

• 工业生物技术 •

## 异源表达多巴脱羧酶促进大肠杆菌从头合成多巴胺

宋富强<sup>1,2,3</sup>, 陈五九<sup>2</sup>, 吴凤礼<sup>2</sup>, 王晓霜<sup>2,3</sup>, 路福平<sup>1,3</sup>, 王钦宏<sup>2</sup>

1 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 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

3 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

宋富强, 陈五九, 吴凤礼, 等. 异源表达多巴脱羧酶促进大肠杆菌从头合成多巴胺. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4266-4276.

Song FQ, Chen WJ, Wu FL, et al. Heterogeneous expression of DOPA decarboxylase to improve the production of dopamine in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4266-4276.

**摘要:**多巴胺是多种天然抗氧化药物生物合成的前体物质, 在人体内作为神经递质调控中枢神经系统的多种生理功能, 常用于多种类型休克的临床治疗。目前, 通过微生物合成技术已经实现了多巴胺的从头合成, 但是合成效率很低。针对该问题, 在左旋多巴 (L-DOPA) 大肠杆菌工程菌基础上, 利用不同拷贝数质粒表达野猪 *Sus scrofa* 来源的多巴脱羧酶基因 *Ssddc*, 实现了葡萄糖到多巴胺的生产。为了进一步提高多巴胺合成效率, 从 100 个候选基因中筛选出 5 个多巴脱羧酶基因进行测试, 其中来源于人 *Homo sapiens* 多巴脱羧酶基因 *Hsddc* 的工程菌摇瓶发酵的多巴胺产量最高, 达到 3.33 g/L; 而来源于果蝇 *Drosophila melanogaster* 多巴脱羧酶基因 *Dmddc* 的工程菌摇瓶发酵的左旋多巴残余量最低, 仅有 0.02 g/L; 这两株工程菌分批补料发酵表明, 多巴胺的产量可以分别达到 13.3 g/L 和 16.2 g/L, 左旋多巴残余量分别是 0.45 g/L 和 0.23 g/L。将多巴脱羧酶基因 *Dmddc* 和 *Ssddc* 分别整合到基因组上, 获得遗传稳定的工程菌, 在分批补料发酵条件下, 多巴胺产量最高达到 17.7 g/L, 是目前国内外报道的最高产量。

**关键词:** 大肠杆菌, 代谢工程, L-左旋多巴, 多巴胺, 多巴脱羧酶

**Received:** January 5, 2021; **Accepted:** April 22, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901402), Scientific Instrument Developing Project of Chinese Academy of Sciences, China (No. YJKYYQ20170023).

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

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901402), 中国科学院科研装备项目 (No. YJKYYQ20170023) 资助。

网络出版时间: 2021-04-29

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210428.1711.004.html>

# Heterogeneous expression of DOPA decarboxylase to improve the production of dopamine in *Escherichia coli*

Fuqiang Song<sup>1,2,3</sup>, Wujiu Chen<sup>2</sup>, Fengli Wu<sup>2</sup>, Xiaoshuang Wang<sup>2,3</sup>, Fuping Lu<sup>1,3</sup>, and Qinhong Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

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

<sup>3</sup> College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Dopamine is the precursor of a variety of natural antioxidant compounds. In the body, dopamine acts as a neurotransmitter that regulates a variety of physiological functions of the central nervous system. Thus, dopamine is used for the clinical treatment of various types of shock. Dopamine could be produced by engineered microbes, but with low efficiency. In this study, DOPA decarboxylase gene from *Sus scrofa* (*Ssdcc*) was cloned into plasmids with different copy numbers, and transformed into a previously developed L-DOPA producing strain *Escherichia coli* T004. The resulted strain was capable of producing dopamine from glucose directly. To further improve the production of dopamine, a sequence-based homology alignment mining (SHAM) strategy was applied to screen more efficient DOPA decarboxylases, and five DOPA decarboxylase genes were selected from 100 candidates. In shake-flask fermentation, the DOPA decarboxylase gene from *Homo sapiens* (*Hsdcc*) showed the highest dopamine production (3.33 g/L), while the DOPA decarboxylase gene from *Drosophila Melanogaster* (*Dmdcc*) showed the least residual L-DOPA concentration (0.02 g/L). In 5 L fed-batch fermentations, production of dopamine by the two engineered strains reached 13.3 g/L and 16.2 g/L, respectively. The residual concentrations of L-DOPA were 0.45 g/L and 0.23 g/L, respectively. Finally, the *Ssdcc* and *Dmdcc* genes were integrated into the genome of *E. coli* T004 to obtain genetically stable dopamine-producing strains. In 5 L fed-batch fermentation, 17.7 g/L of dopamine was produced, which records the highest titer reported to date.

**Keywords:** *Escherichia coli*, metabolic engineering, L-DOPA, dopamine, DOPA decarboxylase

多巴胺 (Dopamine) 作为一种简单的儿茶酚胺类化合物, 是去甲肾上腺素和肾上腺素的合成前体, 也可作为神经递质调控中枢神经系统的多种生理功能。多巴胺系统调节障碍可能引起帕金森病、精神分裂症、Tourette 综合症、注意力缺陷多动综合症、垂体肿瘤等症状的发生<sup>[1]</sup>。因此, 可作为急救药剂, 用于临床各种类型休克治疗。与此同时, 随着材料表面工程在电子、生物医学等领域的广泛应用, 近年来, 多巴胺也被开发用于物质的表面修饰<sup>[2]</sup>。

利用微生物合成技术可以高效生产多种芳香族化合物, 例如苯甲酸<sup>[3]</sup>、L-苯丙氨酸<sup>[4]</sup>、L-酪氨酸<sup>[5]</sup>、左旋多巴<sup>[6]</sup>、多巴胺<sup>[7]</sup>、酪醇<sup>[5]</sup>、3,4-二羟基苯乙酸<sup>[8]</sup>、羟基酪醇<sup>[9]</sup>、红景天苷<sup>[10]</sup>等。多巴

胺作为合成羟基酪醇、羟基红景天苷等高附加值化学品的合成前体, 受到了研究人员广泛的关注。Das 等<sup>[11]</sup>报道了利用大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  表达 4-羟基苯乙酸-3-单加氧酶 (HpaBC) 和野猪 *Sus scrofa* 的多巴脱羧酶 (DDC) 编码基因, 以酪氨酸为底物, 摇瓶发酵培养 24 h, L-DOPA 和多巴胺产量分别为 26 mg/L 和 27 mg/L。Nakagawa 等<sup>[7]</sup>利用敲除 *tyrR* 的大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, 通过双质粒系统 pCOLADuet-1-*tyrA*<sup>fb</sup>-*aroG*<sup>fb</sup>-*tktA*-*ppsA* 和 pET23a-RsTYR-DODC 表达多巴胺合成途径关键基因, 获得的工程菌株可以将 978 mmol/L 甘油 (90 g/L) 合成 14 mmol/L (2.15 g/L) 的多巴胺, 摩尔转化率为 3.8%。笔者所在研究组前期通过对基因组上的 *galP*、*glk*、*pgi*、

*pykAF*、*aroF*、*aroE*、*tktA* 等 10 个基因进行组合调控,构建出高产 3-脱氢莽草酸工程菌 WJ060<sup>[12]</sup>,该工程菌在 5 L 发酵罐中以葡萄糖为碳源,发酵 52 h 后 3-脱氢莽草酸产量达到 94.4 g/L。在该工程菌的基础上,利用组成型强启动子  $P_{M1-93}$ <sup>[13]</sup>在基因组上过表达 *aroE*、*tyrA<sup>fbr</sup>*、*hpaBC* 三个基因,强化左旋多巴合成途径,得到工程菌 T004。该菌在 5 L 发酵罐中补料发酵培养 60 h,左旋多巴产量达到 60.4 g/L,葡萄糖摩尔转化率为 16.8%<sup>[14]</sup>。

本研究在左旋多巴大肠杆菌工程菌株 T004 基础上<sup>[15]</sup>,通过筛选高效多巴脱羧酶,实现重组大肠杆菌高效合成多巴胺,合成途径如图 1 所示。该工作可以为多巴胺以及下游芳香族衍生物的绿

色生物合成研究提供高效的多巴脱羧酶。

## 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 所示。

#### 1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素钠 (工作浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、氯霉素 (工作浓度 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、硫酸卡那霉素 (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与 DNA 回收试剂盒购自康为世纪公司;快速克隆重组酶 *SooSoMix* 购自擎科生物公司;TransStart Fast *Pfu* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术公司。

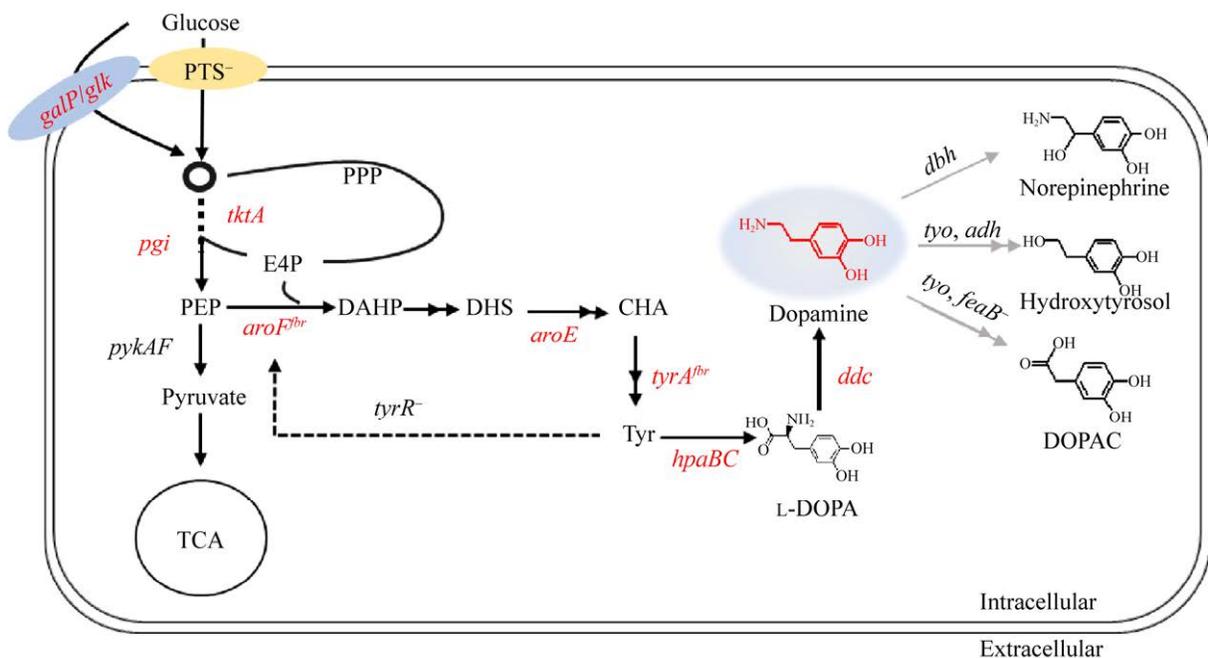


图 1 大肠杆菌中多巴胺生物合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of dopamine in *E. coli*. The “red” indicates that the genes are enhanced. The “-” indicates that the genes are deleted. The gray arrows indicate that the pathway is extended. PTS: phosphotransferase system; TCA: tricarboxylic acid cycle; PPP: pentose phosphate pathway; *pgi*: glucosephosphate isomerase gene; E4P: D-erythrose 4-phosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; DAHP: 3-deoxy-arabino-heptulonate 7-phosphate; DHS: 3-dehydroshikimate; CHA: chorismate; Tyr: L-tyrosine; DOPAC: 3,4-dihydroxy phenylacetic acid; *tyrA*: CHA mutase/prephenate dehydrogenase gene; *aroE*: dehydroshikimate reductase gene; *hpaBC*: 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase gene; *galP*: galactose permease gene; *glk*: glucokinase gene; *tktA*: transketolase I gene; *pykAF*: pyruvate kinase I/II gene; *aroF*: DAHP synthase gene; *tyrR*: tyrosine repressor; *ddc*: DOPA decarboxylase gene; *dbh*: dopamine  $\beta$  hydroxylase; *tyo*: tyramine oxidase gene; *feaB*: phenylacetaldehyde dehydrogenase gene; *adh*: alcohol dehydrogenase gene.

### 1.1.3 培养基

LB 培养基 (1 L): 5 g 酵母提取物, 10 g 蛋白胨, 10 g NaCl, 固体平板添加 15–20 g 琼脂粉。  
蔗糖 LB 培养基 (1 L): 5 g 酵母提取物, 10 g 蛋白胨, 100 g 蔗糖, 固体平板添加 15–20 g 琼脂粉。  
NBS 培养基 (1 L): 葡萄糖 20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  6.5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  3.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  15 mg,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.6 mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2 mg,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 mg,  $\text{ZnCl}_2$  0.2 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2 mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.05 mg。  
发酵种子培养基 (1 L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.6 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.6 g, 柠檬酸三钠二水合物 1.6 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.8 mg, 酵母提取物 1 g。  
发酵罐无机盐培养基 (3 L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  22.5 g,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 g, 酵母提取物 2 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.233 g, 柠檬酸 6 g。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组编辑

以 *E. coli* T004 为出发菌株, 利用 Red 两步同源重组无痕敲除基因技术实现目的基因整合至大肠杆菌基因组中<sup>[16]</sup>。首先以 *cat-sacB* 片段为模板, *FeaB-cat-sacB-F* 和 *FeaB-cat-sacB-R* 为引物扩增第一步同源重组片段, 该片段用于 *cat-sacB* 筛选标记基因替换原有基因 *feaB*。以大肠杆菌 ATCC8739 基因组为模板, *FeaB500U-F* 和 *FeaB500U-93-R* 为引物扩增片段 A; 以合成的野猪 *Sus scrofa* 来源的 *Ssddc* 基因为模板, *P93-F* 和 *SsDDC-R* 为引物扩增片段 B-I; 以大肠杆菌

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Names	Relevant characteristics	Sources
Plasmids		
pKD46	$\lambda$ -Red recombinant genes under ParaBAD promoter, temperature sensitive origin	[16]
pET30a (+)	Kan <sup>R</sup> , medium copyplasmid (~15/cell)	Lab collection
pACYC184	CmR, low copy plasmid (1–5/cell)	Lab collection
pACYC184-SsDDC	pACYC184 derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Ssddc</i> gene	This work
pET30a-SsDDC	pET30a derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Ssddc</i> gene	This work
pET30a-EcDDC	pET30a derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Ecddc</i> gene	This work
pET30a-HsDDC	pET30a derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Hsddc</i> gene	This work
pET30a-MmDDC	pET30a derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Mmddc</i> gene	This work
pET30a-DrDDC	pET30a derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Drddc</i> gene	This work
pET30a-DmDDC	pET30a derivative with P <sub>M1-93</sub> - <i>Dmddc</i> gene	This work
Strains		
T004	<i>E. coli</i> DSM 1576, P <sub>M1-37</sub> - <i>aroF</i> <sup>ibr</sup> , $\Delta$ <i>tyrR</i> , P <sub>M1-12</sub> - <i>galP</i> , P <sub>M1-93</sub> - <i>glk</i> , $\Delta$ <i>ptsI</i> , P <sub>M1-12</sub> - <i>pykA</i> *, P <sub>M1-12</sub> - <i>pykF</i> *, P <sub>M1-12</sub> - <i>pgi</i> *, P <sub>M1-93</sub> - <i>aroE</i> , P <sub>M1-93</sub> - <i>tyrA</i> <sup>ibr</sup> , P <sub>M1-93</sub> - <i>hpaBC</i>	[15]
TD01	<i>E. coli</i> T004, P <sub>M1-93</sub> - <i>Ssddc</i>	This work
TD03	<i>E. coli</i> T004, P <sub>M1-93</sub> - <i>Dmddc</i>	This work
TLD02	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a (+)	This work
TDA01	<i>E. coli</i> T004 harboring pACYC184-SsDDC	This work
TDA02	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a-SsDDC	This work
TDA03	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a-EcDDC	This work
TDA04	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a-HsDDC	This work
TDA05	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a-MmDDC	This work
TDA06	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a-DrDDC	This work
TDA07	<i>E. coli</i> T004 harboring pET30a-DmDDC	This work

ATCC8739 基因组为模板, FeaB500D-F 和 FeaB500D-R 为引物扩增片段 C; 以片段 A、B- I 和 C 为模板, FeaB500U-F 和 FeaB500D-R 为引物扩增得到第二步同源重组片段 D- I, 该片段是合成杂合元件片段 M1-93 调控的基因 *Ssddc*, 用于替换第一步整合的 *cat-sacB* 片段。同理, 以 P93-F 和 DmDDC-R 为引物扩增片段 B- II; 以片段 A、B- II 和 C 为模板, FeaB500U-F 和 FeaB500D-R 为引物扩增得到第二步同源重组片段 D- II, 该片段是合成杂合元件片段 M1-93 调控的基因 *Dmddc*, 用于替换第一步整合的 *cat-sacB* 片段。引物 FeaB500U-F 和 FeaB500D-R 同时作为第二步同源重组的验证引物。本研究所用引物见表 2。

### 1.2.2 质粒构建

以野猪来源的 SsDDC 氨基酸序列 (XP\_020919589.1) 为模板, 在 NCBI 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行序列比对, 获得许多 DDC 序列。选取其中 5 条 *ddc* 氨基酸序列, 按照大肠杆菌密码子偏好性优化后进行全基因合成。这些序列分别来自野马 *Equus caballus*、人类

*Homo sapiens*、家鼠 *Mus musculus*、斑马鱼 *Danio rerio*、果蝇 *Drosophila melanogaster*。在 NCBI 上氨基酸序列号分别为 XP\_001498371.1、NP\_000781.2、NP\_001177377.1、NP\_998507.1、NP\_724163.1。将不同物种来源的 *ddc*, 按照无缝克隆试剂盒上的方法分别连接至 pET30a (中拷贝) 或 pACYC184 (低拷贝) 载体上, 获得 *ddc* 基因表达载体 (表 1)。

### 1.2.3 发酵培养与控制

摇瓶发酵: 将单菌落接种于 3 mL 含抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜。取 200 μL 接种于 10 mL 含适当抗生素的 NBS 培养基中, 37 °C、250 r/min 培养 48 h。

5 L 发酵罐发酵: 挑取单菌落到含 3 mL LB 培养基的试管中, 30 °C、250 r/min 培养 12–14 h, 转接至 200 mL 发酵种子培养基中培养 18 h 至  $OD_{600}$  在 4 左右, 最终将种子液转接至含 1.8 L 的初始体积发酵培养基的 5 L 发酵罐体内。培养过程中需向培养基中添加硫酸卡那霉素至 50 μg/mL, 重组菌株在全自动 5.0 L 发酵系统 BIOTECH-5BG

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'-3')
P93-F	TTATCTCTGGCGGTGTTG
SsDDC-R	GCCGTTTTTACTTATGAGCGAACAAGATTAACCTTAATTTCTGCTTTGCCTTCTTCC
DmDDC-R	GCCGTTTTTACTTATGAGCGAACAAGATTACTGTTCCCTGTTCCATTTTCATCTGCG
FeaB500U-F	GACGCTCATCTGCTCCATT
FeaB500U-93-R	GTCAACACCGCCAGAGATAACACTTTTCCTTATTATTTACCCAGTGTGAT
FeaB500D-F	TCTTGTTTCGCTCATAAGTAAAAAACGGC
FeaB500D-R	TCCGGGCACGATTTCGTCTGTTGAG
FeaB-cat-sacB-F	GTACACTGAAATCACACTGGGTAATAATAAGGAAAAGTGGTGACGGAAGATCACTTC
FeaB-cat-sacB-R	ACGGCACCCAGGTGCCGTTTTTACTTATGAGCGAACAAGAATCAAAGGGAAAACCTGTC
<i>Nde</i> I -promoter -F	GATACATATGTTATCTCTGGCGGTGTTG
<i>Xho</i> I -DDC(Sus)-R	GATACTCGAGTTAACTCTTAATTTCTGCTTTGCC
<i>Xho</i> I -DDC-a-184-F	GCAGAAATTAAGAGTTAACTCGAGTATCCCTCGACCTGAATGGAAG
<i>Nde</i> I -promoter-184-R	CAACACCGCCAGAGATAACATATGTATCCGATGATAAGCTGTCAAAC
<i>Xho</i> I -EcDDC-R	GATACTCGAGTTATTCTTTTTCTGCTTTCAGCAGTTC
<i>Xho</i> I -HsDDC-R	GATACTCGAGTTATTACGTTCTGCACGCAG
<i>Xho</i> I -MmDDC-R	GATACTCGAGTTATTCTTTTTCTGCACGCAGAACG
<i>Xho</i> I -DrDDC-R	GATACTCGAGTTAATGCAGCAGCTCTTGCG
<i>Xho</i> I -DmDDC-R	GATACTCGAGTTACTGTTCCCTGTTCCATTTTCATCTG

中进行分批补料发酵。根据发酵液中残糖的含量来决定补加葡萄糖的量,补加原则是保持发酵液残糖含量控制在 0–5 g/L。培养基 pH 值通过自动添加氨水 (25%, W/W) 控制在 6.8,温度控制在 37 °C。以 1 vvm 通入空气,搅拌速度为 300–800 r/min,以保持溶解氧 (DO) 水平在 30%。当初始葡萄糖耗尽后,进行计划补料,维持葡萄糖浓度在 0–5 g/L,以保持菌株生长到所需的细胞密度。发酵过程中每间隔 4 h 取样一次,利用高效液相色谱检测发酵液中多巴胺、左旋多巴的含量,利用生物传感分析仪检测葡萄糖含量,利用分光光度计检测菌体密度 ( $OD_{600}$ )。

#### 1.2.4 高效液相色谱分析

发酵液样品利用 0.5 mmol/L 的 HCl 稀释至待测范围 (产物浓度: 0.1–1.0 g/L) 后,12 000 r/min 离心 10 min,用 0.22  $\mu$ m 水系滤膜过滤后进行液相色谱分析。高效液相色谱仪 (安捷伦 1260 系列) 配备 Innoval C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m) 和 DAD 紫外检测器。检测条件: 流动相 100% 甲醇: 1% 磷酸溶液=20: 80, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 上样量 10  $\mu$ L, 检测波长为 220 nm 和 280 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 *ddc* 拷贝数影响多巴胺生产

据报道,来自野猪的多巴脱羧酶可以特异性地将 L-DOPA 转化为多巴胺,广泛应用于多巴胺的生物合成研究<sup>[17-18]</sup>。笔者所在研究组前期已经构建了高产 L-DOPA 的工程菌株大肠杆菌 T004<sup>[15]</sup>。在此基础上,为了实现多巴胺的高效生物合成,分别在低拷贝质粒 pACYC184 和中等拷贝质粒 pET30a 上组成型表达野猪的多巴脱羧酶基因 *Ssddc*。将上述两个质粒分别转入大肠杆菌 T004 中,获得大肠杆菌 TDA01 和 TDA02 菌株。通过摇瓶发酵评价,利用高拷贝质粒表达 *Ssddc* 的 TDA02 菌株的多巴胺产量达到 2.18 g/L,显著高于利用低拷贝质粒表达 *Ssddc* 的 TDA01 菌株的

产量,但是 TDA02 菌株的 L-DOPA 残余量仍然达到 1.26 g/L (图 2)。对照菌株 T004 和 TDA01 菌株的发酵产物主要是 L-DOPA,只有极少量的多巴胺积累。该结果表明 DDC 催化 L-DOPA 到多巴胺的反应是限速步骤,通过增加基因拷贝数来提高 *Ssddc* 的表达量,从而提高 DDC 的总酶活力有助于获得更高的多巴胺产量。此外,发酵产物中仍有大量的 L-DOPA 残余,暗示着 L-DOPA 脱羧反应过程仍有较大的提升空间。

### 2.2 筛选高效 DDC 提高多巴胺产量

为了增强 L-DOPA 到多巴胺的催化转化能力,笔者继续筛选其他高效的 DDC。利用已报道的 SsDDC 蛋白序列为模板,在 NCBI 蛋白数据库中进行同源比对,获得 100 条同源性较高的 DDC 序列,去除重复序列,选取其中 45 条进行系统发育树分析。用 MEGA6.0 软件以邻近相连法 (Neighbor joining, NJ) 构建系统发育树,利用 Bootstrap 进行检验并设定初始值 1 000 次,模板序列 SsDDC 位于树形的根部 (图 3)。上述 45 条 DDC 序列分别来自不同物种,选取与模板序列的同源性最高的野马 *Equus caballus* 来源的 EcDDC 作为其中一条备选序列。其次选取 4 种不同类型

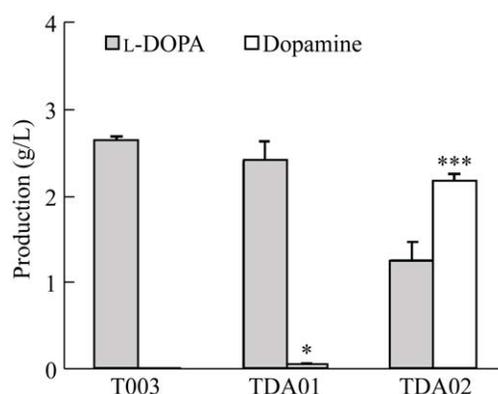


图 2 含有不同 *Ssddc* 拷贝数菌株的摇瓶发酵分析  
Fig. 2 Dopamine production and cell growth of engineered *E. coli* TDA01 and TDA02 with pACYC184-SsDDC and pET30a-SsDDC, respectively. Data are  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). Statistics were performed by the two-tailed Student's *t*-test. \*:  $P<0.05$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

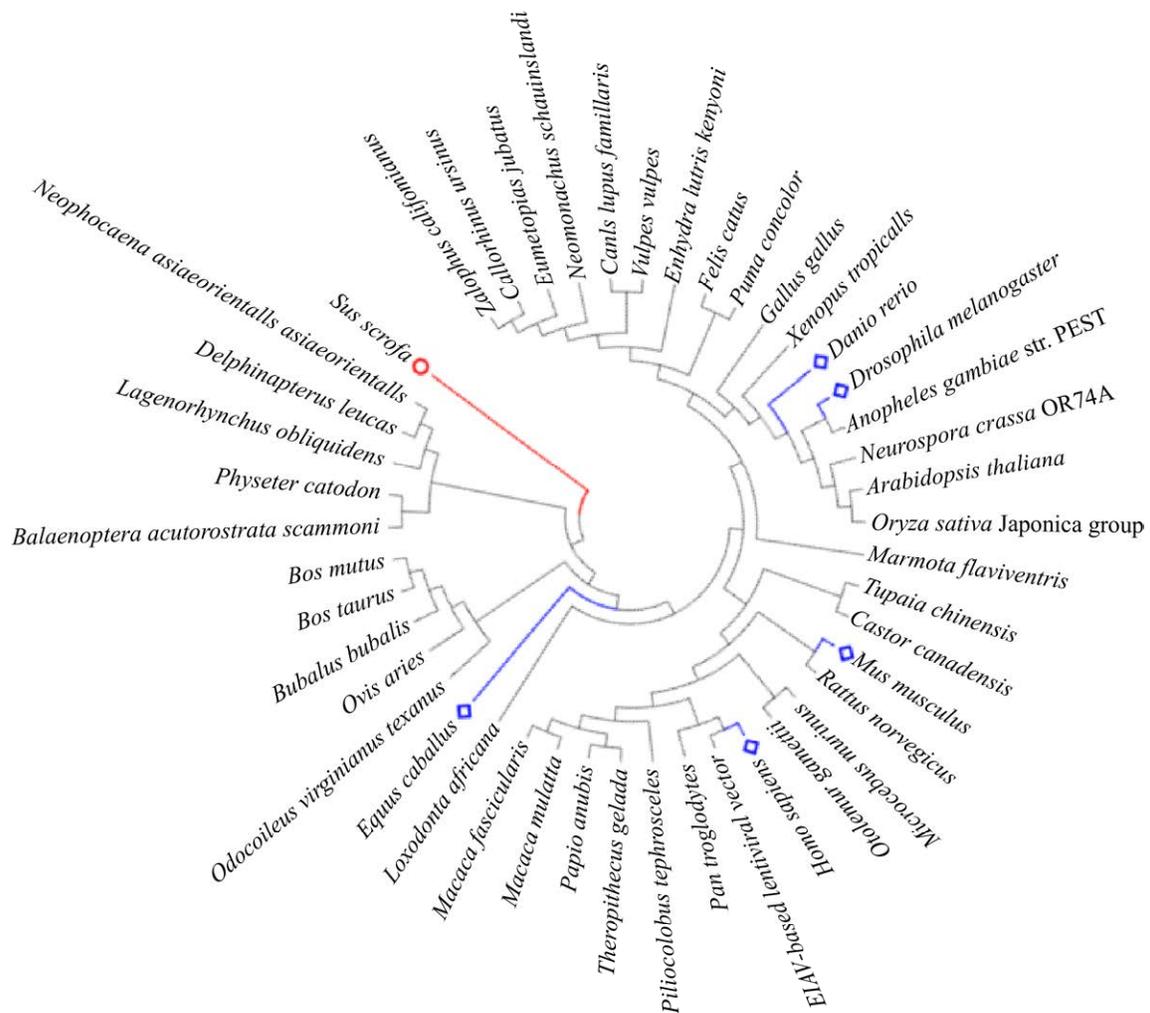


图3 不同物种来源 DDC 的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of DDC homologs from different organisms.

模式动物来源的 DDC，分别为智人 *Homo sapiens* HsDDC、小白鼠 *Mus musculus* MmDDC、斑马鱼 *Danio rerio* DrDDC、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 DmDDC。SsDDC 蛋白由 486 个氨基酸组成，分子量为 54 kDa<sup>[17]</sup>。SsDDC 与 EcDDC 的蛋白序列一致性为 91.44%，与 HsDDC 的一致性为 89.12%，与 MmDDC 的一致性为 86.43%，与 DrDDC 的一致性为 73.26%，与 DmDDC 的一致性为 59.49%。最终选取上述 5 条 DDC 进行后续实验研究。

将上述 5 个 *ddc* 基因分别连接至 pET30a 载体上，利用组成型启动子 P<sub>M1-93</sub> 调控相关基因的表

达。随后将这些质粒分别转入高产 L-DOPA 工程菌 T004 中，获得 TDA03-TDA07 菌株。通过摇瓶发酵分析，TDA03 和 TDA04 菌株的多巴胺产量均高于 TDA02 菌株。其中 TDA04 菌株的多巴胺产量最高，达到 3.33 g/L，比生长产量为 266.51 mg/(L·OD)，相对葡萄糖的摩尔转化率达到 19.6%。TDA04 比 TDA02 菌株的多巴胺产量提高了 53%，其 L-DOPA 残余量明显减少，但仍然达到 0.76 g/L (图 4A)。该结果表明 HsDDC 比 SsDDC 具有更高的催化活性，更有利于多巴胺的生物合成。虽然 TDA07 菌株的多巴胺产量低于 TDA02 菌株，为 1.94 g/L，但是其 L-DOPA 残余量仅有 0.02 g/L。

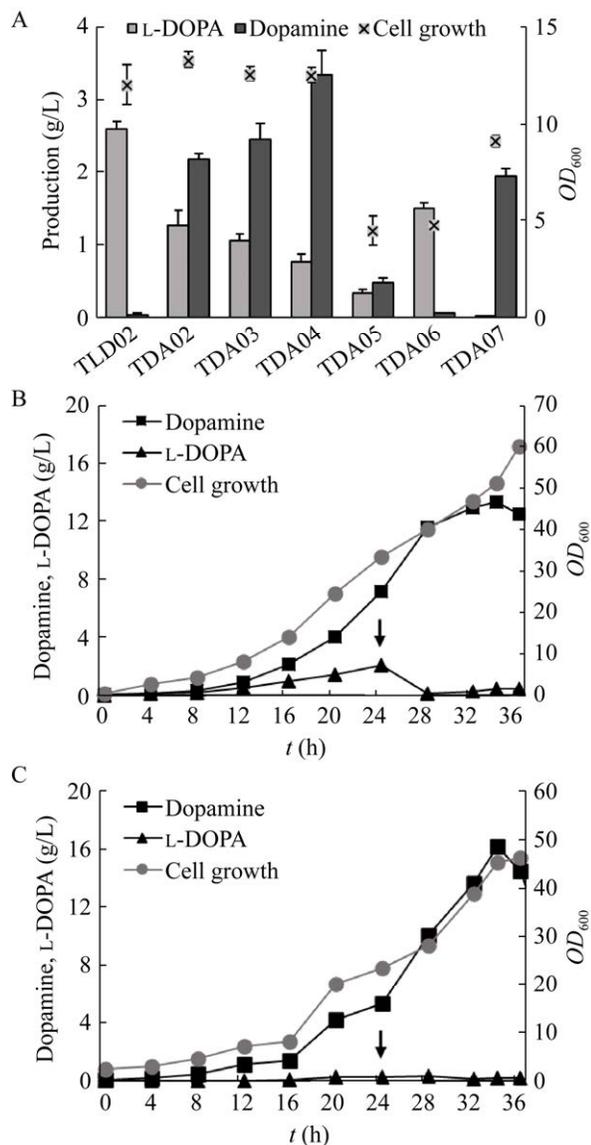


图 4 产多巴胺菌株的发酵评价 (A: 不同物种来源 DDC 的多巴胺生产菌株摇瓶发酵评价; B: TDA04 菌株 5 L 发酵罐分批补料发酵评价; C: TDA07 菌株 5 L 发酵罐分批补料发酵评价。“向下箭头”指示过程中补加抗生素的时间点)

Fig. 4 Production of dopamine by engineered strains. (A) Dopamine production and cell growth of engineered *E. coli* strains with different DDC. TLD02 as control strain; TDA02 with *Ssddc*; TDA03 with *Ecddc*; TDA04 with *Hsddc*; TDA05 with *Mmddc*; TDA06 with *Drddc*; TDA07 with *Dmddc*. Data are  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). 5 L fed-batch fermentation for dopamine production by strain TDA04 (B) and strain TDA07 (C). The “downward arrow” indicates when antibiotics are added during the fermentation process.

为了进一步研究工程菌多巴胺的发酵生产性能, 笔者选取通过摇瓶发酵多巴胺产量较高的 TDA04 和 L-DOPA 残余较少的 TDA07 菌株, 分别进行分批补料发酵评价。上述 2 个菌株发酵 34 h 时, 多巴胺产量均达到最大值 (图 4B-C)。其中 TDA04 菌株的产量为 13.3 g/L, 葡萄糖消耗量为 126.6 g/L, 转化率为 12.35% (mol/mol); TDA07 菌株的产量为 16.2 g/L, 葡萄糖消耗量为 157.7 g/L, 转化率为 12.08% (mol/mol)。TDA04 菌株发酵液中 L-DOPA 残余量达 0.45 g/L, 而 TDA07 菌株仅有极少量的 L-DOPA 残余, 产量为 0.23 g/L。该结果表明在测试的条件下 DmDDC 更适合用于将 L-DOPA 转化为多巴胺。

由于上述工程菌通过 pET30a 质粒表达外源基因 *ddc*, 在发酵放大培养时存在质粒遗传稳定性差的问题。因此, 当发酵进行到 24 h 时补加硫酸卡那霉素, TDA04 发酵液中的 L-DOPA 含量明显降低。该结果表明补加抗生素可能有利于维持细胞内质粒的遗传稳定性, 从而有利于 *ddc* 基因的稳定表达, 促进前体物 L-DOPA 转化为多巴胺。

### 2.3 基因组整合 *ddc* 菌株促进多巴胺稳定高效发酵生产

为了提高发酵菌种的稳定性, 笔者分别将 *Ssddc* 和 *Dmddc* 整合到 T004 菌株的 *feaB* (苯乙醛脱氢酶编码基因) 位点进行组成型表达, 获得大肠杆菌 TD01 和 TD03 菌株。通过摇瓶发酵分析, 整合 *Dmddc* 后的 TD03 菌株的多巴胺产量达到 2.4 g/L (图 5B), 高于质粒表达的 TDA07 菌株产量 (1.94 g/L), 并且几乎检测不到 L-DOPA 残余。该结果表明非质粒表达 DmDDC 的催化活性足以高效地将 L-DOPA 转化为多巴胺。然而, 单拷贝表达 *Ssddc* 的 TD01 菌株只有 0.32 g/L 多巴胺积累, 表明 SsDDC 的催化活性较低, 只有在多基因拷贝下大量表达时才具有较强的多巴胺合成能力。

为了进一步验证 TD03 在发酵放大条件下的多巴胺的生物合成能力, 笔者对该菌株进行分批

补料发酵评价。随着细胞逐渐生长,多巴胺产量逐渐升高。在 36 h 时,多巴胺产量最高达 17.7 g/L (图 6),葡萄糖消耗量为 143.5 g/L,相对葡萄糖的摩尔转化率为 14.50%; 36 h 之后,多巴胺产量迅速降低,并且发酵液颜色越来越黑。L-DOPA 在

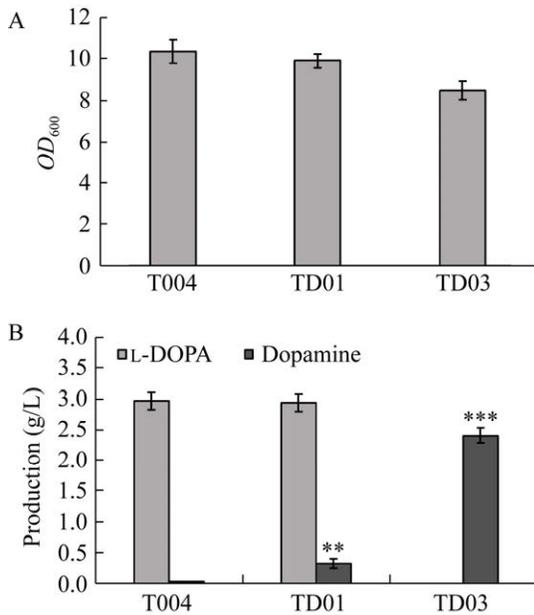


图 5 *ddc* 基因组整合菌株摇瓶发酵分析

Fig. 5 Dopamine production and cell growth after integrating the *ddc* genes. (A) Cell growth. (B) Dopamine production. Data are  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ). Statistics were performed by the two-tailed Student's *t*-test. \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ .

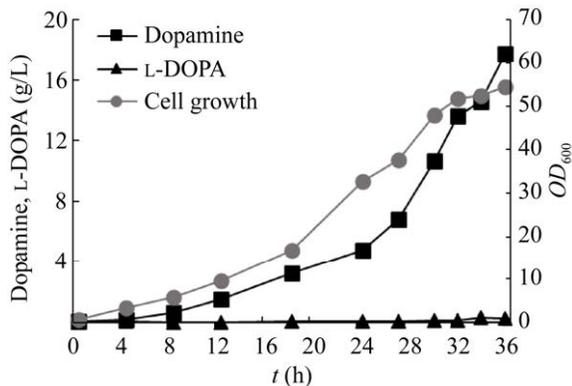


图 6 TD03 菌株 5 L 发酵罐分批补料发酵评价

Fig. 6 5 L fed-batch fermentation for dopamine production by strain TD03.

整个发酵过程中始终维持在较低水平。该结果再次证明 DmDDC 的酶活性较强,即使以基因组上单基因拷贝形式进行表达,仍然能够高效地将 L-DOPA 转化为多巴胺,并且菌株遗传稳定性强,整个发酵过程无需添加抗生素。该工作为多巴胺以及下游芳香族衍生物的生物合成研究奠定了重要基础。

### 3 讨论

近年来,代谢工程上的突破使得再生资源更容易生产生化产品。这些进展主要包括设计构建大型合成通路(从头合成 DNA 序列),以及通过转录或翻译水平工程优化通路表达,这对于避免毒性产物的积累至关重要。目前,这一进展主要依赖于基于单拷贝基因组整合或质粒的基因表达<sup>[19]</sup>。

通过将 *Ssddc* 连接至不同拷贝数质粒发现,低拷贝质粒虽然在拷贝数上对比基因组单拷贝占优势,但受到遗传不稳定性的影响,培养过程中不断减少的活性重组等位基因的数量,限制了 *Ssddc* 基因的最终表达活性<sup>[19]</sup>。因此,本研究中 *Ssddc* 基因在 pACYC184 质粒上以多拷贝(1-5/细胞)形式表达时反而比染色体整合、单拷贝形式存在时多巴胺产量更低。而携带中等拷贝质粒 pET30a-SsDDC (约 15/细胞) 菌株 TDA02 通过拷贝数目的进一步增加,使活性等位基因数目大量增加, *Ssddc* 基因的最终表达活性也相应放大,最终多巴胺产量为 2.18 g/L,摩尔产率约为 12.8% (图 2),有效地将 L-DOPA 转化为多巴胺,降低了前体物积累并提高了产量。尽管有研究表明,诱导型启动子控制的低拷贝质粒表达会提高 DDC 表达活性<sup>[18]</sup>,但由组成型启动子控制的中等拷贝质粒表达 DDC 同样具备优势。组成型启动子的控制不需要额外的诱导剂的添加,消除了诱导剂可能对微生物生长的影响;使发酵过程更加简易的同时降低了生产成本。

本研究通过质粒将平衡表达的异源特异性多

巴脱羧酶基因转化到 T004 菌株中,基于同源序列比对挖掘高效转化的多巴脱羧酶,得到高产多巴胺菌株。其中 TDA07 菌株的多巴胺产量和  $OD_{600}$  均显著低于 TDA02 菌株,分别为 1.94 g/L 和 9,但是 L-DOPA 残余量仅有 0.02 g/L,该结果暗示 DmDDC 虽然具有较高的催化活性,但是过量表达可能会抑制细胞生长。研究首次发现来自果蝇的异源蛋白 DmDDC 有效避免了前体物的积累,提高了多巴胺的产量(图 4A)。5 L 发酵罐进行分批补料发酵评价,多巴胺的产量达 16.2 g/L(图 4C),远超此前国内外报道的最高水平(2.15 g/L)<sup>[7]</sup>。整个发酵过程中,让我们意外发现羟基酪醇的产生。发酵 4 h 体系中开始出现羟基酪醇,羟基酪醇的量随发酵时间而增加,至 16 h 羟基酪醇积累 0.34 g/L,随后产量逐渐减低至消失。然而不同于质粒表达系统,基因组整合菌株 TD03,在整个发酵过程中均可以检测到微量的羟基酪醇的积累。这可能是由于在发酵这个复杂的动态过程中,产物的产量随细胞不断增加而增长,但质粒在过程中的丢失影响多巴胺的产生,羟基酪醇合成前体物也随之减少。与此同时,由于自身的不稳定性不断被消耗,最终导致羟基酪醇积累量逐渐减低至消失。

本研究通过 Red 同源重组将多巴脱羧酶 SsDDC、DmDDC 的基因整合到 T004 中,得到遗传稳定的菌株 TD01 和 TD03。其中 TD03 相比质粒表达菌株 TDA07,多巴胺产量提高了 11%。可能是由于多巴胺会被空气中氧气或体内酚羟基氧化酶氧化形成黑色素,菌株 TD03 发酵 36 h 后,发酵液颜色逐渐变黑,多巴胺产量也随之下降<sup>[2,18]</sup>。与出发菌株 T004 相比,菌株 TD01 和 TD03 明显增加了多巴胺的合成能力,且 TD03 是 TD01 产量的 7.5 倍(图 5B)。这表明基于序列的同源比对挖掘策略是用于开发生物合成的各种催化活性酶的有力工具。

本研究构建了不含质粒的、遗传稳定的高产多

巴胺菌株,为高效生产多巴胺提供了基础;同时构建平台菌株,可以用于其他芳香族化合物合成,为实现极具应用前景的苯酚类化合物生产菌构建及生产提供了重要参考。

## REFERENCES

- [1] 李凡,舒斯云,包新民.多巴胺受体的结构和功能.神经科学通报,2003,19(6):405-410.  
Li F, Shu SY, Bao XM. Structure and function of dopamine receptors. Chin J Neurosci, 19(6): 405-410 (in Chinese).
- [2] Hyo, Won, Kim, et al. Oxygen concentration control of dopamine-induced high uniformity surface coating chemistry. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(2): 233-238.
- [3] Luo ZW, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of benzoic acid from glucose. Metab Eng, 2020, 62: 298-311.
- [4] Liu Y, Xu Y, Ding D, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to improve L-phenylalanine production. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 5.
- [5] Satoh Y, Tajima K, Munekata M, et al. Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine, in *Escherichia coli*. J Agri Food Chem, 2012, 60(4): 979-984.
- [6] Fordjour E, Adipah FK, Zhou S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21(DE3) for *de novo* production of L-DOPA from D-glucose. Microb Cell Fact, 2019, 18: 74.
- [7] Nakagawa A, Matsuzaki C, Matsumura E, et al. (R,S)-tetrahydropapaveroline production by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. Sci Rep, 2017, 4: 6695.
- [8] Li X, Shen X, Wang J, et al. Efficient biosynthesis of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 2019, 294: 14-18.
- [9] Li X, Chen Z, Wu Y, et al. Establishing an artificial pathway for efficient biosynthesis of hydroxytyrosol. ACS Synth Biol, 2018, 7(2): 647-654.
- [10] Bai Y, Bi H, Zhuang Y, et al. Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*. Sci Rep, 2014, 4: 6640.

- [11] Das A, Verma A, Mukherjee K J. Synthesis of dopamine in *E. coli* using plasmid based expression system and its marked effect on host growth profiles. *Prep Biochem Biotechnol*, 2017, 47(7): 1082-6068.
- [12] 吴凤礼, 彭彦峰, 徐毅诚, 等. 代谢工程改造微生物生产芳香族化合物的研究进展. *生物加工过程*, 2017, 15(5): 9-23.  
Wu FL, Peng YF, Xu YC, et al. Advances in microbial metabolic engineering for producing aromatic chemicals. *Chin J Bioprocess Eng*, 2017, 15(5): 9-23 (in Chinese).
- [13] Lu J, Tang J, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microb & Biotech*, 2012, 93(6): 2455-2462.
- [14] 陈五九, 曹鹏, 宋国田, 等. 左旋多巴的合成研究新进展. *广西科学*, 2018, 25(3): 274-278.  
Chen WJ, Cao P, Song GT, et al. Advance research progress in L-DOPA synthesis. *Guangxi Sci*, 2018, 25(3): 274-278 (in Chinese).
- [15] 王钦宏, 陈五九, 曹鹏, 等. 生产左旋多巴大肠杆菌重组菌株及其构建方法与应用: CN, 107541483A. 2018-01-05.  
Wang QH, Chen WJ, Cao P, et al. Production of L-DOPA by recombinant strain of *Escherichia coli* and its construction method and application: CN, 107541483A. 2018-01-05 (in Chinese).
- [16] 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.
- [17] Blechingberg J, Holm IE, Johansen MG, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase expression profiling and isoform detection in the developing porcine brain. *Brain Res*, 2010, 1308: 1-13.
- [18] Satoh Y, Tajima K, Munekata M, et al. Engineering of L-tyrosine oxidation in *Escherichia coli* and microbial production of hydroxytyrosol. *Metab Eng*, 2012, 14(6): 603-610.
- [19] Tyo KEJ, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 760.

(本文责编 郝丽芳)