

# 基于碳硫模块平衡策略的大肠杆菌高产 L-半胱氨酸菌株构建

张博<sup>1,2</sup>, 陈开<sup>1,2</sup>, 杨辉<sup>1,2</sup>, 吴梓丹<sup>1,2</sup>, 柳志强<sup>1,2</sup>, 郑裕国<sup>1,2</sup>

1 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学 生物工程学院 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

张博, 陈开, 杨辉, 吴梓丹, 柳志强, 郑裕国. 基于碳硫模块平衡策略的大肠杆菌高产 L-半胱氨酸菌株构建. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4567-4586.

ZHANG B, CHEN K, YANG H, WU ZD, LIU ZQ, ZHENG YG. Construction of an L-cysteine hyper-producing strain of *Escherichia coli* based on a balanced carbon and sulfur module strategy. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4567-4586.

**摘 要:** L-半胱氨酸是一种重要的含硫氨基酸, 因其多样的生理功能, L-半胱氨酸在医药、化妆品和食品工业中有着广泛的应用。模块化代谢工程策略在细胞工厂的构建中具有极大的潜力。本研究利用碳硫模块协同表达策略进行大肠杆菌的 L-半胱氨酸合成途径构建, 构建了一株 L-半胱氨酸合成基因工程菌。首先, 通过增强 L-半胱氨酸前体物质 L-丝氨酸 (*serA<sup>f</sup>*, *serB* 和 *serC<sup>Cg</sup>*) 的生物合成以及转录调控因子 CysB 的表达, L-半胱氨酸的产量由 0 提高到  $(0.38 \pm 0.02)$  g/L。然后, 通过促进 L-半胱氨酸转运和无机硫源的吸收同化、减弱 L-半胱氨酸和 L-丝氨酸的降解以及异源表达 *cysE<sup>f</sup>* 和 *cysB<sup>St</sup>*, L-半胱氨酸的产量提升至  $(3.82 \pm 0.01)$  g/L。最后, 为了优化碳模块和硫模块的代谢通量, 协同表达硫酸盐同化途径与硫代硫酸盐同化途径的基因 *cysM*、*nrdH*、*cysK* 以及 *cysIJ*, 得到 L-半胱氨酸高产菌株。在 500 mL 摇瓶和 2 L 发酵罐中分别实现了  $(4.17 \pm 0.07)$  g/L 和  $(11.94 \pm 0.1)$  g/L 的 L-半胱氨酸积累。研究表明, 在细胞内通过对硫碳模块间代谢通量的协调控制, 可以实现 L-半胱氨酸的高效生物合成。研究结果为微生物发酵生产 L-半胱氨酸的产业化奠定了基础。

**关键词:** 生物合成; 基因协同表达; L-半胱氨酸; 代谢工程; 发酵工程

Received: February 24, 2022; Accepted: May 7, 2022

Supported by: National Key Research and Development Project of China (2018YFA0901400); National Natural Science Foundation of China (32070099, 31971342)

Corresponding author: LIU Zhiqiang. E-mail: microliu@zjut.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901400); 国家自然科学基金 (32070099, 31971342)

# Construction of an L-cysteine hyper-producing strain of *Escherichia coli* based on a balanced carbon and sulfur module strategy

ZHANG Bo<sup>1,2</sup>, CHEN Kai<sup>1,2</sup>, YANG Hui<sup>1,2</sup>, WU Zidan<sup>1,2</sup>, LIU Zhiqiang<sup>1,2</sup>, ZHENG Yuguo<sup>1,2</sup>

1 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** L-cysteine is an important sulfur-containing  $\alpha$ -amino acid. It exhibits multiple physiological functions with diverse applications in pharmaceutical cosmetics and food industry. Here, a strategy of coordinated gene expression between carbon and sulfur modules in *Escherichia coli* was proposed and conducted for the production of L-cysteine. Initially, the titer of L-cysteine was improved to  $(0.38 \pm 0.02)$  g/L from zero by enhancing the biosynthesis of L-serine module (*serA<sup>f</sup>*, *serB* and *serC<sup>cg</sup>*) and overexpression of CysB. Then, promotion of L-cysteine transporter, increased assimilation of sulfur, reduction or deletion of L-cysteine and L-serine degradation pathway and enhanced expression of *cysE<sup>f</sup>* (encoding serine acetyltransferase) and *cysB<sup>St</sup>* (encoding transcriptional dual regulator CysB) were achieved, resulting in an improved L-cysteine titer  $(3.82 \pm 0.01)$  g/L. Subsequently, expressions of *cysM*, *nrdH*, *cysK* and *cysIJ* genes that were involved in sulfur module were regulated synergistically with carbon module combined with utilization of sulfate and thiosulfate, resulting in a strain producing  $(4.17 \pm 0.07)$  g/L L-cysteine in flask shake and  $(11.94 \pm 0.1)$  g/L L-cysteine in 2 L bioreactor. Our results indicated that efficient biosynthesis of L-cysteine could be achieved by a proportional supply of sulfur and carbon *in vivo*. This study would facilitate the commercial bioproduction of L-cysteine.

**Keywords:** biosynthesis pathway; coordinated gene expression; L-cysteine; metabolic engineering; fermentation engineering

硫是微生物的必需元素之一, 在生物体内主要以氨基酸的形式存在, 如 L-半胱氨酸和 L-甲硫氨酸<sup>[1]</sup>。L-半胱氨酸含有活性巯基基团, 具有很强的生理活性, 被广泛应用于食品添加剂、化妆品和医药行业<sup>[2-3]</sup>。此外, L-半胱氨酸在蛋白质折叠、组装和信号传导方面起着重要作用<sup>[4]</sup>。目前, 工业上 L-半胱氨酸的生产方法主要包括蛋白质水解法、微生物发酵法以及酶催化法<sup>[5]</sup>。微生物发酵法因其反应更加温和、生产更加绿色等优点日益受到重视<sup>[6]</sup>。

自然界中的多种微生物, 包括谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[6-7]</sup>、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[8]</sup>和菠萝泛菌 (*Pantoea ananatis*)<sup>[4]</sup>等已经被报道可以通过代谢工程改造实现 L-半胱氨酸的生产。随着碳通量的增加、前体的积累和硫转化率的提高以及削弱产物的降解等策略在各个代谢工程菌中的使用, L-半胱氨酸产量得到逐步提高<sup>[4,6,9-13]</sup>。然而, L-半胱氨酸多样的生理功能、复杂的代谢网络以及对细胞自身的毒性, 阻碍了微生物发酵法

的进一步发展<sup>[14]</sup>。

近年来, L-半胱氨酸在微生物中的生物合成途径已被阐明。在 *E. coli* 中, L-半胱氨酸合成途径主要分为碳代谢途径和硫同化途径。碳代谢途径中, 葡萄糖经糖酵解途径生成 L-丝氨酸, 之后在丝氨酸转移酶 (serine acetyltransferase, SAT) 的催化下生成 L-半胱氨酸的重要前体物质 O-乙酰丝氨酸 (O-acetyl-L-serine hydrochloride, OAS)。L-半胱氨酸的硫同化途径主要分为 2 类: 硫酸盐同化途径和硫代硫酸盐同化途径。硫代硫酸盐因其同化途径耗能更少, 被认为是比硫酸盐更为高效的硫源<sup>[14-17]</sup>。硫酸盐同化途径中, O-乙酰丝氨酸硫化酶 A 催化 OAS 和硫化物 ( $S^{2-}$ ) 转化为 L-半胱氨酸。在硫代硫酸盐同化途径中, 无机硫进入细胞是通过硫代硫酸盐 ABC 转运蛋白实现的, 该蛋白由基因 *cysU*、*cysW*、*cysA* 和 *sbp* 编码<sup>[16]</sup>。当硫代硫酸盐被运输到细胞质中时, 它通过 O-乙酰丝氨酸磺化酶 B 的催化作用与 OAS 反应, 随之生成 S-磺基半胱氨酸 (S-sulfo-L-cysteine, SSC)。最后, SSC 在还原酶 NrdH 和 GrxA 的催化下转化为 L-半胱氨酸<sup>[18]</sup>。

L-半胱氨酸生产的代谢工程策略包括减少丝氨酸和 L-半胱氨酸的降解<sup>[11]</sup>、过表达 *cysE*<sup>[19-21]</sup>和 *eamA*<sup>[22]</sup>等, 上述方法获得的 L-半胱氨酸菌株产量有限。最近, 模块化策略被引入到半胱氨酸发酵中, 实现了 620.9 mg/L 的 L-半胱氨酸积累<sup>[11]</sup>, 这意味着硫和碳模块之间可能存在不平衡匹配, 因此半胱氨酸合成能力有限。进一步提高硫转化率后, 以 *E. coli* JM109 为底盘细胞, L-半胱氨酸在摇瓶发酵中的产量可达 1.4 g/L<sup>[23]</sup>。在提高硫转化率基础上继续强化其生物合成, 以 *E. coli* BW25113 为底盘的工程菌在 1.5 L 生物反应器中, L-半胱氨酸的产量达到了 8.34 g/L (表 1)<sup>[13]</sup>。

本研究以模块化策略进行 L-半胱氨酸生物合成的代谢工程改造, 构建了协同表达碳模块和硫模块高效合成 L-半胱氨酸的重组大肠杆菌。在已报道的半胱氨酸合成改造研究中, 更多的是对碳和硫代谢通量进行单独改造, 但本研究提出了碳模块和硫模块协同输出控制的策略, 将系统代谢工程与模块平衡策略相结合, 进一步提高了 L-半胱氨酸的产量, 使重组大肠杆菌的产量达到 (11.94±0.1) g/L, 为目前报道的最高产量。

表 1 各种工程菌发酵生产 L-半胱氨酸产量

Table 1 Yield of L-cysteine produced by various engineered strains

Strains	Strategy	L-cysteine production	Year
<i>Escherichia coli</i> JM240	Enhancing biosynthesis	About 30 mg/L	1986
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	Enhancing precursor accumulation and weakening degradation	(947.90±46.50) mg/L	2019
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Enhancing biosynthesis and excretion and weakening degradation	1.20 g/L	2008
<i>Pantoea ananatis</i>	Weakening degradation and educing efflux	2.20 g/L	2017
<i>Escherichia coli</i> JM109	Enhancing the sulfur conversion rate	7.50 g/L	2019
<i>Escherichia coli</i> BW25113	Enhancing biosynthesis and thiosulfate assimilation, and weakening degradation	8.34 g/L	2020
<i>Escherichia coli</i> W3110 (This study)	Balancing carbon and sulfur module conversion rate	(11.94±0.10) g/L	2022

# 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 菌株

本研究以 *E. coli* W3110 作为出发菌株, *E. coli* DH5 $\alpha$  用于质粒的克隆, 所有的菌株和质粒详见表 2。

### 1.1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10<sup>[24]</sup>。

MS 基础发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 2、酵母提取物 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, MnSO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O 0.005, ZnSO<sub>4</sub> 0.005, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 5, CaCO<sub>3</sub> 10。

分批补料发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 30, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 10, 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.52, 甜菜碱 2, 蛋氨酸 1, 苏氨酸 1, 异亮氨酸 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, MnSO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O 0.005, ZnSO<sub>4</sub> 0.005, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 5。

表 2 本研究中使用的具有特定基因型的菌种和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study with specific genotypes

Strains or plasmids	Genotype	Source
<i>E. coli</i> W3110	F-, L-, IN (rrnD-rrnE)1, rph-1	CGSC <sup>a</sup>
<i>S. typhimurium</i>	Wild type	CGSC <sup>a</sup>
<i>C. glutamicum</i>	Wild type	CGSC <sup>a</sup>
CYS0	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i>	This study
CYS1	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i>	This study
CYS2	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i>	This study
CYS3	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i>	This study
CYS4	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> /pA	This study
CYS5	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> /pAE	This study
CYS6	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> /pAE	This study
CYS7	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> /pAE	This study
CYS8	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> /pAEC	This study
CYS9	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>cysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> /pAEC	This study
CYS10	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>StcysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> /pAEC	This study
S1	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>StcysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> pAEC pS1	This study
S2	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>StcysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> pAEC pS2	This study
S3	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>StcysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> pAEC pS3	This study
S4	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>StcysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> pAEC pS4	This study
S5	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA</i> <sup>f</sup> <i>serB</i> <sup>f</sup> <i>serC</i> <i>cysB</i> <i>StcysE</i> <sup>f</sup> <i>cycA</i> <i>pgk</i> $\Delta$ <i>sdaA</i> $\Delta$ <i>sdaB</i> $\Delta$ <i>tdcG</i> $\Delta$ <i>yhaM</i> $\Delta$ <i>tnaA</i> $\Delta$ <i>yciW</i> $\Delta$ <i>metR</i> $\Delta$ <i>gpmA</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>poxB</i> pAEC pS5	This study

(待续)

(续表 2)

Strains or plasmids	Genotype	Source
S6	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA<sup>f</sup>serBserC</i> <i>cysBStcysE<sup>f</sup>cycApgkΔsdaAΔsdaBΔtdcGΔyhaMΔtnaAΔyciW</i> <i>ΔmetRΔgpmAΔpykFΔpoxB</i> pAEC pS6	This study
S7	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA<sup>f</sup>serBserC</i> <i>cysBStcysE<sup>f</sup>cycApgkΔsdaAΔsdaBΔtdcGΔyhaMΔtnaAΔyciW</i> <i>ΔmetRΔgpmAΔpykFΔpoxB</i> pAEC pS7	This study
S8	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA<sup>f</sup>serBserC</i> <i>cysBStcysE<sup>f</sup>cycApgkΔsdaAΔsdaBΔtdcGΔyhaMΔtnaAΔyciW</i> <i>ΔmetRΔgpmAΔpykFΔpoxB</i> pAEC pS8	This study
S9	<i>E. coli</i> W3110 <i>serA<sup>f</sup>serBserC</i> <i>cysBStcysE<sup>f</sup>cycApgkΔsdaAΔsdaBΔtdcGΔyhaMΔtnaAΔyciW</i> <i>ΔmetRΔgpmAΔpykFΔpoxB</i> pAEC pS9	This study
pA	A plasmid derived from pTrc99A carrying <i>eamA</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pAE	A plasmid derived from pTrc99A carrying <i>eamA</i> and <i>cysE<sup>f</sup></i>	This study
pAEC	A plasmid derived from pTrc99A carrying <i>eamA</i> , <i>cysE<sup>f</sup></i> and <i>serC</i> from <i>C. glutamicum</i>	This study
pS1	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a Pbs promoter, <i>nrdH</i> carrying a Pbs promoter <i>cysK</i> carrying a Pbs promoter and <i>cysIJ</i> carrying a Pbs promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS2	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a Pbs promoter, <i>nrdH</i> carrying a Trc promoter <i>cysK</i> carrying a Trc promoter and <i>cysIJ</i> carrying a Trc promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS3	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a Pbs promoter, <i>nrdH</i> carrying a M12 promoter <i>cysK</i> carrying a M12 promoter and <i>cysIJ</i> carrying a M12 promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS4	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a Trc promoter, <i>nrdH</i> carrying a Pbs promoter <i>cysK</i> carrying a Trc promoter and <i>cysIJ</i> carrying a M12 promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS5	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a Trc promoter, <i>nrdH</i> carrying a Trc promoter <i>cysK</i> carrying a M12 promoter and <i>cysIJ</i> carrying a Pbs promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS6	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a Trc promoter, <i>nrdH</i> carrying a M12 promoter <i>cysK</i> carrying a Pbs promoter and <i>cysIJ</i> carrying a Trc promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS7	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a M12 promoter, <i>nrdH</i> carrying a Pbs promoter <i>cysK</i> carrying a M12 promoter and <i>cysIJ</i> carrying a Trc promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS8	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a M12 promoter, <i>nrdH</i> carrying a Trc promoter <i>cysK</i> carrying a Pbs promoter and <i>cysIJ</i> carrying a M12 promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study
pS9	Amp <sup>R</sup> , <i>cysM</i> carrying a M12 promoter, <i>nrdH</i> carrying a M12 promoter <i>cysK</i> carrying a Trc promoter and <i>cysIJ</i> carrying a Pbs promoter were cloned on the pAEC plasmid	This study

<sup>a</sup>: *E. coli* genetic resource center.

补料培养基 (g/L): 葡萄糖 300, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 12.52, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.52, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, MnSO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O 0.005, ZnSO<sub>4</sub> 0.005, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 5。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 摇瓶发酵

从活化平板中将单菌落接种于 10 mL LB 试管, 并在 37 °C、180 r/min 条件下培养 12 h, 获得一级种子液。取 1 mL 种子液, 转接到 20 mL MS 发酵培养基中, 在 30 °C、180 r/min

条件下培养 48 h。如有需要, 加入 0.1 g/L 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 或 0.9 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)。发酵 48 h 后收集 1 mL 细胞培养液, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清测定 L-半胱氨酸浓度, 细胞颗粒用超纯水冲洗一次后, 测定细菌 OD<sub>600</sub>。

### 1.2.2 发酵罐发酵

一级种子液制备如 1.2.1。取 1 mL 一级种子液, 转接到 100 mL MS 发酵培养基中, 在 30 °C、180 r/min 条件下培养 12 h 获得二级种

子液。将 100 mL 二级种子液接种于 2 L 发酵罐中 (装液量 1 L)。用 50% (*V/V*)  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  自动控制 pH 至 7.0, 培养温度 30 °C、通气量为  $5 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{min})$ 。当细菌  $OD_{600}$  达到 20 左右时加入 0.9 mmol/L 的 IPTG。当培养基初始的葡萄糖耗尽时, 补料流加以维持发酵过程中葡萄糖浓度在 5 g/L 以下。

### 1.2.3 重组质粒 pEAC 的构建

本研究使用的质粒详见表 2。用于构建

质粒的引物详见表 3。为了构建质粒 pAEC, 用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增了 *eamA*、*cysE*<sup>f</sup> 和 *serC*<sup>cs</sup> 基因。然后用 CloneExpress 一步克隆试剂盒将 3 个基因克隆到载体 pTrc99A 的 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切位点<sup>[25]</sup>。

### 1.2.4 基因敲除与启动子替换

编码 Cas9 蛋白的质粒 pCas9 和含有 sgRNA 的 pTarget 质粒<sup>[26-27]</sup>由上海植物生理生态研究所捐赠。所使用引物详见表 3。

表 3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pTrc99A/ <i>eamA</i> 1	GTACCCGGGGATCCTCTAGAATGTCGCGAAAAGATGGGGT
pTrc99A/ <i>eamA</i> 2	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTAACTTCCCACCTTTACCG
pAE1	AGGTGGGAAGTTAACTGCAGATGTCGTGTGAAGAACTGGAAC
pAE2	CCGCCAAAACAGCCAAGCTTTTAGATCCCATCCCCATACT
pAEC1	GTTAATTTACACAGGAAACAGACCATGACCGACTTCCCCACCCT
pAEC2	CCGCCAAAACAGCCTTACTTCCTTGCAAAACCGC
pTarget- <i>serA</i>	ATACTAGTTTATTTTTTGATATGTTGAAGTTTATAGAGCTAGAAATAGCA
Trc- <i>serA</i> 1	ATTGCTTCGGTTGCAGAAAA
Trc- <i>serA</i> 2	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATG
Trc- <i>serA</i> 3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGACCA
Trc- <i>serA</i> 4	CCCAATTGCGTACCAATATG
Trc- <i>serAR</i>	TTGTTATCCGCTCACAATTC
pTarget- <i>serB</i>	ATACTAGTCTTAATGTTGCCAGAAGCAAGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
Trc- <i>serB</i> 1	AGAGCAGCAACATCAGGCGT
Trc- <i>serB</i> 2	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAAT
Trc- <i>serB</i> 3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGACCA
Trc- <i>serB</i> 4	TATTGGCGTCAGCGCCTTTC
Trc- <i>serBR</i>	CATCAGCGGTGCAACGTTCA
pTarget- <i>serC</i>	ATACTAGTTGGTCGCAATCGATTGACCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
Trc- <i>serC</i> 1	AGATGTGGCGTTTTATGATG
Trc- <i>serC</i> 2	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATC
Trc- <i>serC</i> 3	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGACCA
Trc- <i>serC</i> 4	GATACCATCGATGGTTTCAT
Trc- <i>serCF</i>	CGTTACAAAGTGTTGCCGGA
Trc- <i>serCR</i>	TTAACCGTGACGGCGTTCGA

(待续)

(续表 3)

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pTarget- <i>sdaA</i>	ATACTAGTTTATGGTTCAGTCTGCTGAGTTTATAGAGCTAGAAATAGCA
<i>sdaA1</i>	GCGCGAAGCTGAAGAAGAGG
<i>sdaA2</i>	TGGGCGAGTAAGAAGTATTACACGATAATACTCCTGACAA
<i>sdaA3</i>	TTGTCAGGAGTATTATCGTGTAATACTTCTTACTCGCCCA
<i>sdaA4</i>	GAATGTCCACGACGGGCACA
Trc- <i>sdaAR</i>	GGTATACTAGTATTATACCTAGGA
pTarget- <i>sdaB</i>	ATACTAGTTACCGTTGGACCAATGAAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>sdaB1</i>	CTAAAGAGCAGAACATCTCG
<i>sdaB2</i>	AGGCCTTTGGAGAGCGATTACATAGGAAATACATCGCGTT
<i>sdaB3</i>	AACGCGATGATTTTCTATGTAATCGCTCTCCAAAGGCCT
<i>sdaB4</i>	TCGGTGAAAGTAACTGACAG
pTarget- <i>tdcG</i>	ATACTAGTACCGTGGGGCCAATGAATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>tdcG1</i>	ATTTCACGTACCTTTACCCA
<i>tdcG2</i>	GAAAGCTGACAGCAATGTCACATATCCACACCCTCGGATT
<i>tdcG3</i>	AATCCGAGGGTGTGGATATGTGACATTGCTGTCAGCTTTC
<i>tdcG4</i>	CACCGATGAGAGCAAAAATA
pTarget- <i>cysE</i>	ATACTAGTCCTTTGTTACCGCTATGACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
Trc- <i>cysE1</i>	CTGCACTGCGGCAAAAGTTT
Trc- <i>cysE2</i>	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAATT
Trc- <i>cysE3</i>	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGACCA
Trc- <i>cysE4</i>	TTTCACCAACGACGATGCCT
Trc- <i>cysEF</i>	GCTACCGCAATACGAAAGAA
Trc- <i>cysER</i>	TTAGATCCCATCCCCATACT
pTarget- <i>cysB</i>	ATACTAGTTAAACAAAGGGTCGCGAAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Trc- <i>cysB1</i>	GACAGCTATCTCATCGATCC
Trc- <i>cysB2</i>	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAAG
Trc- <i>cysB3</i>	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGACCA
Trc- <i>cysB4</i>	ACAATAGCCCGATTCCAGTG
Trc- <i>cysBF</i>	GAAATCGCGTGAAACGCGTG
Trc- <i>cysBR</i>	CAATGCGACAGCCGCATCAA
pTarget- <i>tnaA</i>	ATACTAGTATCGATTTACTGACCGACAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>tnaA1</i>	ACCAAGGTGCCTTGAGTCAT
<i>tnaA2</i>	CCACTCTGTAGTATTAATTACATTACATAATCCTTCATTT
<i>tnaA3</i>	AAATGAAGGATTATGTAATGTAATTAATACTACAGAGTGG
<i>tnaA4</i>	CCAAACACGATCACAAAGGA
pTarget- <i>yhaM</i>	ATACTAGTAATGGTGGGGCTGCCGATTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>yhaM1</i>	ACATGACGAAGCGGTAAAAG

(待续)

(续表 3)

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>yhaM2</i>	TCCCCAAAACCTGGCGTTTACATATTAACCTTAAAAT
<i>yhaM3</i>	ATTTTAAGGTTTTTAATATGTAAACGCCAGGTTTTGGGA
<i>yhaM4</i>	GTGCGAATTTCCAGTTGCAT
pTarget- <i>yciW</i>	ATACTAGTTGACGTTCTGCCTCTGGTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>yciW1</i>	GCTGACCCTTTCTACCTTG
<i>yciW2</i>	TGTCTGACGCGCAAGGTTACATGGGCGCTCCTTGGTCGT
<i>yciW3</i>	ACGACCAAGGAGCGCCCATGTAAACCTTGCCGCGTCAGACA
<i>yciW4</i>	GTCAGTTCTGCATAGAAAGA
pTarget- <i>serA</i> <sup>f1</sup>	ATACTAGTCATCGTCGTTGGTGAAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>serA</i> <sup>f1</sup> -1	GCATTCTGGCTGAATCGCTG
<i>serA</i> <sup>f1</sup> -2	GGACGGTTTTTCGTGGATGTGCATCAGACGACG
<i>serA</i> <sup>f1</sup> -3	ATCCACGAAAACCGTCCGGGCGTGCTAACTGCGC
<i>serA</i> <sup>f1</sup> -4	TGCTCCTCCCCTGAGACTG
pTarget- <i>serA</i> <sup>f2</sup>	ATACTAGTGGCGTTCCGGCTCGTATTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>serA</i> <sup>f2</sup> -1	CGCCACTCAGGTACAGCATC
<i>serA</i> <sup>f2</sup> -2	CCGCAATGCCTACACCCTGCTCCGCGAAGA
<i>serA</i> <sup>f2</sup> -3	GGAGCAGGGTGTAGGCATTGCGGCGCAATATCTG
<i>serA</i> <sup>f2</sup> -4	ACATCGTTGATTCTTTGACC
pTarget- <i>cysE</i> <sup>f1</sup>	ATACTAGTGACATCCACGAAAACCGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>cysE</i> <sup>f1</sup> -1	CTCATCGTGTGGAGTAAGCA
<i>cysE</i> <sup>f1</sup> -2	AATCACTGCCGCTTACCAACGACGATGCCTG
<i>cysE</i> <sup>f1</sup> -3	GGACGGTTTTTCGTGGATGTGCATCAGACGACG
<i>cysE</i> <sup>f1</sup> -4	CATTCTTGATGCCCTGCCCG
pTarget- <i>cysE</i> <sup>f2</sup>	ATACTAGTGGCGATGTTGACGCCCTGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<i>cysE</i> <sup>f2</sup> -1	CGCTGACCCGAAATGATCG
<i>cysE</i> <sup>f2</sup> -2	ACTTACGATGCGCGCAGGCACACCAGCGGCGGTGGTATGCGGCG
<i>cysE</i> <sup>f2</sup> -3	GGTGTGCCTGCGCGCATCGTAAGTAAACCAGACAGCGATAAG
<i>cysE</i> <sup>f2</sup> -4	GGCAGTATGCTAAACATCGT
pTarget R-common <sup>1</sup>	ACTAGTATTATACCTAGGACTG
TrcV <sup>2</sup>	GTGACCACACATTATACGAGCCGGATGA
pT- <i>pgk</i> -F	TAATACTAGTCTATGGCTACTGTTGCTTTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>pgk</i> -R	GCTCTAAAACGAAAGCAACAGTAGCCATAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>cycA</i> -F	TAATACTAGTTGGTTCTGCTGGGTTGTAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>cycA</i> -R	GCTCTAAAACGTTACAACCCAGCAGAACCAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>sstT</i> -F	TAATACTAGTCAGCCTGGTAAACAAATCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>sstT</i> -R	GCTCTAAAACGGATTGTTTACCAGGCTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>tdcC</i> -F	TAATACTAGTCCTATCCGCGCAGGTTTTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

(待续)



(续表 3)

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pT- <i>tdc</i> -R	GCTCTAAAACCCAAAACCTGCGCGGATAGGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>sda</i> C-F	TAATACTAGTCCAATCAACGCCGGTGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>sda</i> C-R	GCTCTAAAACCCAACACCGGCGTTGATTGGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>glyA</i> -F	TAATACTAGTCAAATATGCTGAAGGTTATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>glyA</i> -R	GCTCTAAAACGATAACCTTCAGCATATTTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gpmA</i> -F	TAATACTAGTCGAGAAAGAACTGCCGCTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gpmA</i> -R	GCTCTAAAACCTCAGCGGCAGTTCTTTCTCGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>pykF</i> -F	TAATACTAGTATGGAAGTTACCGCCATTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>pykF</i> -R	GCTCTAAAACCTCAATGGCGGTAACCTCCATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>poxB</i> -F	TAATACTAGTTTGCAGAGCTGGTTTCCAGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>poxB</i> -R	GCTCTAAAACGGCTGGAACCAGCTCGAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>metR</i> -F	TAATACTAGTGGTAGAGATGGATTTTAAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>metR</i> -R	GCTCTAAAACATTTAAAATCCATCTCTACCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>cysB</i> <sup>Sr</sup> -F	TAATACTAGTTGCCGGAGAGCACACCTGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>cysB</i> <sup>Sr</sup> -R	GCTCTAAAACGCCAGGTGTGCTCTCCGGCAACTAGTATTATACCTAGGAC
pTD-line-F	CTCGAGTTCATGTGCAGCTC
pTD-line-R	CTGCAGGTCGACTCTAGAGA
pTD- <i>pgk</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGTATTGATGCATACCATCCTG
pTD- <i>pgk</i> -up-R	CCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAAGCAAAGCC CCATTCGTTAT
pTD- <i>pgk</i> -down-F	ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGACCATGTCTGT AATTAAGATGAC
pTD- <i>pgk</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGTTACTTCTTAGCGCGCTCTTC
pTD- <i>cycA</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGGGTGAACCCGCTGAATTCCC
pTD- <i>cycA</i> -up-R	CATCCAGCATGATAATGCGGGTTTTTTCTTCCTGTACCT
pTD- <i>cycA</i> -down-F	AGGTACAGGAAGAAAAAACC CGCATTATCATGCTGGATG
pTD- <i>cycA</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGGCCCCGCTGGCAGAAATCAT
pTD- <i>sstT</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCAATCGCCGTCTCGCTGGG
pTD- <i>sstT</i> -up-R	AGACGAAAGGGGTAAACAATTTTCGATCCTTTTCATTGTG
pTD- <i>sstT</i> -down-F	CACAATGAAAGGATCGAAAATTGTTTAACCCCTTTTCGTCT
pTD- <i>sstT</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGCACAACATTTTCAATCGTG
pTD- <i>tdc</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGAAGATCTCTATGATGTCGAT
pTD- <i>tdc</i> -up-R	TTCTCATCCTGAGTTACGGAATCCTATCCTCAACGAATTA
pTD- <i>tdc</i> -down-F	TAATTCGTTGAGGATAGGATTCGGTAACTCAGGATGAGAA
pTD- <i>tdc</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGGGCCGTATAAATAAGCTTCC
pTD- <i>sda</i> C-up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGCATCAACTCATTTTCATTGT
pTD- <i>sda</i> C-up-R	CGAAAGCGGCGCGAAAGGACCTATTTCTCCTGGAGGAATG
pTD- <i>sda</i> C-down-F	CATTCCTCCAGGAGAAATAGTCCTTTCGCGCCGCTTTTCG

(待续)

(续表 3)

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pTD- <i>sdaC</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGCCGCCAATAGAGTAGTAAGT
pTD- <i>glyA</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGAACAGGGCTTCACGTTGATC
pTD- <i>glyA</i> -up-R	ACAGCAAATCACCGTTTCGCCCCGCATCTCCTGACTCAGCT
pTD- <i>glyA</i> -down-F	AGCTGAGTCAGGAGATGCGGGCGAAACGGTGATTTGCTGT
pTD- <i>glyA</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGTGGCAAAGTGGAGAACCGTG
pTD- <i>gpmA</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGTCTTGTACAGGCCAAAGGC
pTD- <i>gpmA</i> -up-R	TCATTTTAAACGAATGACGTATACTTACTCCTCAAATCAT
pTD- <i>gpmA</i> -down-F	ATGATTTGAGGAGTAAGTATACGTCATTTCGTTTAAATGA
pTD- <i>gpmA</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGAGAGCCTAACTACAGCGCGA
pTD- <i>pykF</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGCAAAAATCAAACAAAATCAG
pTD- <i>pykF</i> -up-R	ATTAATTCACAAAAGCAATAGACAGTCTTAGTCTTTAAGT
pTD- <i>pykF</i> -down-F	ACTTAAAGACTAAGACTGTCTATTGCTTTTGTGAATTAAT
pTD- <i>pykF</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGGAGCTGCGTCATCTTTAGCA
pTD- <i>poxB</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCGGCCCCGGCTCCGTATATG
pTD- <i>poxB</i> -up-R	GACGGGAAATGCCACCCTTTGGTTCTCCATCTCCTGAATG
pTD- <i>poxB</i> -down-F	CATTCAGGAGATGGAGAACCAGGGTGGCATTTCGCCGTC
pTD- <i>poxB</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGAATTCCCATGCTTCTTTTTCAG
pTD- <i>metR</i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGATCTTTGTTCTGATGACGCG
pTD- <i>metR</i> -up-R	GCCGCACTGGCCAACGTTTAGAAAGTCCTTCACTTCGGCA
pTD- <i>metR</i> -down-F	TGCCGAAGTGAAGGACTTTCTAAACGTTGGCCAGTGGCGC
pTD- <i>metR</i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGCTACATCACGCTGATTTATG
pTD- <i>cysB<sup>St</sup></i> -up-F	TCTCTAGAGTCGACCTGCAGTTCGTGCTGCGTGACGGTGC
pTD- <i>cysB<sup>St</sup></i> -up-R	CGCAGTTGCTGCAGCTTCATGGTCTGTTTCTGTGTGAAA
pTD- <i>cysB<sup>St</sup></i> -F	TTTACACAGGAAACAGACCATGAAGCTGCAGCAACTGCG
pTD- <i>cysB<sup>St</sup></i> -R	CCGAAAATAACGCAAGAAATTATTTTCCGGCAGCTTAA
pTD- <i>cysB<sup>St</sup></i> -down-F	TTAAGCTGCCGGAATAATTTCTTGCGTTATTTTCGG
pTD- <i>cysB<sup>St</sup></i> -down-R	GAGCTGCACATGAACTCGAGGCATAATGGTGACGACTCCA

<sup>1</sup>Each pTarget primer shares the same reverse primer pTarget R-common; <sup>2</sup>TrcV represents a primer complementary to the trc promoter.

通过 PCR 定点突变 pTarget 质粒, 构建了新的 20 bp 互补区的 sgRNA。

Donor DNA 的制备: 敲除目的基因时, 以 *E. coli* W3110 基因组为模板, PCR 扩增目的基因上下游各 1 000 bp 序列, 通过融合 PCR 获得完整 Donor DNA<sup>[28]</sup>。进行启动子替换时, 以 *E. coli* W3110 基因组为模板, 通过 PCR 扩增原始启动子上下游各 1 000 bp 序列, 以及 PCR 扩增获取启动子 P<sub>Trc</sub>, 通过融合 PCR 获得完整 Donor DNA。

pCas 的转化采用化学转化法。将 5 μL pCas 质粒加入到底盘菌感受态细胞中, 冰上静置 30 min, 42 °C 水浴 90 s, 在冰上静置 5 min, 加入 600 μL LB 培养基, 30 °C 孵育 2 h, 涂布于卡那霉素 (kanamycin, Kan) 抗性 LB 固体培养基平板, 30 °C 培养 12 h 后挑选单菌落。

pTarget 质粒和 Donor DNA 的转化采用电击转化法。将上述含 pCas 质粒的底盘细胞制备成电转感受态细胞<sup>[29]</sup>。将 2 μL Donor DNA 和 2 μL pTarget 质粒加入到感受态细胞中, 用

Bio-Rad MicroPulser 电穿孔。然后,加入 900  $\mu\text{L}$  的 LB 培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2.5 h, 涂布于盐酸壮观霉素 (spectinomycin, SD) 和 Kan 抗性平板, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆。编辑成功后, 将细胞培养于含有 Kan 抗生素和 0.1 mmol/L IPTG 的 10 mL LB 培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养除去 pTarget 质粒, 之后 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 除去 pCas 质粒<sup>[30]</sup>。

### 1.2.5 硫化氢的测定

将含有醋酸铅的纸条贴在培养基的内壁上, 高于液体培养物, 24 h 后取出纸条。通过试纸条的变色情况直观地评价菌株产生  $\text{H}_2\text{S}$  的水平。

### 1.2.6 代谢物的定量

L-半胱氨酸的检测: 由于 L-胱氨酸和 L-半胱氨酸可以通过简单的方法相互转化, 因此本研究中将 L-胱氨酸和 L-半胱氨酸的总含量计算为 L-半胱氨酸产量<sup>[12]</sup>。本研究中以 4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯 (4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride, CNBF) 作为衍生化试剂采用柱前衍生, 利用高效液相色谱法 (HPLC) 进行 L-胱氨酸和 L-半胱氨酸的检测。具体如下: 称取 0.27 g CNBF 溶于 10 mL 乙腈中作为 A 液; 以 0.2 mol/L 硼酸溶液和 0.05 mol/L 硼砂溶液作为母液, 4:1 体积混合配成 pH 为 9.0 的标准缓冲溶液作为 B 液; 先将样品稀释至 5 g/L 浓度以下, 按照样品 100  $\mu\text{L}$ 、A 液 300  $\mu\text{L}$  和 B 液 500  $\mu\text{L}$  混合, 恒温振荡器中 60  $^{\circ}\text{C}$ 、600 r/min 反应 1 h。样品过膜, 装入液相瓶中待测。液相检测仪器为赛默飞超高压液相色谱仪; 色谱柱为 C18 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 12  $\text{\AA}$ , J&K Scientific); 紫外检测器检测波长 260 nm<sup>[31]</sup>。梯度洗脱程序如表 4 所示。

葡萄糖的检测: 用 DNS 法检测残余葡萄糖<sup>[32]</sup>。

表 4 L-半胱氨酸高效液相色谱梯度洗脱程序

Table 4 HPLC gradient elution procedure for L-cysteine

Number	<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)
1	0	18	82
2	3	20	80
3	5	35	65
4	8	35	65
5	10	50	50
6	12	50	50
7	13	80	20
8	15	70	30
9	18	18	82
10	23	18	82

## 2 结果与分析

### 2.1 L-半胱氨酸生成途径的碳模块改造

L-丝氨酸是 *E. coli* 中 L-半胱氨酸生物合成的重要前体, 促进 L-丝氨酸的生物合成是提高 L-半胱氨酸产量的重要策略之一 (图 1)<sup>[14]</sup>。由基因 *serA* 编码的磷酸甘油酸脱氢酶 (phosphoglycerate dehydrogenase, PGDH) 是丝氨酸生物合成途径中的限速酶, 其受到 L-丝氨酸的反馈抑制。为了减少反馈抑制, 我们将 PGDH 的第 344 位和第 364 位氨基酸突变为丙氨酸<sup>[33-34]</sup>; 同时, 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术将编码 L-丝氨酸合成酶的基因 *serA*<sup>f</sup>、*serB* 和 *serC* 的原始启动子替换为强启动子 P<sub>Trc</sub>, 获得菌株 CYS0, 实现 L-丝氨酸 (0.67 $\pm$ 0.04) g/L 的积累 (图 2A)。由于细胞内的 L-丝氨酸能被 L-丝氨酸脱氨酶降解为丙酮酸和氨, 因此我们敲除了编码 L-丝氨酸脱氨酶的基因 *sdaA*、*sdaB* 和 *tdcG* 得到菌株 CYS1。研究结果表明, 菌株 CYS1 在摇瓶发酵 48 h 后, L-丝氨酸产量达到 (1.95 $\pm$ 0.2) g/L, 为菌株 CYS0 的 2.9 倍 (图 2A)。虽然加强 L-丝氨酸的生物合成和阻断 L-丝氨酸的降解是构建 L-半胱氨酸高产菌株的有效方式, 但菌株 CYS1 并未检测到 L-半胱氨

酸的积累。

## 2.2 提高硫模块对 L-半胱氨酸合成的影响

SAT 是 L-半胱氨酸生物合成途径中的一个关键酶,受到 L-半胱氨酸的反馈抑制<sup>[21]</sup>。我们对基因 *cysE* 定点突变获得 *cysE<sup>f</sup>* (*cysE<sup>Thr167Ala</sup>*),其可以有效减少反馈抑制<sup>[19-21]</sup>。然而,在菌株 CYS1 的基础上,上调基因 *cysE<sup>f</sup>* 的表达并不能

促进 L-半胱氨酸的生物合成,这可能是硫模块供给不足导致的。1 mol 的 L-半胱氨酸合成需要至少 1 mol 的硫。因此,L-半胱氨酸产量的提高需要同时伴随硫模块供给的加强<sup>[35]</sup>。在硫同化过程中调控因子 CysB 起着至关重要的作用,其参与控制硫源的吸收和利用,以及合成半胱氨酸的相关酶的表达。因此为促进

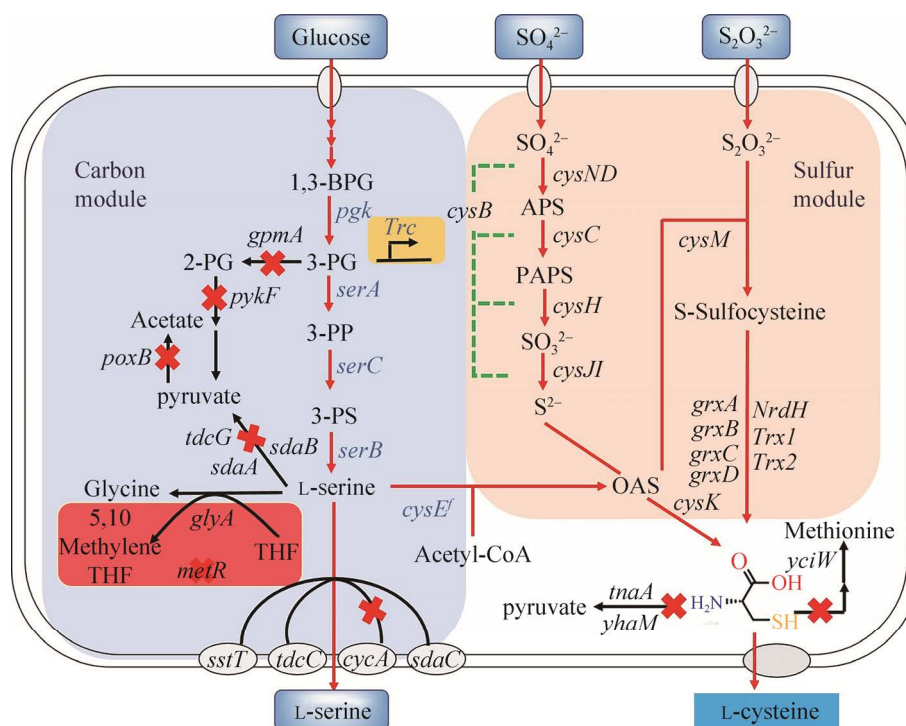


图1 *E. coli* W3110 中 L-半胱氨酸的生物合成途径及 L-半胱氨酸高产构建策略

Figure 1 Biosynthesis pathway of L-cysteine in *E. coli* W3110 and strategy of construction for L-cysteine overproduction. The blue genes represent that the genes are overexpressed. The red crosses show that the genes are knocked out. The light blue indicates carbon module. The pink indicates sulfur module. The genes involved are as follow: *pgk* encoding phosphoglycerate kinase; *serA* encoding D-3-phosphoglycerate dehydrogenase; *serB* encoding 3-phosphoserine phosphatase; *serC* encoding 3-phosphoserine aminotransferase; *sdaA* encoding L-serine deaminase I; *sdaB* encoding L-serine deaminase II; *tdcG* encoding L-serine deaminase III; *gpmA* encoding phosphoglyceromutase I; *pykF* encoding pyruvate kinase I; *poxB* encoding pyruvate dehydrogenase; *cycA* encoding serine transporter; *cysE* encoding serine acetyltransferase; *cysK* encoding cysteine synthase; *cysM* encoding S-sulfo-L-cysteine synthase; *cysB* encoding cys regulon transcriptional activator; *tnaA* encoding L-cysteine desulphydrase; *yhaM* encoding conserved hypothetical protein; *eamA* encoding O-acetylserine/cysteine efflux transporter; *cysDN* encoding sulfate adenylyltransferase; *cysC* encoding adenosine 5'-phosphosulfate kinase; *cysH* encoding 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase; *cysIJ* encoding sulfite reductase; *grxABCD* encoding glutaredoxin 1,2,3,4; *nrdH* encoding glutaredoxin-like protein; *trxB*, *trxC*, *trxD* encoding thioredoxin 1,2; *metR* encoding LysR family transcriptional regulator.

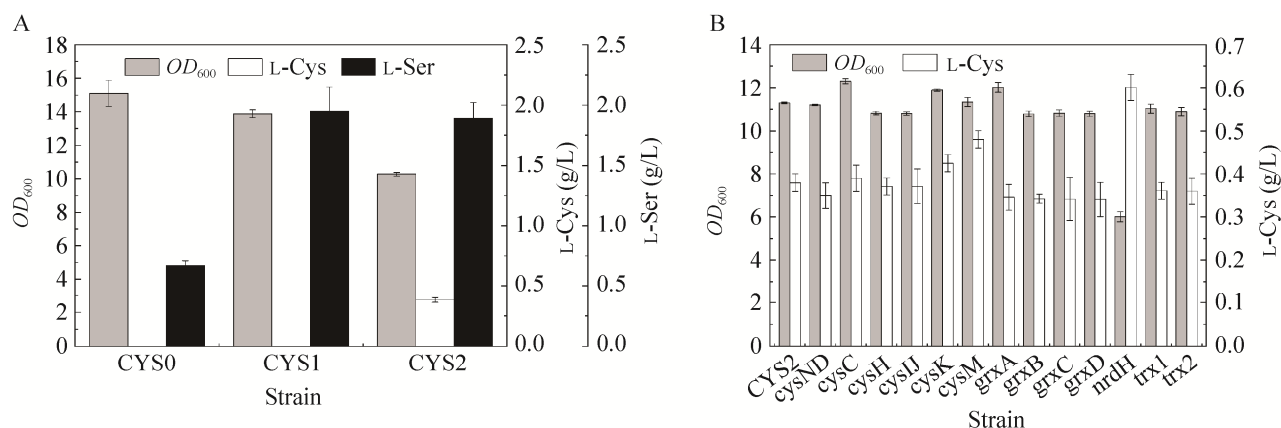


图 2 L-丝氨酸和 L-半胱氨酸高产菌株的构建及硫同化途径相关基因的过表达对细胞生长和 L-半胱氨酸生产的影响

Figure 2 Construction of an L-serine and L-cysteine hyper-producing strains and overexpressed genes related to sulfur assimilation pathways on cell growth and L-cysteine production. (A) L-serine and L-cysteine accumulation for CYS0, CYS1 and CYS2 strains. The strains were cultivated in MS medium in shake flasks at 30 °C and 150 r/min; The black bars represent OD<sub>600</sub>, the blue bars represent L-serine yield and the red bars represent L-cysteine yield. (B) On the basis of CYS2 strain, all genes related to sulfur assimilation were overexpressed in pTrc99A plasmid. The data represent the results of three independent experiments.

硫模块的协同补充,首先利用 P<sub>Trc</sub> 启动子在基因组上过表达 *cysB* 基因,获得菌株 CYS2。培养 48 h 后, CYS2 积累了 (0.38±0.02) g/L 的 L-半胱氨酸 (图 2A)。为了进一步提高硫的摄取,我们对硫酸盐同化途径和硫代硫酸盐同化途径中涉及的基因分别进行过表达<sup>[16]</sup>。有趣的是,在硫酸盐同化途径中,过表达 *cysND*、*cysC*、*cysH* 和 *cysIJ* 基因均未提高 L-半胱氨酸的产量,但过表达 *cysK* 时, L-半胱氨酸的产量达到 (0.42±0.01) g/L (图 2B)。随后,在菌株 CYS2 的基础上,通过质粒过表达参与硫代硫酸盐同化途径的基因 *cysM*、*nrdH*、*grxA*、*grxB*、*grxC*、*grxD*、*trx1* 和 *trx2*。其中,过表达 *cysM* 和 *nrdH* 的菌株, L-半胱氨酸产量分别达到 (0.49±0.05) g/L 和 (0.60±0.05) g/L,分别提高了 22.4%和 36.8%。值得注意的是,过表达 *nrdH* 基因的菌株的生物量降低了 50% (图 2B)。

### 2.3 进一步增强碳模块以促进 L-半胱氨酸的生物合成

为了进一步提高 L-半胱氨酸的合成, L-半胱氨酸的降解途径被削弱。在菌株 CYS2 的基础上,敲除参与 L-半胱氨酸降解的 *yhaM* 和 *tnaA*, 获得菌株 CYS3。发酵 48 h 后, 菌株 CYS3 的 L-半胱氨酸产量提高了 1.76 倍, 达到 (0.67±0.06) g/L, 但生物量下降了 34% (图 3A)。为了减少 L-半胱氨酸积累的毒性影响, 利用质粒过表达与 L-半胱氨酸转运蛋白 *eamA* 基因, 获得菌株 CYS4。菌株 CYS4 产生了 (0.90±0.05) g/L 的 L-半胱氨酸, 更重要的是在一定程度上恢复了细胞的生长 (图 3A)。这些结果表明, 降低胞内 L-半胱氨酸的水平以减少其毒性对 L-半胱氨酸的生产和细胞生长是至关重要的。为了进一步探索 L-半胱氨酸生物合成的限制因素, 对菌株 CYS3 的副产物进行了检测, 胞外检测到 (1.82±0.1) g/L 的

L-丝氨酸 (图 3A)。为了加强 L-丝氨酸向 L-半胱氨酸的转化, 构建了携带 *eamA* 和 *cysE'* 基因的质粒 pAE, 并将其转化到菌株 CYS3 中, 得到菌株 CYS5。CYS5 中的 L-半胱氨酸产量显著提高至  $(2.40 \pm 0.10)$  g/L, L-丝氨酸滴度下降至  $(0.25 \pm 0.03)$  g/L (图 3A)。另外, 我们将 L-丝氨酸内转运基因 *cycA*、*sstT*、*sdcC* 和 *tdcC* 分别进行加强。结果只有过表达 *cycA* 促进了 L-半胱氨酸的生物合成 (图 3B), 菌株 CYS6

的 L-半胱氨酸滴度增加到  $(2.70 \pm 0.12)$  g/L (图 3A)。在 CYS 系列菌株中也检测到其他副产物, 包括腺苷-L-蛋氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 和丙酮酸。CYS6 的 SAM 产量提高至  $(0.91 \pm 0.07)$  g/L, 为菌株 CYS5 的 1.97 倍 (表 5), 同时检测到丙酮酸的浓度为  $(1.86 \pm 0.05)$  g/L, 显著高于菌株 CYS5 (表 5)。为了减少菌株 SAM 的积累, 将参与 L-蛋氨酸生物合成的 *yciW* 和 *metR* 代谢基因敲除, 得

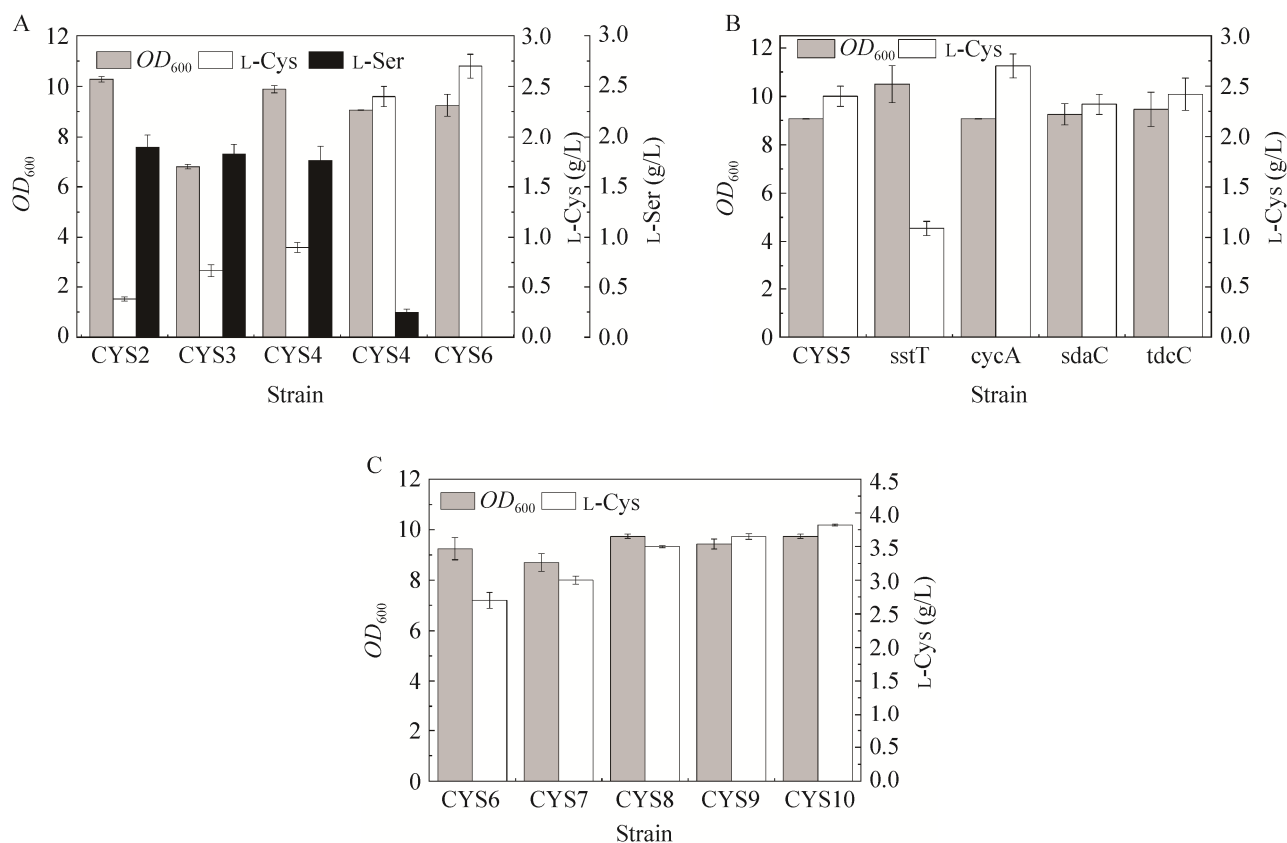


图 3 L-半胱氨酸高产菌株的构建

Figure 3 Construction of an L-cysteine hyper-producing strains. (A) L-serine and L-cysteine production for CYS2, CYS3, CYS4, CYS5 and CYS6. The strains were cultivated in MS medium in shake flasks at 30 °C and 150 r/min. (B) Effects of knockout for L-serine transporter genes (*sstT*, *tdcG*, *cycA* and *sdaC*) on cell growth and L-cysteine production. *E. coli* strains were cultivated in MS medium in shake flasks at 30 °C and 150 r/min; the black bars: OD<sub>600</sub>; the red bars: L-cysteine yield. (C) L-cysteine production for CYS6, CYS7, CYS8, CYS9 and CYS10. *E. coli* strains were cultivated in MS medium in shake flasks at 30 °C and 150 r/min; the black bars: OD<sub>600</sub>; the red bars: L-cysteine yield. The data represent the results of three independent experiments.

表 5 不同菌株的丙酮酸、SAM、乙酸、琥珀酸含量以及糖酸转化率和硫转化率

Table 5 The contents of pyruvate, SAM, acetic acid and succinic acid, converting rate from glucose to cysteine and sulfur conversion rate in different strains

Strains	Pyruvate (g/L)	SAM (g/L)	Acetic acid (g/L)	Succinic acid (g/L)	Yield relative to glucose (%)	Yield relative to sulfur (%)	Titer of L-cysteine (g/L)
W3110	5.10±0.09	ND	1.60±0.06	0.8±0.04	0.00	0	ND
CYS2	3.80±0.05	ND	1.72±0.09	ND	1.90	2.1	0.38±0.02
CYS3	2.73±0.12	0.12±0.09	1.79±0.05	ND	3.35	3.8	0.67±0.06
CYS4	2.30±0.07	0.26±0.11	1.92±0.09	ND	4.50	5.1	0.90±0.05
CYS5	0.95±0.02	0.46±0.06	2.20±0.12	ND	12.00	13.5	2.40±0.10
CYS6	1.86±0.05	0.91±0.07	2.27±0.09	ND	13.50	15.2	2.70±0.12
CYS7	1.91±0.09	0.39±0.08	2.18±0.07	ND	15.00	16.9	3.00±0.06
CYS8	1.35±0.15	0.11±0.08	2.34±0.10	ND	17.50	19.7	3.50±0.01
CYS9	1.43±0.08	0.09±0.05	1.20±0.08	ND	18.25	20.6	3.65±0.04
CYS10	1.52±0.16	0.14±0.10	1.24±0.07	ND	19.10	21.5	3.82±0.01

ND: not detected.

到菌株 CYS7。如图 3C 所示, 菌株 CYS7 的 L-半胱氨酸产量提高至 (3.00±0.06) g/L, 糖酸转化率达到 15%, 硫转化率为 16.9% (表 5)。

## 2.4 碳模块和硫模块协同表达优化代谢通量

为了将碳代谢流定向到 L-丝氨酸的生物合成途径, 糖酵解途径中的基因 *gpmA* (编码磷酸甘油突变酶 I) 和 *pykF* (编码丙酮酸激酶 I) 被敲除, 并过表达基因 *pgk* (编码磷酸甘油酸激酶)。同时, 将来源于谷氨酸棒状杆菌的 *serC<sup>Cg</sup>* 克隆到质粒 pAE 中得到质粒 pEAC, 将质粒转化到菌株 CYS7 中, 得到菌株 CYS8, 实现了 (3.50±0.01) g/L 的 L-半胱氨酸积累 (图 3C), 但仍有 (2.34±0.10) g/L 的乙酸积累 (表 5)。为了减少乙酸积累提升糖酸转化率, 对基因 *poxB* (编码丙酮酸氧化酶) 进行敲除, 获得菌株 CYS9, 其 L-半胱氨酸产量达到 (3.65±0.04) g/L, 乙酸积累显著下降 (图 3C)。在副产物减少、碳模块进一步加强后, 重新考虑优化硫模块的通量。首先, 将 *E. coli* 基因组中的 *cysB* 基因替换为鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的 *cysB<sup>St</sup>* 基因<sup>[36]</sup>, 得到 CYS10。结果表明, CYS10 的产量提升到 (3.82±0.01) g/L (图 3C)。同时, 筛选出了与硫

酸盐同化途径和硫代硫酸盐同化途径相关的基因, 并在质粒 pAEC 上进行过表达。单基因过表达结果显示 (图 4), *cysM*、*nrdH*、*cysK* 和 *cysIJ* 的过表达促进了 L-半胱氨酸的积累 (图 2B)。为了进一步验证碳硫模块协同表达

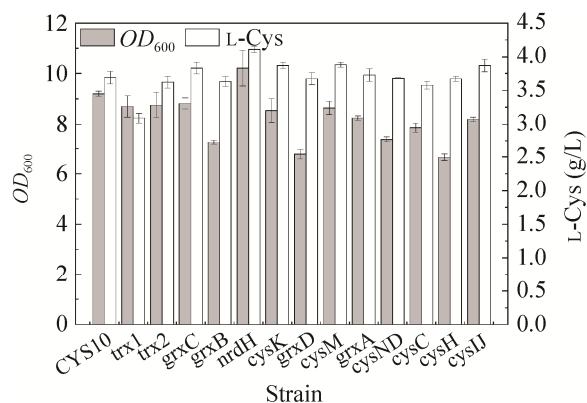


图 4 过表达硫同化基因对细胞生长和 L-半胱氨酸合成的影响

Figure 4 Effects of overexpression sulfur assimilation genes on cell growth and L-cysteine production. All sulfur assimilation genes were overexpressed in pAEC and then transferred into the strain CYS10. *E. coli* strains were cultivated in SM medium in shake flask at 30 °C and 150 r/min; the black bars:  $OD_{600}$ ; the red bars: L-cysteine yield. The data represent the results of three independent experiments.



后对菌株生长的影响,我们对 CYS 系列菌株摇瓶发酵过程中的硫化氢生成量进行了检测(图 5),结果发现 L-半胱氨酸生成途径中碳模块的增强致使硫化氢的产生量增加,而 L-半胱氨酸外转运系统的加强以及削弱其降解途径后使得硫化氢的生成量显著降低,符合改善硫利用率的策略,这也有利于 L-半胱氨酸的积累。

为了进一步优化碳硫模块的平衡,精确控制硫代谢途径基因的表达式,选择较高 (H)、中等 (M) 和低 (L) 强度的 3 个启动子 (图 6A),通过利用不同强度的启动子,来表达硫模块基因以平衡硫的利用。在先前的实验中 (图 4),

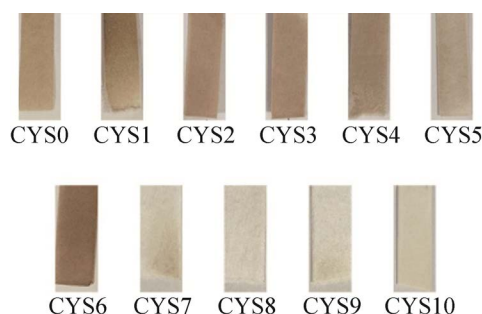
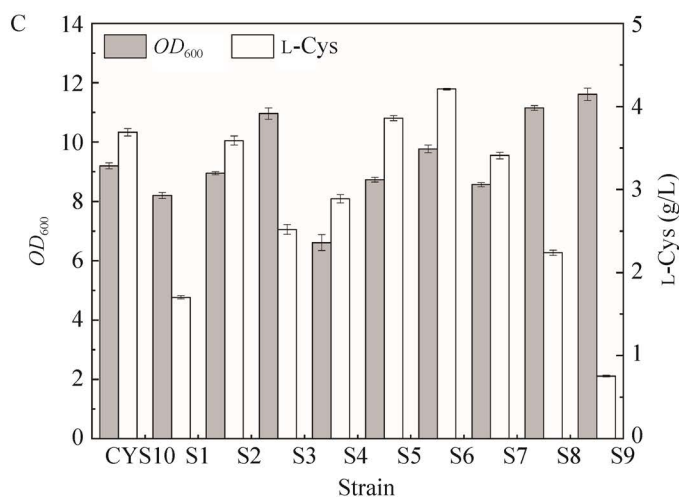
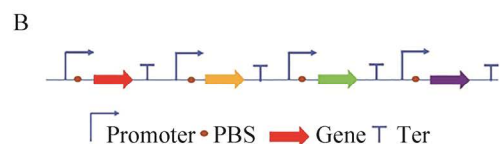
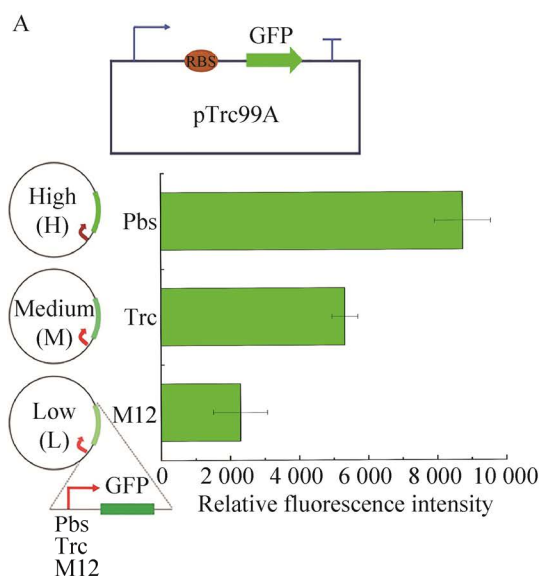


图 5 CYS 系列代谢改造菌株生长中硫化氢产生水平

Figure 5 Levels of  $H_2S$  production in the growth of CYS series metabolically modified strains. Lead acetate-soaked paper strips show a PbS brown or black stain as a result of reaction with  $H_2S$ , the darkness on the strip represents the level of  $H_2S$  generation.



<i>cysM</i>	H	H	H	M	M	M	L	L	L
<i>nrdH</i>	H	M	L	H	M	L	H	M	L
<i>cysK</i>	H	M	L	M	L	H	L	H	M
<i>cysIJ</i>	H	M	L	L	H	M	M	L	H

图 6 使用不同启动子对硫模块的组合优化

Figure 6 Combinatorial optimization of sulfur module with different promoters. (A) Fluorescence intensity of three promoters (Pbs: H, Trc: M and M12: L) on pTrc99A plasmid. (B) The component and structure of the genetic modules. (C) Effects of combinations of four genes (*cysM*, *nrdH*, *cysK* and *cysIJ*) under control of three different strength promoters on L-cysteine titer; CYS10 was the blank strain. The data represent the results of three independent experiments.



我们筛选出了 *cysM*、*nrdH*、*cysK* 和 *cysIJ* 4 个基因对 L-半胱氨酸的产量有直接影响。因此确定了 Pbs、Trc 和 M12 启动子和这 4 个基因进行组合获得不同转录单元 (图 6B)。同时,采用正交模型作为筛选方法,得到 9 个组合 (图 6C)。将 9 个转录组合克隆到质粒 pAEC 中,随后分别转入菌株 CYS10 (图 6C)。结果表明,不同的表达水平组合, L-半胱氨酸产量有显著差异 (图 6C)。菌株 S6 的 L-半胱氨酸产量达到  $(4.17 \pm 0.07)$  g/L,糖酸转化率为 20.9%,硫转化率为 23.5%。最终,通过 2 L 生物反应器进行分批补料发酵,以评价其工业化生产 L-半胱氨酸的可行性。分批补料发酵结果显示,在发酵 47 h 后, L-半胱氨酸达到最高浓度为  $(11.94 \pm 0.1)$  g/L (图 7)。研究结果表明促进碳硫模块平衡是 L-半胱氨酸生物合成的有效策略。

### 3 讨论与结论

尽管微生物发酵是氨基酸生产中最常见的方法,但由于 L-半胱氨酸其复杂的代谢网络

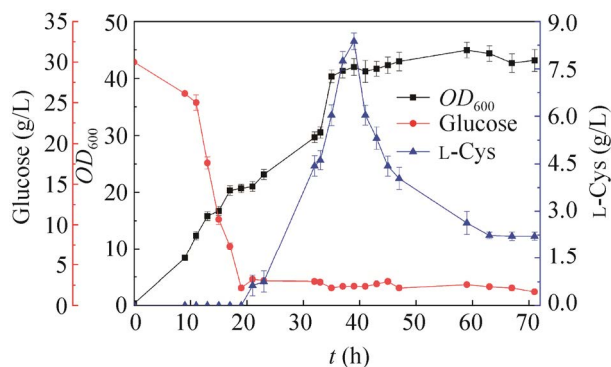


图 7 2 L 生物反应器补料分批发酵生产 L-半胱氨酸

Figure 7 Production of L-cysteine in 2 L bioreactor fed-batch fermentation for S6.  $OD_{600}$  (black filled squares), residual glucose (red filled circles) and L-cysteine titer (blue filled upright triangle). The data represent the results of three independent experiments.

和对细胞的毒性,使得微生物发酵法生产 L-半胱氨酸仍然面临诸多需要系统解决的挑战<sup>[35]</sup>。L-半胱氨酸生物合成还受到了其生理功能的影响,如二硫键的形成缺乏稳定性、存在氧化应激反应以及蛋白质的折叠问题<sup>[37-38]</sup>。为了识别和解除 L-半胱氨酸生物合成的限速步骤,本研究分析了 L-半胱氨酸合成途径的反馈抑制和生长抑制等潜在瓶颈,通过碳和硫模块之间的基因协调表达策略,逐步提高 L-半胱氨酸的产量。

提高 L-半胱氨酸合成途径的碳代谢通量对 L-半胱氨酸的生产有着深远影响。过表达 *serA'*、*serB*、*serC*、*cysE'* 和敲除编码 L-丝氨酸降解的基因 *sadA*、*sdaB* 和 *tdcG* 可增强 *E. coli* 中 OAS 的生成。然而,只提高 L-半胱氨酸合成途径碳代谢通量对其的积累还是有限的,在其他半胱氨酸合成改造研究中,如 *E. coli* JM240、*C. glutamicum* ATCC13032 和 *E. coli* MG1655 等工程菌<sup>[4,6,9]</sup>更多的是对碳通量部分的改造和削弱产物降解方面进行研究,但最终产量提升相当有限 (表 1)。本研究中,只有在提高硫源同化效率后 (过表达全局调控因子 CysB), L-半胱氨酸的积累才能被检测到 (图 2A),这表明 L-半胱氨酸的产生只能在硫模块和碳模块同时输出的情况下实现。本研究对 L-丝氨酸结点进行系统的探究,通过敲除 *gpmA* 和 *pykF* 基因及过表达 *serC<sup>Cg</sup>* 和 *pgk* 基因,使得 L-半胱氨酸产量达到  $(3.5 \pm 0.01)$  g/L。碳硫模块的协同表达有效提高 L-丝氨酸向 L-半胱氨酸的转化过程。除此之外,我们还对 L-丝氨酸内运基因 *cycA* 进行过表达,使得 L-半胱氨酸产量实现进一步增长。

为了减少 L-半胱氨酸的降解以及其对细胞的毒性,我们对 L-半胱氨酸代谢进行了系统研究。*E. coli* 已知含有 5 种具有 L-半胱氨酸脱硫酶 (L-cysteine desulphydrase, CDs) 活性的酶,通过对 CDs 相关基因的敲除后实验结果表明,

敲除 *tnaA* 和 *yhaM* 能有效减少 L-半胱氨酸的降解, 促进 L-半胱氨酸的积累 (图 3A)。然而, 细胞内高水平的 L-半胱氨酸积累会对细胞造成生理毒性。因此, 对编码 L-半胱氨酸外转运蛋白的基因 *eamA* 进行过表达, 结果证明提高外转运效率是高产 L-半胱氨酸的有效途径 (图 3A)。此外, 本研究对 L-半胱氨酸合成其他代谢物的途径也进行了研究。敲除基因 *metR* 和 *glyA* 后, L-半胱氨酸向 L-蛋氨酸转化途径与 L-丝氨酸向甘氨酸的转化途径被抑制<sup>[39-40]</sup>。然而, 敲除 *glyA* 菌株表现出生长迟缓以及 L-半胱氨酸产量显著的下降。有趣的是, 敲除 *glyA* 菌株几乎没有产生  $H_2S$ , 而  $H_2S$  是参与应激反应的信号分子<sup>[41]</sup>。最近的一项研究报道了  $H_2S$  和碳代谢之间的联系, 这揭示了 L-半胱氨酸代谢、碳代谢和氧化应激反应之间可能存在复杂的调控<sup>[42]</sup>。

在本研究中, 碳硫模块之间的协同表达被证明是高效生产 L-半胱氨酸的可靠策略。*E. coli* 中存在硫代硫酸盐和硫酸盐 2 条不同的同化途径用于转化为 L-半胱氨酸 (图 1), 硫代硫酸盐途径需要消耗 1 个 ATP 和 1 个 NADPH, 远低于硫酸盐途径<sup>[35]</sup>。对于将 SSC 还原为 L-半胱氨酸的氧化还原酶 (*trxB*、*trxB*、*grxA*、*grxB*、*grxC*、*cysM* 和 *nrdH*), 我们的结果与之前关于 *cysM* 和 *nrdH* 过表达的积极影响的报道一致 (图 2B)<sup>[16]</sup>, 但 *grxA* 在本研究中对 L-半胱氨酸的产生不起作用。最近有研究报道 *grxA* 参与硫应激反应<sup>[16]</sup>。我们推测 L-半胱氨酸的高产量会导致细胞内硫应激。因此, *grxA* 在该过程中的主要生理作用可能是参与硫的降解。然后, 我们试图分别过表达参与硫酸盐途径的 5 个基因 *cysDN*、*cysC*、*cysH*、*cysIJ* 和 *cysK*, 但只有 *cysIJ* 和 *cysK* 对 L-半胱氨酸的产生显示出积极的影响 (图 4)。此外, 我们还对所有 CYS 系列菌株生长过程

中  $H_2S$  产生量进行测定, 结果发现通过碳硫模块的协同表达,  $H_2S$  产生量显著降低, 我们推测碳模块通量的增强时, 增加了 OAS 的合成, OAS 的积累结合并激活调控因子 CysB, 激活的 CysB 增强了亚硫酸盐还原酶 (CysIJ) 和 O-乙酰丝氨酸硫基化酶 A (CysK) 等半胱氨酸合成相关基因的表达<sup>[43]</sup>, 进而导致半胱氨酸的积累。为了保护细胞免受 L-半胱氨酸毒性的伤害, 细胞通过调控降解系统中 L-半胱氨酸脱硫酶途径和 3-巯基丙酮酸硫转移酶途径 (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST) 相关酶的表达降解半胱氨酸产生  $H_2S$ <sup>[44-45]</sup>。随着 L-半胱氨酸外转运系统的加强以及降解途径的削弱, 积累的 L-半胱氨酸通过转运系统离开胞内, 避免了降解而产生  $H_2S$ , 进一步说明半胱氨酸生物合成中碳硫的微妙平衡是至关重要的。为了进一步优化硫同化途径的通量, 我们利用不同强度的启动子 Pbs、Trc 和 M12<sup>[46-47]</sup> 控制 *cysM*、*nrdH*、*cysK* 和 *cysIJ* 基因的表达, 最终得到菌株 S6 产生  $(4.17 \pm 0.07)$  g/L 的 L-半胱氨酸, 补料分批发酵生产得到 11.94 g/L 的 L-半胱氨酸, 硫转化率达到 63.09%。有趣的是, 菌株 S3、S8 和 S9 显示出比其他菌株更高的生物量, 但 L-半胱氨酸积累量降低。L-半胱氨酸还参与蛋氨酸、谷胱甘肽和蛋白质的生物合成<sup>[14]</sup>; 更重要的是, 它在由活性硫介导的氧化应激保护和细胞信号传导中起作用<sup>[48]</sup>。细胞使用不同的机制来控制细胞内硫稳态, 这也是硫酸盐、硫化物和 L-高半胱氨酸等处于相对稳定状态的潜在原因<sup>[38]</sup>。

通过本研究结果与其他 L-半胱氨酸工程菌改造情况对比, 推测半胱氨酸生物合成中碳硫代谢间存在微妙的平衡, 仅依赖简单的碳硫通量调节对 L-半胱氨酸的合成是有限的, 只有在碳和硫模块通量在适当比例下才能实现高效的

L-半胱氨酸生物合成。硫和碳模块之间的这种协调状态不仅揭示了硫同化和碳代谢之间的有趣联系,同时也证明了独立研究单一系统的困难,应在系统水平考虑各种细胞表型。本研究从代谢工程角度进一步解释了 L-半胱氨酸生物合成中的难点,以及维持细胞内硫稳态机制的重要性。

### 致谢:

感谢中国科学院微生物研究所的姜成英研究员和刘双江研究员为基因组编辑提供了 pCas9 和 pTarget 质粒。

### REFERENCES

- [1] Hicks JL, Mullholland CV. Cysteine biosynthesis in *Neisseria* species. *Microbiology* (Reading), 2018, 164(12): 1471-1480.
- [2] Lee SM, Jeong EM, Jeong J, et al. Cysteamine prevents the development of lens opacity in a rat model of selenite-induced cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(3): 1452-1459.
- [3] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(1): 1-8.
- [4] Takumi K, Ziyatdinov MK, Samsonov V, et al. Fermentative production of cysteine by *Pantoea ananatis*. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(5): e02502-e02516.
- [5] Mazhar AN, Rauf SF, Shakoori AR. Improvement in cysteine production by local bacterial isolates. *Pak J Zool*, 2011, 43(4): 805-808.
- [6] Wei L, Wang H, Xu N, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-cysteine production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(3): 1325-1338.
- [7] Joo YC, Hyeon JE, Han SO. Metabolic design of *Corynebacterium glutamicum* for production of L-cysteine with consideration of sulfur-supplemented animal feed. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(23): 4698-4707.
- [8] Wada M, Takagi H. Metabolic pathways and biotechnological production of L-cysteine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73(1): 48-54.
- [9] Denk D, Böck A. L-cysteine biosynthesis in *Escherichia coli*: nucleotide sequence and expression of the serine acetyltransferase (*cysE*) gene from the wild-type and a cysteine-excreting mutant. *J Gen Microbiol*, 1987, 133(3): 515-525.
- [10] Wiriyathanawudhiwong N, Ohtsu I, Li ZD, et al. The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 81(5): 903-913.
- [11] Liu H, Fang GC, Wu H, et al. L-cysteine production in *Escherichia coli* based on rational metabolic engineering and modular strategy. *Biotechnol J*, 2018, 13(5): 1700695.
- [12] Liu H, Wang Y, Hou YH, et al. Fitness of chassis cells and metabolic pathways for L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(50): 14928-14937.
- [13] Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, et al. H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 2011, 334(6058): 986-990.
- [14] Takagi H, Ohtsu I. L-cysteine metabolism and fermentation in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2017, 159: 129-151.
- [15] Kawano Y, Onishi F, Shiroyama M, et al. Improved fermentative L-cysteine overproduction by enhancing a newly identified thiosulfate assimilation pathway in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(18): 6879-6889.
- [16] Nakatani T, Ohtsu I, Nonaka G, et al. Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 62.
- [17] Yamazaki S, Takei K, Nonaka G. *ydjN* encodes an S-sulfocysteine transporter required by *Escherichia coli* for growth on S-sulfocysteine as a sulfur source. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(17): fw185.
- [18] Kredich NM, Tomkins GM. The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 1966, 241(21): 4955-4965.
- [19] Huang JF, Shen ZY, Mao QL, et al. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranched and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [20] Maier THP. Semisynthetic production of unnatural L-alpha-amino acids by metabolic engineering of the cysteine-biosynthetic pathway. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(4): 422-427.
- [21] Nakamori S, Kobayashi SI, Kobayashi C, et al. Overproduction of L-cysteine and L-cystine by *Escherichia coli* strains with a genetically altered serine acetyltransferase. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(5): 1607-1611.
- [22] Daßler T, Maier T, Winterhalter C, et al. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol Microbiol*, 2000, 36(5): 1101-1112.

- [23] Liu H, Hou YH, Wang Y, et al. Enhancement of sulfur conversion rate in the production of L-cysteine by engineered *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(1): 250-257.
- [24] Liu ZQ, Lu MM, Zhang XH, et al. Significant improvement of the nitrilase activity by semi-rational protein engineering and its application in the production of iminodiacetic acid. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 563-571.
- [25] Xu JM, Li JQ, Zhang B, et al. Fermentative production of the unnatural amino acid L-2-aminobutyric acid based on metabolic engineering. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 43.
- [26] Jiang FG, Zhou KH, Ma LL, et al. STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 2015, 348(6242): 1477-1481.
- [27] Jiang FG, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol*, 2015, 30: 100-111.
- [28] Huang JF, Liu ZQ, Jin LQ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(4): 843-851.
- [29] Thomason LC, Sawitzke JA, Li XT, et al. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol*, 2014, 106: 1.16.1-1.16.39.
- [30] Sung LY, Wu MY, Lin MW, et al. Combining orthogonal CRISPR and CRISPRi systems for genome engineering and metabolic pathway modulation in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(5): 1066-1079.
- [31] Shi TY, Tang T, Qian K, et al. High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal Chim Acta*, 2009, 654(2): 154-161.
- [32] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [33] Gu PF, Yang F, Su TY, et al. Construction of an L-serine producing *Escherichia coli* via metabolic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(9): 1443-1450.
- [34] Mundhada H, Schneider K, Christensen HB, et al. Engineering of high yield production of L-serine in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(4): 807-816.
- [35] Kawano Y, Suzuki K, Ohtsu I. Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize L-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(19): 8203-8211.
- [36] Hryniewicz MM, Kredich NM. Hydroxyl radical footprints and half-site arrangements of binding sites for the CysB transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1995, 177(9): 2343-2353.
- [37] Peng H, Zhang YX, Trinidad JC, et al. Thioredoxin profiling of multiple thioredoxin-like proteins in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2385.
- [38] Shimizu T, Shen JC, Fang MX, et al. Sulfide-responsive transcriptional repressor SqrR functions as a master regulator of sulfide-dependent photosynthesis. *PNAS*, 2017, 114(9): 2355-2360.
- [39] Lorenz E, Stauffer GV. MetR-mediated repression of the *glyA* gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 144(2/3): 229-233.
- [40] Mundhada H, Seoane JM, Schneider K, et al. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through adaptive laboratory evolution. *Metab Eng*, 2017, 39: 141-150.
- [41] Mironov A, Seregina T, Nagornykh M, et al. Mechanism of H<sub>2</sub>S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *PNAS*, 2017, 114(23): 6022-6027.
- [42] Luhachack L, Rasouly A, Shamovsky I, et al. Transcription factor YcjW controls the emergency H<sub>2</sub>S production in *E. coli*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2868.
- [43] Monroe RS, Ostrowski J, Hryniewicz MM, et al. *In vitro* interactions of CysB protein with the *cysK* and *cysJH* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1990, 172(12): 6919-6929.
- [44] Awano N, Wada M, Kohdoh A, et al. Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(2/3): 239-243.
- [45] Awano N, Wada M, Mori H, et al. Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7): 4149-4152.
- [46] Lu J, Tang JL, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455-2462.
- [47] Yang S, Liu QT, Zhang YF, et al. Construction and characterization of broad-spectrum promoters for synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(1): 287-291.
- [48] Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, et al. Chemical biology of H<sub>2</sub>S signaling through persulfidation. *Chem Rev*, 2018, 118(3): 1253-1337.

(本文责编 郝丽芳)