

· 工业生物技术 ·

代谢工程改造大肠杆菌生产水杨酸葡萄糖苷

李若松^{1,2,3}, 彭彦峰^{2*}, 马龙^{1,3}, 王钦宏^{2*}

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

李若松, 彭彦峰, 马龙, 王钦宏. 代谢工程改造大肠杆菌生产水杨酸葡萄糖苷[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3290-3301.

LI Ruosong, PENG Yanfeng, MA Long, WANG Qinong. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salicylate 2-O-β-D-glucoside[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3290-3301.

摘要: 水杨酸葡萄糖苷(salicylate 2-O-β-D-glucoside, SAG), 是植物中水杨酸的一种存在形式。水杨酸葡萄糖苷也具有消炎止痛的作用, 和水杨酸、阿司匹林对比, 表现出更小的刺激性, 是一种具有潜力的消炎护肤物质。通过生物法利用可再生资源进行水杨酸类物质的生产方式, 与传统工业法生产相比对环境更加友好。本研究以大肠杆菌(*Escherichia coli*) Tyr002 作为出发菌株, 引入铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)异分支酸裂解酶基因 *pchB*, 首先构建了大肠杆菌水杨酸生产菌株。通过调控下游不同芳香族氨基酸代谢途径关键基因表达, 菌株摇瓶发酵水杨酸产量达到 1.05 g/L。之后, 通过在水杨酸生产菌株中引入植物来源水杨酸糖基转移酶, 对水杨酸进行糖苷化修饰。新构建的菌株摇瓶发酵水杨酸葡萄糖苷产量达到 5.7 g/L。在 5 L 发酵罐分批补料发酵中, 水杨酸葡萄糖苷的产量达到 36.5 g/L, 是目前报道的最高产量。本研究为水杨酸类化合物的微生物合成提供了重要参考。

关键词: 大肠杆菌; 水杨酸; 水杨酸葡萄糖苷; 代谢工程

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400); 国家自然科学基金(32200063); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CXRC-057)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400), the National Natural Science Foundation of China (32200063), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-057).

*Corresponding authors. E-mail: PENG Yanfeng, peng_yf@tib.cas.cn; WANG Qinong, wang_qh@tib.cas.cn

Received: 2023-04-10; Accepted: 2023-05-29

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salicylate 2-O- β -D-glucoside

LI Ruosong^{1,2,3}, PENG Yanfeng^{2*}, MA Long^{1,3}, WANG Qinhong^{2*}

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

2 CAS Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Salicylate 2-O- β -D-glucoside (SAG) is a derivative of salicylate in plants. Recent reports showed that SAG could be considered as a potential anti-inflammatory substance due to its anti-inflammatory and analgesic effects, and less irritation compared with salicylic acid and aspirin. The biological method uses renewable resources to produce salicylic acid compounds, which is more environmentally friendly than traditional industry methods. In this study, *Escherichia coli* Tyr002 was used as the starting strain, and a salicylic acid producing strain of *E. coli* was constructed by introducing the isochorismate pyruvate lyase gene *pchB* from *Pseudomonas aeruginosa*. By regulating the expression of the key genes in the downstream aromatic amino acid metabolic pathways, the titer of salicylic acid reached 1.05 g/L in shake flask fermentation. Subsequently, an exogenous salicylic acid glycosyltransferase was introduced into the salicylic acid producing strain to glycosylate the salicylic acid. The newly engineered strain produced 5.7 g/L SAG in shake flask fermentation. In the subsequent batch fed fermentation in a 5 L fermentation tank, the titer of SAG reached 36.5 g/L, which is the highest titer reported to date. This work provides a new route for biosynthesis of salicylate and its derivatives.

Keywords: *Escherichia coli*; salicylate; salicylate 2-O- β -D-glucoside; metabolic engineering

水杨酸(salicylic acid, SA)最初以柳树皮为原料进行制备,因此又称柳酸^[1]。作为植物激素,水杨酸在自然界分布较广泛,具有调节植物抗逆反应等多种功能,其本身也具有较好的抑菌性。在不同环境条件下,植物会对水杨酸进行不同的化学修饰,产生的水杨酸衍生物在物理性质、化学性质以及功能性上与水杨酸本身相差较大,植物通过这种方式进行水杨酸的存储运输的控制,并调控水杨酸介导的生理活动^[2-4]。其中水杨酸葡萄糖苷(salicylate 2-O- β -D-glucoside, SAG)是植物中水杨酸主要的存在形式之一,是水杨酸在植物中被存储和运输的主要形式。

水杨酸葡萄糖苷在运输至细胞间质后,可被催化为水杨酸行使调节功能,这一反应早在20世纪就被观测到,但具体反应机制和相关蛋白目前仍不清楚。水杨酸葡萄糖苷也具有水杨酸类的消炎效果,在对细胞的一氧化氮浓度产生影响的测试中,与水杨酸和阿司匹林对比,水杨酸葡萄糖苷使得受体细胞一氧化氮(nitric oxide, NO)的浓度有更大幅度的下降,是一种具有潜力的消炎药物。同时,水杨酸葡萄糖苷结构上与水杨苷类似,水杨苷目前在膳食补充剂和天然组分阿司匹林替代物方面都有着应用,同样作为天然水杨酸类衍生物的水杨酸葡萄糖

昔也有着极大的应用潜力。部分微生物也具有合成水杨酸作为代谢中间物的能力,从莽草酸途径下游产物分支酸出发,经过变位得到异分支酸^[5],之后在异分支酸裂解酶的催化下裂解产生水杨酸和丙酮酸。2015年,Noda等^[6]在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中引入外源的异分支酸裂解酶构建了水杨酸生产菌株,并对其他消耗磷酸烯醇式丙酮酸的途径进行了敲除,利用延迟发酵的策略,在1L发酵罐中达到了11.5 g/L的产量,是目前唯一进行了放大发酵的水杨酸生产报道。Ahmadi等^[7]利用共培养的策略,引入水杨酸葡萄糖转移酶 UGT74F1,实现了水杨酸葡萄糖苷摇瓶水平的生产,达到了2.5 g/L的生产水平,并测试SAG相对于SA和乙酰水杨酸盐(阿司匹林)的抗炎特性。结果表明,SAG和阿司匹林在减少巨噬细胞的NO和活性氧(reactive oxygen species, ROS)方面的活性相当,但没有观察到对细胞活力的明显负面影响。作者所在研究组通过对大肠杆菌包括 *pykAF*、*aroF*、*aroE*、*tktA* 等多个代谢位点进行组合调控,

同时以同工酶替换的方式解除 *aroG* 带来的抑制,并替换葡萄糖转运系统,构建了莽草酸途径优化后的一系列芳香族化合物生产菌株。

水杨酸的生产由于其抑菌性原因受到了限制。对水杨酸进行糖苷化,合成水杨酸葡萄糖苷可以减弱产物对生产和细胞生长的抑制,但已报道糖苷化产物量仍较低,且工艺较复杂。本研究组前期通过代谢工程改造获得了1株高产3-脱氢莽草酸的大肠杆菌工程菌WJ60^[8],其5L发酵罐分批补料发酵的3-脱氢莽草酸产量达95 g/L。该菌株可提供足够代谢通量的莽草酸合成途径相关代谢产物,为构建高产水杨酸生产菌株奠定基础。本研究以WJ60中恢复 *aroE* 基因弱化调控的工程菌株Tyr002为出发菌株,引入铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)异分支酸裂解酶基因 *pchB*,调控分支酸下游水杨酸代谢途径及不同芳香族氨基酸代谢途径关键基因表达,构建了水杨酸生产菌株。之后,通过引入植物来源水杨酸糖基转移酶,对水杨酸进行糖苷化修饰获得了1株高产水杨酸葡萄糖苷的菌株(代谢途径见图1)。

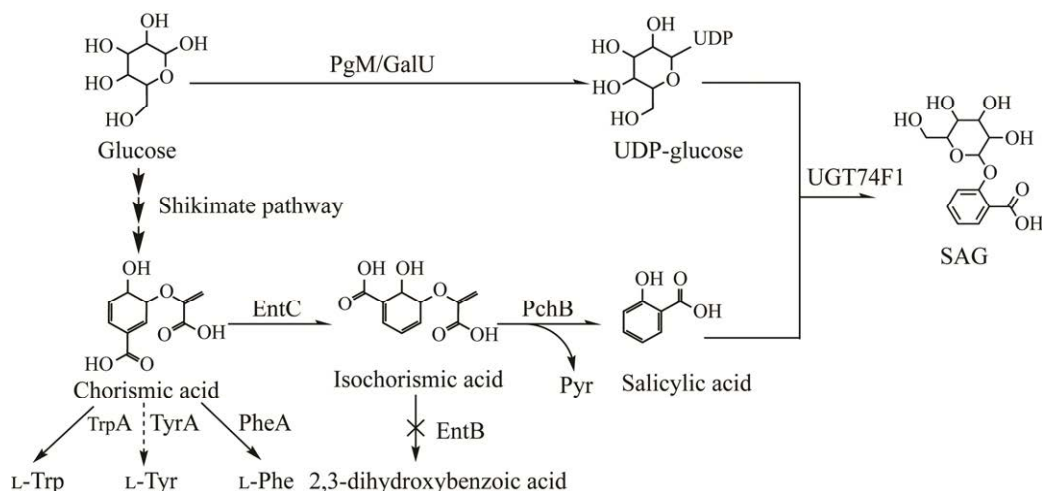


图1 水杨酸葡萄糖苷合成途径

Figure 1 Synthetic pathway of SAG. EntB: Bifunctional isochorismate lyase; EntC: Isochorismate synthase; GalU: UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase; L-Tyr: L-tyrosine; L-Phe: L-phenylalanine; L-Trp: L-tryptophan; PchB: Isochorismate pyruvate lyase; PgM: Phosphoglucomutase; UDP-glucose: Uridine diphosphate glucose; UGT74F1: UDP-glycosyltransferase; Pyr: Pyruvic acid; SAG: Salicylate-2-O- β -D-glucoside.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本实验所用菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 使用试剂

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒小量快速提取试剂盒与 DNA 回收试剂盒购自康为世纪生物科技股份有限公司;快速克隆重组酶 SooSoMix 购自北京擎科生物科技股份有限公司;TransStart Fast *Pfu* DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司, KOD One DNA 聚合酶购自东洋纺(上海)生物技术有限公司。

1.1.3 培养基

2 \times YT 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白

胨 16, NaCl 5。用于质粒转化的复苏操作。115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, NaCl 5。固体平板添加 15–20 g 琼脂粉。115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

蔗糖 LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, 蔗糖 100。固体平板添加 15–20 g 琼脂粉。115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

基础无机盐培养基(g/L): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.60, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 6, 柠檬酸 2。每升所需微量元素: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.525 mg, Na_2SO_4 20 mg, ZnSO_4 6.4 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 mg。微量元素配制成 1 000 倍浓度的母液, 使用时加入培养基中后 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。在灭菌后加入同样灭菌的葡萄糖至葡萄糖浓度 20 g/L, 用于摇瓶培养初始给糖。

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Names	Relevant characteristics	Sources
Plasmid		
pET30a(+)	KanR	Lab collection
pKD46	λ -red recombinant genes under ParaBAD promoter, temperature sensitive origin	Lab collection
pET30a- <i>ugt74fl</i>	pET30a derivative with $\text{P}_{\text{M1-93-ugt74fl}}$ gene form <i>Arabidopsis thaliana</i>	This study
pET30a- <i>ugt74fl</i> -SL	pET30a derivative with $\text{P}_{\text{M1-93-ugt74fl}}$ gene form <i>Salix suchowensis</i>	This study
Strains		
Tyr002	<i>E. coli</i> DSM 1576 $\text{P}_{\text{M1-12-aroE}^*}$, $\text{P}_{\text{M1-37-aroFFBR}}$, ΔTyrR , $\text{P}_{\text{M1-12-galP}}$, $\text{P}_{\text{M1-93-glk}}$, ΔptsI , $\text{P}_{\text{M1-12-pykA}^*}$, $\text{P}_{\text{M1-12-pykF}^*}$, $\text{P}_{\text{M1-12-pgi}^*}$	Lab collection
SA01	<i>E. coli</i> Tyr002, $\Delta\text{pflB}::\text{P}_{\text{M1-93-pchB}}$	This study
SA02	<i>E. coli</i> SA01, PM1-93-entC	This study
SA03	<i>E. coli</i> SA02, ΔentB	This study
SA04	<i>E. coli</i> SA02, ΔtrpED	This study
SA05	<i>E. coli</i> SA02, ΔpheA	This study
SA06	<i>E. coli</i> SA02, ΔtyrA	This study
SA07	<i>E. coli</i> SA05, <i>tyrA</i> *G	This study
SAG01	<i>E. coli</i> SA07 with pET30a- <i>ugt74fl</i>	This study
SAG02	<i>E. coli</i> SA07 with pET30a- <i>ugt74fl</i> -SL	This study

$\text{P}_{\text{M1-93}}$ 以及 $\text{P}_{\text{M1-37}}$ 为实验室保藏强启动子, $\text{P}_{\text{M1-12}}$ 则是实验室保藏弱启动子^[9-10]; *表示该基因第一个核苷酸序列改为 G $\text{P}_{\text{M1-93}}$ is a strong promoter collected in the laboratory and $\text{P}_{\text{M1-12}}$ is a weak promoter collected in the laboratory^[9-10]; * means the first nucleotide of the gene was replaced with G.

1.2 方法

1.2.1 基因组编辑方法

以 *E. coli* Tyr002 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^[11]。

首先以 *cat-sacB* 片段为模板^[11], *pflB-cat-sacB-F* 和 *pflB-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 *pflB*。以大肠杆菌 DSM1576 基因组为模板, *pflB500U-F* 和 *pflB500U-93-R* 为引物扩增片段 A; 以铜绿假单胞菌来源的 *pchB* 基因为模板, *P93-F* 和 *pchB-R* 为引物扩增片段 B-I, *pflB500D-F* 和 *pflB500D-R* 为引物扩增片段 C; 以片段 A、B-I 和 C 为模板, *pflB500U-F* 和 *pflB500D-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 P_{M1-93} 调控的基因 *pchB*, 用于替换第一步整合的 *cat-sacB* 片段, 得到菌株 SA01。以类似的操作过程在 *entC* 序列前插入杂合元件片段 P_{M1-93} , 得到菌株 SA02。

以 *E. coli* SA02 为出发菌株,敲除基因组上 *entB*。以 *cat-sacB* 片段为模板, *entB-cat-sacB-F* 和 *entB-cat-sacB-R* 为引物扩增第一步同源重组片段。以大肠杆菌 DSM1576 基因组为模板, *entB500U-F* 和 *entB500U-93-R* 为引物扩增片段 A1, *entB500D-F-over* 和 *entB500D-R* 为引物扩增片段 B1; 以片段 A1、B1 为模板, *entB500U-F* 和 *entB500D-R* 为引物扩增得到第二步同源重组片段 C1。将 C1 片段进行第二步同源重组, 得到菌株 SA03。

以 *E. coli* SA03 为出发菌株,敲除基因组 *trpE*。以 *cat-trpE* 片段为模板, *trpE-cat-sacB-F* 和 *trpE-cat-sacB-R* 为引物扩增第一步同源重组片段。以大肠杆菌 DSM1576 基因组为模板, *trpE500U-F* 和 *trpE500U-93-R* 为引物扩增片段

A2, *trpE500D-F-over* 和 *trpE500D-R* 为引物扩增片段 B2; 以片段 A1、B1 为模板, *trpE500U-F* 和 *trpE500D-R* 为引物扩增得到第二步同源重组片段 C2。将 C2 片段进行第二步同源重组, 得到菌株 SA04。以相同的方法分别敲除基因 *pheA* 和 *tyrA* 来获得菌株 SA05 和 SA06。 *tyrA* 的调控是同样的方法,最后替换 *cat-sacB* 片段时使用 *GTG-tyrA-F* 和 *tyrA500U-R*, 以大肠杆菌 DSM1576 为模板进行扩增得到的片段进行第二步替换, 得到菌株 SA07。

本研究所用引物见表 2。

1.2.2 质粒构建

ugt74f1 (包括拟南芥来源以及簸箕柳来源) 基因序列以大肠杆菌为宿主进行密码子优化, 交由北京擎科生物科技股份有限公司进行质粒合成, 使用强启动子 P_{M1-93} 作为 *ugt74f1* 的启动子, 连接至 pET30a 载体。

1.2.3 发酵及控制

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。接种于 Trp 培养基中, 37 °C、250 r/min 培养 24–72 h, 带有质粒的菌株按照抗性加入抗生素。

5 L 发酵罐发酵: 挑取单菌落到含 3 mL LB 培养基的试管中, 37 °C、250 r/min 培养 12–14 h, 转接至 200 mL LB 培养基中培养 18 h 至 OD_{600} 为 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。在全自动 5.0 L 发酵系统 BIOTECH-5BG 中进行分批补料发酵。培养基 pH 值通过自动添加氨水(25%, 质量分数)控制在 6.8, 温度控制在 37 °C。以 1 vvm 通入空气, 搅拌速度为 300–950 r/min, 以保持溶解氧(dissolved oxygen, DO)水平在 30%。初始加入 25 g/L 葡萄糖。当初始葡萄糖耗尽后, 进行补料, 保持发酵液残糖含量控制在 0–10 g/L, 以保持菌株生长到所需的细胞密

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pflB-cat-sacB-F	GATGCCCTGACGGGTGAAGTGTTCGACAGGGGTAACATAGTCGAAGTACGCAGTAAATAAA AAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTT
pflB-cat-sacB-R	CTGTGGGCTATCGGATTACCAAAAACAGCATAGGTTTCCAGTGGAGCCTTTATTGTACGCTTT TTACTGTACGATTCAGTCAAATCTAA
pflB500U-F	GTATATGACCGCAAATGGTCAAT
pflB500U-93-R	GTAACACCTACCTTCTTAAGTGGTTGTCAACACCGCCAGAGATAA
P93-F	TTATCTCTGGCGGTGTTGACAA
pchB-F	TTATGCTGCACCACGGGTCTGAC
pflB500D-F	TTAGATTTGACTGAAATCGTACAGTAAA
pflB500D-R	GTAACGACGAACAAAACCGTTGGTGTC
GTG-tyrA-F	GTGGCTTAAGAGGTTTATTGTGTTGCTGAATTGACCGCATTACGCGATCAAA
tyrA-R	ATCATCCGGCACTGGATTACTGCGGTTGTCATTTCGCCTG
tyrA-cat-sacB-F	GATGCCCTGACGGGTGAAGTGTTCGACAGGGGTAACATAAAATTCATCAGGATCTGAACGG GCAGCTGACGGCTCGCGTGGCTTA
tyrA-cat-sacB-R	CTGTGGGCTATCGGATTACCAAAAACAGCATAGGTTTCCATGATGAAAAGGTGCCGGATGAT GTGAATCATCCGGCACTGGATTA
tyrA500D-F	TAATCCAGTGCCGGATGATTCA
tryA500D-R	CACTGGAAGATTGAATATAACGAAA
tyrA500U-F-over	CGGTTGGTTTTAAAAACGGCACCG
trpE-cat-sacB-F	CAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGAACAAAATTAGTGACGGAAGATCACTTC
trpE-cat-sacB-R	TCGCAGGTTAGCAGTTCGAGAGTCGGTTTTTGTGTTTGCAATCAAAGGGAAAACACTGTC
trpE500U-F	CAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGAACAAAATTACTGATAGCTAGCTCAGTC
trpE500U-R	CGCAGGTTAGCAGTTCGAGAGTCGGTTTTTGTGTTTGCAACTAGTAACTCATGTCTTTG
trpE-500D-F-over	TGTTATTCTCTAATTTTTGTTCAAAAA TCACCTAAAGCTGTAATGCG
trpE-500D-R	ATTTCCACGCCGGAATAAG
pheA-cat-sacB-F	AATCGGGGGCCTTTTTTATTGATAACAAAAGGCAACACTGTGACGGAAGATCACTTC
pheA-cat-sacB-R	ATCCAGTGCCGGATGATTCACATCATCCGGCACCTTTTCAATCAAAGGGAAAACACTGTC
pheA-500U-F	TGATGGACGTAAGCCGGAAG
pheA-500U-R	GATAACAAAAGGCAACACTTGAAAAGGTGCCGGATG
pheA-500D-F-over	CAGCCTGAAGGAGAGAACACGTGGATTTACGCGGTAATAATGT
pheA-500D-R	TTCCAGCCCGACGCTCAACGCCA
entB-cat-sacB-F	TTATTTACCTCGCGGGAGAGTAGCTTCCACCAGGCGTCGATGGTACGGAAGATCACTTC
entB-cat-sacB-R	AGTGGCTGGCGTCACGCGCATCAGCCTGAAGGAGAGAACACGGGAAAACACTGTC
entB-500U-F	CGTGTCTCTCCTTCAGGCTGATGCGCGTGAC
entB-500U-R	GAAATCCACTGCCGCAAGGGGAA
entB-500D-F-over	GGAGAGAACACGTGGATTTACGCGGT
entC-cat-sacB-F	ATAAAGAAAAAGCGATTGGGCGCAAGTGTGCCATGGTCTGCTGTACTTCCTCAGCCAGTGA CGTATCCATGAAGATCACTTC
entC-cat-sacB-R	AATGATAATCATTATTAAGCCTTTATCATTTTTGTGGAGGATGATCACGGGAAAACACTGTC
entC93-500U-F	TTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCGTATTGTTAGCA TGTACGTTTAAACCAGGAAACAGCTATGGATAC
entC93-500U-R	CAACCGTGACAACACCACTTTGTCGAC
entC93-500D-F	CGTTGTTATCTCTTGTCAACACCGCCAGAGATAAATCATCCTCCACAAAATGATAAAGGCTTT AATAATGATTA
entC93-500U-F	GGCTTCCAGTGTATGTGTGCCA

度。发酵过程中每间隔 12 h 取样一次, 利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测发酵液中水杨酸和水杨酸葡萄糖苷的含量, 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 μm 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)配备 Innoval C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)和 DAD 紫外检测器。检测条件: 流动相 100%甲醇:1%磷酸溶液=50:50, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 上样量 10 μL , 检测波长为 210 nm 和 280 nm。水杨酸出峰时间在 11.8 min, 水杨酸葡萄糖苷出峰时间在 4.1 min。

2 结果与分析

2.1 水杨酸生产菌株的构建

水杨酸葡萄糖苷, 是由水杨酸糖基转移酶以一分子尿苷二磷酸(uridine diphosphate, UDP)葡萄糖以及一分子水杨酸为底物, 将葡萄糖转移至水杨酸的羟基处, 对其进行修饰, 生成一分子水杨酸葡萄糖苷和一分子的 UDP。构建水杨酸葡萄糖苷生产菌株, 首先需要构建水杨酸生产菌株。

大肠杆菌本底具有异分支酸变位酶 EntC, 不具备异分支酸裂解酶。选择使用 Red 同源重组法将铜绿假单胞菌基因 *pchB* 整合在 Tyr002 基因组上 *plfB* 位置, 构建了菌株 SA01。对菌株进行摇瓶发酵。发酵 24 h 后, 在发酵液中检测到了 0.11 g/L 水杨酸(图 2), 获得了合成水杨酸菌株。

在 SA01 中使用强启动子 P_{M1-93} 增强水杨酸合酶基因 *entC* 的表达, 得到 SA02, 摇瓶产量达到 0.21 g/L (图 2)。*entC* 过表达后, 水杨酸产量增加的同时, 也检测到 2,3-二羟基苯甲酸有

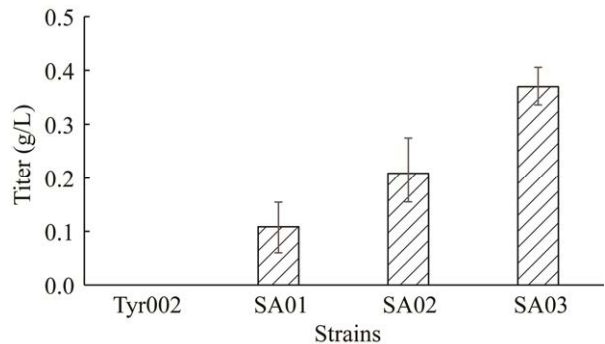


图 2 水杨酸生产菌株摇瓶发酵

Figure 2 Shake flask fermentation of salicylic acid producing strains.

较多积累, 是大肠杆菌本底 *entC* 基因下游 *entB* 编码的异分支酸裂解酶作用于异分支酸产生的。在 SA02 中敲除 *entB* 基因获得菌株 SA03, 发酵液中不再检测到 2,3-二羟基苯甲酸, 同时水杨酸产量达到 0.37 g/L。

2.2 水杨酸生产菌株的代谢优化与发酵评价

水杨酸合成的前体分支酸, 同时也是大肠杆菌中芳香族氨基酸合成的前体物质, 这些氨基酸的合成对水杨酸合成途径造成了较大的碳通量分流, 这些芳香族氨基酸分别是 L-色氨酸、L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸。*trpED*、*pheA* 和 *tyrA* 是其生产途径起始关键基因。将 SA03 菌株分别敲除 *trpED*、*pheA* 和 *tyrA*, 获得菌株 SA04、SA05 和 SA06。为确认这几个基因敲除对水杨酸生产的影响, 进行摇瓶发酵测试, 结果见图 3。*trpED* 和 *pheA* 的敲除对水杨酸产量和细胞生长影响较小。*tyrA* 的敲除菌中水杨酸产量增加约 400%, 达到了 1.05 g/L, 但敲除 *tyrA* 后菌株在基础培养基中生长受到限制, 需要添加酪氨酸才能生长。因此本研究使用 GTG 作为起始密码子弱化 *tyrA* 的表达来降低酪氨酸途径的代谢通量, 得到菌株 SA07。菌株 SA07 可以在基础培养基中生长, 但产量相比 SA06 有所降低, 为 0.71 g/L (图 3)。虽然 SA07 的产量有所

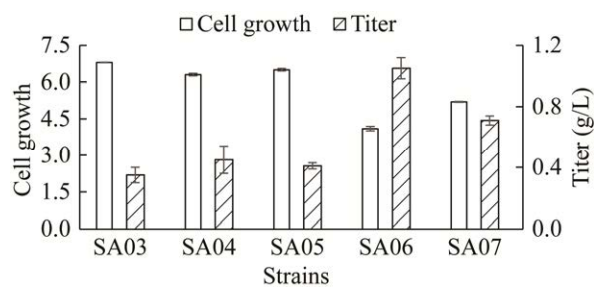


图3 芳香族氨基酸合成途径关键基因敲除或调控对菌株产水杨酸的影响

Figure 3 Effect of knockout of regulation of key genes in aromatic amino acid biosynthesis pathway on the production of salicylic acid.

降低,但在基础培养基上生长不受限制,后续的水杨酸葡萄糖苷生产菌株在 SA07 基础上进行构建。

对菌株 SA07 摇瓶发酵测试过程中,发现 24、48 h 以及 72 h,水杨酸产量与菌株生长变化较小,几乎处于停滞的状态,同时 72 h 时发酵液中仍残余葡萄糖约 4.5 g/L,相比出发菌株 Tyr002,SA07 的耗糖速度也有一定幅度的下降(数据未列出)。推测造成这一现象的原因是水杨酸的抑菌性。这在其他研究中也有类似结果。例如,袁其朋^[12]团队利用动态调控策略,前期弱化水杨酸合成途径酶表达促进生长,后期加强酶表达专注产物生产,成功将菌株的生产水平提升了数十倍。Qian 等^[13-14]也在其关于水杨酸生产菌株构建的报道中提出,初始加入水杨酸会对菌株生长造成影响,尤其是在加入接近最高产量的水杨酸后,菌株基本无法生长,因此在水杨酸生产水平提升到一定程度以后,降低产物对菌体的抑制是进一步提升产量的关键。

2.3 水杨酸葡萄糖苷生产菌株的构建

植物会对水杨酸做不同的修饰,以便于存储和运输,减小水杨酸对于植物本体的压力。修饰的形式包括糖基化、氨基酸修饰、甲基化和内酯化等^[3]。因此,在产水杨酸生产菌株中

引入糖基化酶修饰水杨酸既可以降低水杨酸对细胞生长的抑制,也可以获得水杨酸葡萄糖苷。相关的糖基转移酶有 F1 与 F2 两类^[15],同样都以二磷酸尿苷葡萄糖和水杨酸作为底物,生产水杨酸的糖苷化产物。其中 F2 类的产物不唯一,产物为修饰位点在羟基的水杨酸葡萄糖苷以及修饰位点在羧基的水杨酸葡萄糖酯,F1 仅对羟基进行修饰,产物为水杨酸葡萄糖苷。

根据文献报道^[2],与水杨酸本身对比,水杨酸葡萄糖苷对植物刺激更小,没有调节作用,同时水溶性增加,利于在不同组织间的运输。尝试外源引入 F1 类酶,对于水杨酸进行修饰以进行水杨酸葡萄糖苷的生产。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的糖基转移酶 UGT74F1 (AT2G43840)属于 F1 类酶^[16],在 Ahmadi 等^[7]的研究中,通过外源引入该酶,可以将 1 g/L 左右的水杨酸完全转化为水杨酸葡萄糖苷。柳树提取物是水杨酸葡萄糖苷重要来源,因此在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索柳科来源的糖基转移酶,进行 BLAST 后,找到柳科植物簸箕柳(*Salix suchowensis*)来源的糖基转移酶(GenBank 登录号:KAG5238619.1)。

将挑选的 2 个糖基转移酶根据大肠杆菌的密码子偏好性进行序列优化,在上游设计连接强启动子 P_{M1-93},交由基因合成公司进行合成并连接在 pET30a 质粒上。

将 2 个质粒 pET-ugt74f1 和 pET-ugt74f1-SL 分别转入 SA07,获得菌株 SAG01 和 SAG02,进行摇瓶发酵检测。发酵 24 h 后,表达拟南芥来源的水杨酸糖基转移酶的菌株在摇瓶发酵过程中可以把菌株 SA07 产生的水杨酸全部转化为水杨酸葡萄糖苷,而表达簸箕柳来源糖基转移酶菌株发酵液残存 0.37 g/L 左右的水杨酸无法转化,相当于菌株 SA07 生产的 40%左右的水杨酸(图 4)。于是选择拟南芥来源的水杨酸糖

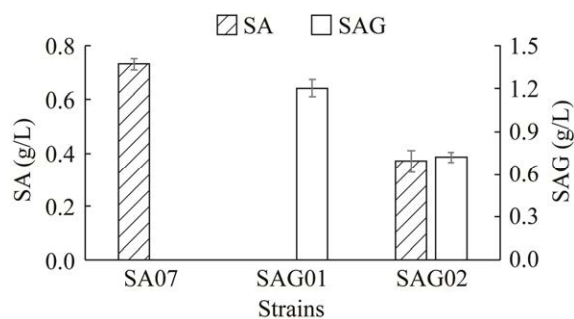


图4 不同来源的糖基转移酶引入菌株 SA07 后发酵液中水杨酸和水杨酸葡萄糖苷产量

Figure 4 Production of SA & SAG after introducing different glycosyltransferase into strain SA07.

基转移酶 UGT74F1, 进行水杨酸的糖基化修饰, 生产水杨酸葡萄糖苷。

2.4 水杨酸葡萄糖苷发酵评价

对菌株 SAG01 和菌株 SA07 进行摇瓶发酵测试, 结果见图 5A。与不携带质粒的菌株相对比, 含有质粒的菌株在发酵时间 24 h 时, 水杨酸葡萄糖苷产量达到 1.2 g/L, 折合水杨酸约 0.5 g/L, 水杨酸折合产量下降, 但水杨酸葡萄糖苷可以在 72 h 的发酵过程中持续积累, 最终

水杨酸葡萄糖苷的产量达到了 5.7 g/L, 折合水杨酸 2.5 g/L, 糖苷化产物的质量转化率约为 21%。最终产量的变化, 是水杨酸糖基化后抑菌性减小的结果, 降低了产物对于菌株的压力, 摇瓶发酵 24 h 时水杨酸折合产量略低, 可能是外源水杨酸糖基转移酶的引入对生产菌株代谢产生的影响。

随后, 对此菌株进行放大实验, 在 5 L 发酵罐进行分批补料发酵。结果见图 5B。在发酵 72 h 后, 最终得到了 36.5 g/L 的水杨酸葡萄糖苷, 折算为水杨酸 16.0 g/L。整个生产过程中, 残余的水杨酸不超过 0.1 g/L, 是目前报道的水杨酸和糖苷化产物的最高产量。

3 讨论

植物中, 水杨酸以多种形式存在, 包括水杨酸甲酯、磺基水杨酸以及本研究所关注的水杨酸葡萄糖苷。研究表明, 水杨酸葡萄糖苷作为水杨酸的非活性液泡储存形式水溶性更高, 便于运输。

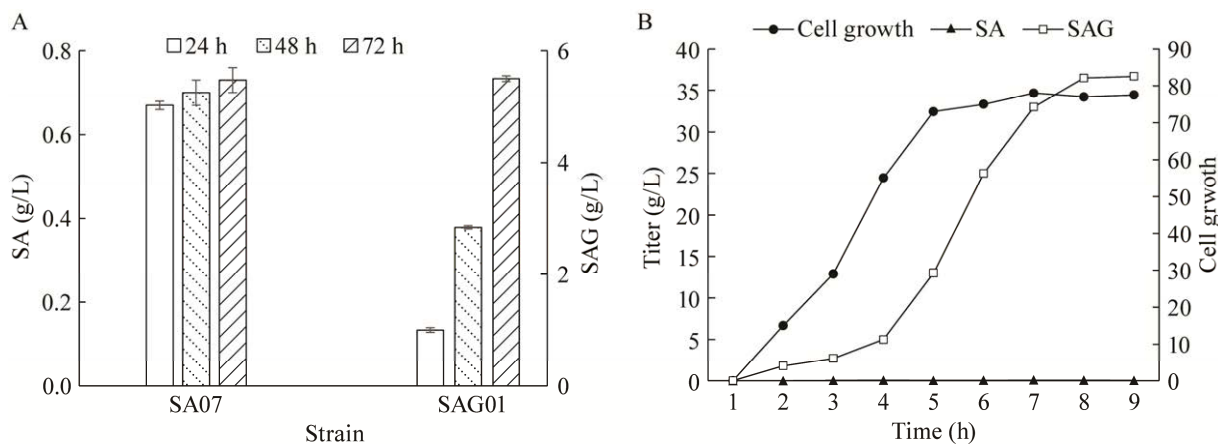


图5 水杨酸及水杨酸葡萄糖苷生产菌株发酵 A: SA07 和 SAG01 摇瓶发酵结果, SA07 产物为水杨酸, SAG01 产物为水杨酸葡萄糖苷. B: SAG01 分批补料发酵

Figure 5 Production of SAG by engineered strains. A: By strains SA07 and SAG01, whereas strain SA07 produced salicylic acid while SAG01 produced SAG. B: 5 L fed-batch fermentation for SAG production by strain SAG01.

在大肠杆菌中,以莽草酸途径为基础构建的水杨酸合成途径,存在着酪氨酸等副产物。直接进行敲除会使得菌株生长受到阻碍,也要求额外加入营养物质,对副产物途径进行适当的削弱,达成集中代谢通量的目的的同时,尽量降低对菌株生长的影响。水杨酸的抑菌性也是直接生产水杨酸要面临的问题^[17-18]。除 Noda 等^[6]外,水杨酸生产相关研究都止步于摇瓶水平,培养基基本都为丰富培养基(表 3)。合适的代谢调控思路以及解除或减轻产物的抑制,是开发生物合成生产菌株的重要策略。本研究采用了适当的调控方法,在保证产物途径能争取到更多碳通量的基础上,尽量减少因调控副产物途径造成的影响,并通过加强合成途径酶表达的方法进一步提升了产量。

不同来源的糖基转移酶效果不同,通过简单筛选选择了拟南芥来源的糖基转移酶,在目前的水杨酸生产水平下可以满足全部水杨酸到 SAG 的转化。在表达水杨酸糖苷转移酶后,菌株 SA07 的水杨酸折合产量与生长都有不同程度的提升。这个结果表明,相较于水杨酸本身,糖苷化后的产物抑菌性有显著下降,甚至是消失,主要体现在生产、生长以及耗糖速度 3 个方面。

质粒表达具有表达强度高的优点,但带有质粒的菌株在进行发酵罐发酵时,为保证质粒

的稳定性,往往会多次添加抗生素,提升了发酵成本。同时携带质粒生产菌株遗传的不稳定,是工业化生物合成需要解决的一个问题。在本研究中,总共 72 h 的 5 L 发酵罐发酵期间,液相检测结果水杨酸含量稳定不超过 0.1 g/L,表明糖基转移酶在整个发酵过程中都在有效的工作。这意味着可能在发酵初始加入抗生素后,整个发酵过程中质粒都稳定存在,一种可能是该酶的催化活性较强,也有可能是带有质粒的菌株会消除水杨酸的抑制,从而生长更占优势。

本研究以莽草酸途径加强后的酪氨酸菌株 Tyr002 为基础,通过 Red 同源重组替换基因组上的基因 *plfB*,引入异分支酸裂解酶,对副产物的生产途径进行了调节,同时加强了关键酶的表达,摇瓶水平发酵水杨酸产量达到 1.05 g/L。通过引入水杨酸糖基转移酶 UGT74F1 对水杨酸进行修饰,以降低水杨酸本身的抑菌性,进行水杨酸葡萄糖的生产。发酵测试中,水杨酸葡萄糖苷摇瓶发酵产量达到 5.7 g/L,在 5 L 发酵罐分批补料发酵中能达到 36.5 g/L 的产量,是目前报道的最高产量。对于发酵液进行高效液相色谱检测时发现,发酵液中仍然存在一定的 L-酪氨酸。在现有的条件下,如果水杨酸的抑制已经被解除,对于副产物途径进行进一步的调控,预计可以进一步提升菌株的产量。

表 3 不同研究生产水杨酸和水杨酸葡萄糖苷比较

Table 3 Comparison of SA & SAG production in various studies

Year	Culture conditions	Titer (g/L)	Media	Sources
2015	Tube & fed-batch	1.5 & 11.5	Basal medium+1 g/L yeast extract+thiamine/riboflavin	[6]
2016	Shake flask (co-culture)	2.5 (SAG)	Basal medium+glycerol and glucose	[7]
2018	Shake flask	1.8	Rich medium (5 g/L yeast extract+glycerol)	[13]
2021	Shake flask	3.1	Rich medium+pyruvic acid	[19]
2023	Shake flask	5.7 (SAG)	Basal medium	This study
2023	Fed-batch	36.5 (SAG)	Basal medium	This study

产水杨酸大肠杆菌细胞工厂的构建工作中,包括达到水杨酸摇瓶最高产量的 Noda 等,都选择了质粒进行合酶的表达,这有着表达强度高的优势,但也存在遗传不稳定的缺点^[6,13]。Ge 等^[12]和 Qian 等^[13]的研究都体现了水杨酸的抑制在实际生产中的影响,但没有开展进一步的研究,多数研究也止步于摇瓶水平的测试。在 2015 年, Noda 等发表的文章包含从试管发酵到 1 L 发酵罐分批补料发酵的放大发酵实验的相关数据,而在该团队于 2021 年发表的文章中,发表了 Noda 团队通过代谢工程手段进一步优化的水杨酸生产菌株相关基因改造和摇瓶产量信息,摇瓶产量进一步提升达到 3.1 g/L,但没有相关放大发酵的数据以及实验信息^[6,19]。本研究构建了能够稳定遗传的水杨酸生产菌株,并且没有简单地进行副产物途径的敲除,通过多种手段调节了副产物途径的表达强度,得到了能够在基础培养基上进行水杨酸生产的菌株。在此基础上通过引入外源的水杨酸葡萄糖转移酶,进行 SAG 的生产。与 Ahmadi 等^[7]的研究对比,本研究不使用共培养这一较复杂的培养策略,所构建的生产菌株遗传稳定,发酵操作简单,并对菌株进行了发酵罐规模的放大发酵。

本研究的出发平台菌株 WJ60 在 5 L 发酵罐分批补料发酵中 3-脱氢莽草酸产量达到 95 g/L,然而本研究中水杨酸葡萄糖苷 5 L 发酵罐分批补料发酵中目前只达到 36.5 g/L 的产量,这可能是由于在分支酸途径之后较多的细胞本身必需氨基酸等代谢物的合成分流了途径通量,同时从分支酸到水杨酸的两步酶都存在限速问题,影响了水杨酸的合成。通过增加水杨酸合成酶的拷贝数和对酶进行定向进化均提高了水杨酸的摇瓶产量,但是由于水杨酸对细胞抑制问题,在发酵罐放大实验中产量没有增加(这里

没有列出数据)。在生产水杨酸葡萄糖苷时,糖基供体 UDP-葡萄糖的合成又分流了碳流量,UDP-葡萄糖的供给和糖基化酶活性也是一个限速因素。筛选好的糖基化酶,进一步提高 UDP-葡萄糖供给,平衡碳流量,优化发酵工艺也能进一步提高水杨酸葡萄糖苷的产量。

REFERENCES

- [1] CHEN L, WANG WS, WANG T, MENG XF, CHEN TT, HUANG XX, LI YJ, HOU BK. Methyl salicylate glucosylation regulates plant defense signaling and systemic acquired resistance[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(4): 2167-2181.
- [2] BERIM A, GANG DR. Accumulation of salicylic acid and related metabolites in *Selaginella moellendorffii*[J]. *Plants*, 2022, 11(3): 461.
- [3] DEMPSEY DA, VLOT AC, WILDERMUTH MC, KLESSIG DF. Salicylic acid biosynthesis and metabolism[J]. *The Arabidopsis Book*, 2011, 9: e0156.
- [4] DING PT, DING YL. Stories of salicylic acid: a plant defense hormone[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(6): 549-565.
- [5] JIANG M, ZHANG HR. Engineering the shikimate pathway for biosynthesis of molecules with pharmaceutical activities in *E. coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 1-6.
- [6] NODA S, SHIRAI T, OYAMA S, KONDO A. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 33: 119-129.
- [7] AHMADI MK, FANG L, MOSCATELLO N, PFEIFER BA. *E. coli* metabolic engineering for gram scale production of a plant-based anti-inflammatory agent[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 382-388.
- [8] 马延和, 王钦宏, 陈五九, 江小龙, 彭彦峰. 生产 3-脱氢莽草酸大肠杆菌重组菌株及其构建方法与应用: CN201711002831.2[P]. 2021-02-02.
MA YH, WANG QH, CHEN WJ, JIANG XL, PENG YF. Recombinant strain for producing 3-dehydrogenated shikimic acid coli as well as construction method and application thereof: CN201711002831.2[P]. 2021-02-02 (in Chinese).
- [9] MUYRERS J P, ZHANG Y, STEWART AF. Techniques: recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA[J]. *Trends in Biochemical*

- Sciences, 2001, 26(5): 325-331.
- [10] LU J, TANG JL, LIU Y, ZHU XN, ZHANG TC, ZHANG XL. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2455-2462.
- [11] 宋富强, 陈五九, 吴凤礼, 王晓霜, 路福平, 王钦宏. 异源表达多巴脱羧酶促进大肠杆菌从头合成多巴胺[J]. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4266-4276.
SONG FQ, CHEN WJ, WU FL, WANG XS, LU FP, WANG QH. Heterogeneous expression of DOPA decarboxylase to improve the production of dopamine in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(12): 4266-4276 (in Chinese).
- [12] GE C, YU Z, SHENG HK, SHEN XL, SUN XX, ZHANG YF, YAN YJ, WANG J, YUAN QP. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control[J]. Nature Communications, 2022, 13: 2182.
- [13] QIAN S, LI Y, CIRINO PC. Biosensor-guided improvements in salicylate production by recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-9.
- [14] CHEN JX, STEEL H, WU YH, WANG Y, XU JB, RAMPLEY CPN, THOMPSON IP, PAPACHRISTODOULOU A, HUANG WE. Development of aspirin-inducible biosensors in *Escherichia coli* and SimCells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(6): e02959-18.
- [15] GEORGE THOMPSON AM, IANCU CV, NEET KE, DEAN JV, CHOE JY. Differences in salicylic acid glucose conjugations by UGT74F1 and UGT74F2 from *Arabidopsis thaliana*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46629.
- [16] QI RQ, PFEIFER BA, ZHANG GJ. Engineering heterologous production of salicylate glucoside and glycosylated variants[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2241.
- [17] KUNIN CM, HUA TH, BAKALETZ LO. Effect of salicylate on expression of flagella by *Escherichia coli* and *Proteus*, *Providencia*, and *Pseudomonas* spp.[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(5): 1796-1799.
- [18] CATTÒ C, GRAZIOSO G, Dell'ORTO S, GELAIN A, VILLA S, MARZANO V, VITALI A, VILLA F, CAPPITELLI F, FORLANI F. The response of *Escherichia coli* biofilm to salicylic acid[J]. Biofouling, 2017, 33(3): 235-251.
- [19] NODA S, MORI Y, FUJIWARA R, SHIRAI T, TANAKA T, KONDO A. Reprogramming *Escherichia coli* pyruvate-forming reaction towards chorismate derivatives production[J]. Metabolic Engineering, 2021, 67: 1-10.

(本文责编 郝丽芳)