乳酸的产量和得率分别达到 125.0 g/L 和 0.866 g/L。虽然本研究获得丙酮酸和乳酸的产量与得率与上述文献报道的最优生产性能还有一定的差距,但是本研究所采取的调控微生物细胞寿命的方法对构建 *E. coli* 细胞仍具有一定的参考价值。此外,本研究还发现微生物细胞 CLS 并不是越长越有利于提高细胞工厂的性能,这表明微生物细胞的 CLS 与细胞工厂生产性能之间存在一种平衡。

总之,延长微生物细胞寿命提供了一种潜在的改善细胞工厂生产性能的方法。延长微生物细胞寿命不仅可以改善微生物细胞工厂的生理状态,而且还可以将细胞工厂的新陈代谢与细胞命运耦合。尽管 *E. coli* 历经了数百万年的进化,但其细胞 CLS 却是可塑性的,因此有望促进代谢工程和合成生物学的发展。

REFERENCES

- [1] Chen XL, Gao C, Guo L, et al. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals. *Chem Rev*, 2018, 118(1): 4-72.
- [2] Guo L, Diao WW, Gao C, et al. Engineering *Escherichia coli* lifespan for enhancing chemical production. *Nat Catal*, 2020, 3(3): 307-318.
- [3] Guo L, Pang ZX, Gao C, et al. Engineering microbial cell morphology and membrane homeostasis toward industrial applications. *Curr Opin Biotech*, 2020, 66: 18-26.
- [4] 薛飞燕, 杨明峰, 马兰青, 等. 微生物法合成红景天苷. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1184-1192.
Xue FY, Yang MF, Ma LQ, et al. Microbial synthesis of salidroside. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1184-1192 (in Chinese).
- [5] 叶超, 徐楠, 陈修来, 等. 应用代谢网络模型解析工

- 业微生物胞内代谢. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1901-1913.
- Ye C, Xu N, Chen XL, et al. Application of metabolic network model to analyze intracellular metabolism of industrial microorganisms. *Chin J Biotech*, 2019, 35(10): 1901-1913 (in Chinese).
- [6] Guo L, Zhang F, Zhang C, et al. Enhancement of malate production through engineering of the periplasmic rTCA pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(6): 1571-1580.
- [7] Książek K. Bacterial aging: from mechanistic basis to evolutionary perspective. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(18): 3131-3137.
- [8] Boehm A, Arnoldini M, Bergmiller T, et al. Genetic manipulation of glycogen allocation affects replicative lifespan in *E. coli*. *PLoS Genet*, 2016, 12(4): e1005974.
- [9] Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, et al. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab*, 2012, 16(1): 18-31.
- [10] Orozco H, Matallana E, Aranda A. Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 1.
- [11] Picazo C, Orozco H, Matallana E, et al. Interplay among Gcn5, Sch9 and mitochondria during chronological aging of wine yeast is dependent on growth conditions. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0117267.
- [12] Orozco H, Matallana E, Aranda A. Two-carbon metabolites, polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 104.
- [13] Finkel SE. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(2): 113-120.
- [14] Piper PW, Harris NL, MacLean M. Preadaptation to efficient respiratory maintenance is essential both for maximal longevity and the retention of replicative potential in chronologically ageing yeast. *Mech Ageing Dev*, 2006, 127(9): 733-740.
- [15] Kazi RS, Banarjee RM, Deshmukh AB, et al. Glycation inhibitors extend yeast chronological lifespan by reducing advanced glycation end products and by back regulation of proteins involved in mitochondrial respiration. *J Proteomics*, 2017, 156: 104-112.
- [16] Pepper ED, Farrell MJ, Nord G, et al. Antiglycation effects of carnosine and other compounds on the long-term survival of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2010, 76(24): 7925-7930.
- [17] Burcham PC. Potentialities and pitfalls accompanying chemico-pharmacological strategies against endogenous electrophiles and carbonyl stress. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(4): 779-786.
- [18] Storelli G, Téfit M, Leulier F. Metformin, microbes, and aging. *Cell Metab*, 2013, 17(6): 809-811.
- [19] 孙全贵, 龙子, 张晓迪, 等. 抗氧化系统研究新进展. *现代生物医学进展*, 2016, 16(11): 2197-2200, 2190. Sun QG, Long Z, Zhang XD, et al. Novel progress in antioxidant system. *Prog Mod Biomed*, 2016, 16(11): 2197-2200, 2190 (in Chinese).
- [20] Fang C, Peng MJ, Li GL, et al. New functions of glucosamine as a scavenger of the lipid peroxidation product malondialdehyde. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(6): 947-953.
- [21] Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, et al. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds: possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(11): 1765-1773.
- [22] Awano N, Wada M, Mori H, et al. Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(7): 4149-4152.
- [23] Dong XX, Chen XL, Qian YY, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 to produce L-malate. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(3): 656-664.
- [24] Hu GP, Zhou J, Chen XL, et al. Engineering synergetic CO₂-fixing pathways for malate production. *Metab Eng*, 2018, 47: 496-504.
- [25] Han B, Sivaramkrishnan P, Lin CCJ, et al. Microbial genetic composition tunes host longevity. *Cell*, 2017, 169(7): 1249-1262.e3.

- [26] Orlandi I, Stamerra G, Strippoli M, et al. During yeast chronological aging resveratrol supplementation results in a short-lived phenotype Sir2-dependent. *Redox Biol*, 2017, 12: 745-754.
- [27] Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun*, 2015, 6: 7983.
- [28] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(5): 1140-1153.
- [29] Gao C, Hou JS, Xu P, et al. Programmable biomolecular switches for rewiring flux in *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3751.
- [30] Hou JS, Gao C, Guo L, et al. Rewiring carbon flux in *Escherichia coli* using a bifunctional molecular switch. *Metab Eng*, 2020, 61: 47-57.
- [31] Ding Q, Ma DL, Liu GQ, et al. Light-powered *Escherichia coli* cell division for chemical production. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2262.
- [32] Weimer S, Priebs J, Kuhlow D, et al. D-glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nat Commun*, 2014, 5: 3563.
- [33] Norris A, Boeke JD. Silent information regulator 3: the Goldilocks of the silencing complex. *Genes Dev*, 2010, 24(2): 115-122.
- [34] Causey TB, Shanmugam KT, Yomano LP, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(8): 2235-2240.
- [35] Zhou L, Niu DD, Tian KM, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2012, 14(5): 560-568.

(本文责编 郝丽芳)