

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(1):5-13; 4 January 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.002

改进莽草酸合成代谢的大肠杆菌工程化研究新进展

肖梦榕, 张梁, 石贵阳*

江南大学, 工业生物技术教育部重点实验室, 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:莽草酸是芳香族氨基酸合成中的重要中间产物, 具有广泛的药用价值, 是抗流感药物“达菲”的重要合成前体。微生物发酵生产莽草酸具有许多优点, 其中大肠杆菌常用于微生物大规模发酵生产应用。通过对大肠杆菌进行代谢工程改造, 是构建工业化莽草酸高产菌的主要技术手段。磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, PTS)是大肠杆菌细胞内参与葡萄糖从膜间质转运和磷酸化到胞内的主要活性转运系统, 影响莽草酸合成前体磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的利用率。通过对PTS系统的定向修饰和改造, 调节细胞内代谢流向, 提高碳源利用率, 增加莽草酸前体合成量, 结合对代谢途径中的特定修饰, 能够构建出较为理想的莽草酸高产菌。研究显示在10 L放大体系中最佳产率可达0.36 mol/mol, 莽草酸浓度可达84 g/L。本文针对代谢改造中莽草酸途径和葡萄糖转运系统的改造方面进行简单概述, 并综述了近年来有关此方面的最新研究进展。

关键词:大肠杆菌, 莽草酸, 芳香族氨基酸, PTS系统, 代谢工程, 发酵

中图分类号:Q935 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2014)01-0005-09

莽草酸(Shikimic acid, SA)是一种属于环己烷的羟基化不饱和酸衍生物, 是芳香族氨基酸生物合成途径中的关键中间体, 也是合成多种生物碱、芳香氨基酸与吲哚衍生物、手性药物的原料。研究发现莽草酸药用价值广泛, 能够抑制凝血系统, 防止血栓形成, 具有抗炎、镇痛作用, 可作为抗病毒和抗癌药物中间体^[1]。罗氏制药公司(Hoffmann-La Roche, Ltd)利用莽草酸作为关键起始材料合成神经氨酸酶抑制剂GS4104, 开发了治疗和预防禽流感的特效药磷酸奥司米(oseltamivir phosphate, 商品名“达菲” Tamiflu®)^[2]。当2005年世界禽流感大规模爆发时, 以及前不久的H7N9型禽流感期间, “达菲”对

这些高致病性流感病毒均显示了良好的治疗效果, 被作为特效药身价倍增。

目前生产莽草酸的主要方法包括传统植物提取法, 化学合成法, 发酵法和生物合成法^[3]。莽草酸广泛存在于多种植物中, 野生八角中莽草酸含量较高, 是很好的植物提取来源。通过从中国广西以及越南等国生长的植物八角的种子茴香中萃取提纯, 再经过十几步化学合成反应进一步转化可得到商品化“达菲”。然而从植物八角中提取莽草酸步骤繁琐, 原料来源不稳定, 常受产地气候等多种条件影响; 化学法和生物合成法成本高, 产率低, 一旦禽流感爆发极易引发莽草酸原料短缺, 供给不足而导致

基金项目:国家“863计划”(2012AA021201); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-11-0665); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PADP); 江苏省2012年度普通高校研究生科研创新计划项目(CXLX12_0733); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUDCF12016)

* 通信作者。E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

作者简介:肖梦榕(1989-), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生, 研究方向为代谢工程改造。E-mail: xiaomr@163.com

收稿日期:2013-05-02; **修回日期:**2013-06-27

“达菲”供不应求。目前,基于成本考虑,“达菲”的生产依然主要依赖于公斤级规模的植物提取工艺,莽草酸的市场售价在 1000 - 1600 元/千克左右,高纯度莽草酸价格高达 50 美元/克^[2]。因此,开辟大规模生产莽草酸的新方法至关重要。

近年来随着生物技术的进步,发酵法生产莽草酸技术逐渐发展。莽草酸生物合成途径广泛存在于多种微生物中,工业上常用大肠杆菌作为工程菌株发酵生产莽草酸。最初主要是通过诱变和随机筛选技术等筛选高产菌株直接用于发酵,随着代谢工程和基因操作技术的发展,通过基因工程技术定向改造代谢途径获得更为理想的工程菌株成为可能。

大肠杆菌中合成莽草酸的重要前体为磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和 4-磷酸赤藓糖(E4P),而在大肠杆菌中存在磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system, PTS 系统),参与细胞发酵过程中葡萄糖吸收、运输和磷酸化的过程,消耗大量 PEP,并导致乙酸生成,TCA 循环与糖酵解循环之间碳流分配不均衡,副产物增多,主产物产率降低,菌体二次生长,碳

源利用效率低等不良后果。

通过对大肠杆菌中 PTS 系统的代谢工程改造,减少 PEP 的损失,辅以对莽草酸途径的特定修饰,提高菌株碳源利用率和莽草酸产量是目前发酵生产莽草酸的研究热点。同时,莽草酸作为芳香族氨基酸合成的必需前体,改造其代谢途径,拓宽代谢流对大量合成苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及其他相关代谢产物也具有重大意义。

1 莽草酸合成背景概述

1.1 大肠杆菌中莽草酸合成途径

微生物发酵生产莽草酸主要依赖于对目的菌株中莽草酸代谢途径的改造。现在已有报道的用于改造的莽草酸基因工程菌主要有:大肠杆菌(*E. coli*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*),弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[4]。大肠杆菌遗传背景清楚、载体受体系统完备、生长迅速、发酵工艺简单、成本低、不受产地气候和提取工艺等限制条件的影响,利于大规模生产。大肠杆菌中莽草酸代谢途径如图 1 所示。

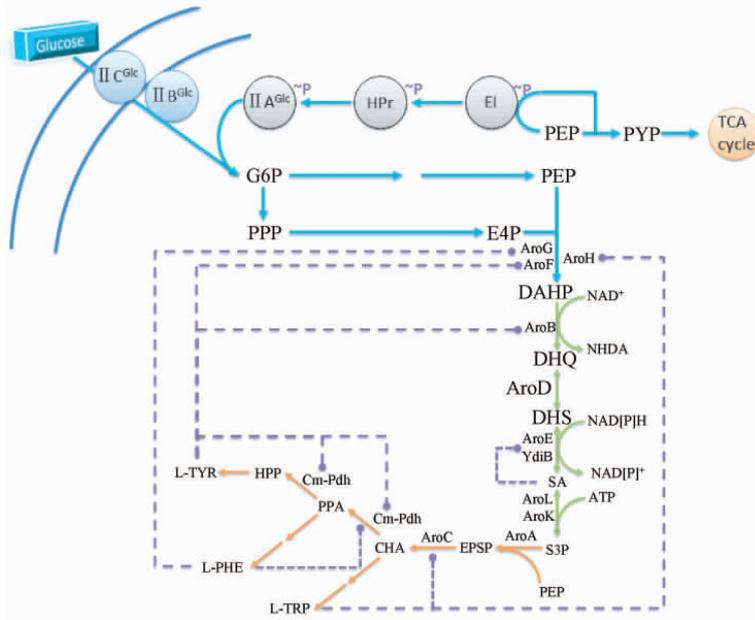


图 1. 大肠杆菌 PTS 转运系统、莽草酸代谢途径^[5-11]

Figure 1. PTS system and shikimic acid pathway in *E. coli*. Solid line, reaction direction; Dash line, feedback inhibition; ~P, phosphorylated forms; II A and II B: sugar-specific enzymes; II C: integral membrane protein permease; HPr: phosphohistidine carrier protein; EI: soluble and non sugar-specific protein components Enzyme I; PEP: phospho-enolpyruvate; PYR: pyruvate; TCA cycle: tricarboxylic acid cycle; G6P: Glucose 6-phosphat; PPP: pentose-phosphate pathway; E4P: erythrose-4-phosphate; DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate; DHQ: 3-dehydroquininate; DHS: 3-dehydroshikimate; SA: shikimic acid; S3P: shikimate-3-phosphate; EPSP: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; CHA: chorismate; PPA: prephenate; HPP: 4-hydroxyphenylpyruvate; L-TYR: L-tyrosine; L-PHE: L-phenylalanine; L-TRP: L-tryptophan; AroG, AroF, AroH: DAHP synthase; AroB: DHQ synthase; AroD: DHQ dehydratase; AroE: SA dehydrogenase; YdiB: SA dehydrogenase; AroK/AroL: SA kinase I/II; AroA: EPSP synthase; AroC: CHA synthase; Cm-Pdh: chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli*.

代谢途径分析^[5-6]表明在大肠杆菌中,莽草酸途径起始于 PEP 和 E4P,由 DAHP 合酶催化缩合反应形成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸 (DAHP)。在大肠杆菌中存在有 3 种 DAHP 合酶同功酶 AroH、AroG、AroF,分别对应受到不同的氨基酸(色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸)的反馈抑制^[7]。

DAHP 进入途径之后在 3-脱氢奎宁酸合酶 (AroB) 作用下转化为 3-脱氢奎宁酸 (DHQ),随后被 DHQ 脱氢酶 (AroD) 催化,脱水反应形成 3-脱氢莽草酸 (DHS),DHS 又在由莽草酸脱氢酶 AroE (同功酶 YdiB)^[8] 作用下消耗还原型辅酶 II (NADPH) 转化为莽草酸。在莽草酸途径中,主要的限速酶为 3-脱氢奎宁酸合酶 (AroB) 和莽草酸激酶 (AroL 和 AroK)^[9]。

在此途径中,各中间产物受到的反馈抑制如图 1 中虚线所示。主要涉及的反馈抑制有 AroB 受到产物酪氨酸的反馈抑制,AroE 受到莽草酸的反馈抑制等^[10-11]。此外,途径中还存在着反馈阻遏的调节。TyrR 蛋白通过识别 TyrR 盒 (TyrR boxes) 回文序列调节基因表达^[12-13],当酪氨酸存在时(需要 ATP 参与),TyrR 抑制 *tyrB*、*aroP*、*aroL-aroM* 和 *tyrP* 基因以及 *aroF-tyrA* 启动子的转录;当苯丙氨酸存在时,TyrR 抑制 *aroP* 和 *tyrB* 基因的转录,同时增强对 *aroG* 基因转录的抑制;在缺乏酪氨酸和苯丙氨酸的情况下,TyrR 仍可抑制 *aroG* 和 *tyrR* 基因的转录^[12-13]。

1.2 大肠杆菌葡萄糖转运系统——PTS 系统

大肠杆菌含有两层环状生物膜,内外膜之间的部分为膜间质。大肠杆菌外层膜上约有 10^5 个孔蛋白,控制胞内和胞外的分子流量,其中外膜孔蛋白 OmpC 和 OmpF 以及在一定条件下被诱导合成的 LamB 控制着葡萄糖进入胞质的主要通道^[14]。70% 的葡萄糖通过协助扩散方式经孔蛋白转运至膜间质^[15]。

葡萄糖经过孔蛋白扩散透过外膜是一个被动的过程,进入膜间质后通过葡萄糖活性转运系统继续转运至胞内。PTS 系统是大肠杆菌细胞内参与葡萄糖从膜间质转运和磷酸化到胞内的主要活性转运系统^[16]。PTS 系统由可溶性非底物特异性蛋白 E I、磷酸组氨酸搬运蛋白 HPr (*ptsH-crr* 操纵子) 和酶 II (E II s) 构成(图 1)^[14-15]。E I 可将来自 PEP 的磷酸基团依次传递给 HPr、E II s 和葡萄糖,从而完成

葡萄糖磷酸化转运。E II s 是一系列蛋白,可以特异性识别和转运底物分子,大肠杆菌染色体中编码约有 20 种 E II s,参与 20 多种不同碳水化合物的磷酸化转运,其中 E II^{Glc} 和 E II^{Man} 主要参与葡萄糖的转运。E II^{Glc} 主要由可溶性酶 E II A^{Glc} (*crr* 编码),以及膜透性酶 E II CB^{Glc} (*ptsG* 编码) 构成,动力学参数见表 1^[17]。

表 1. 各转运蛋白相关动力学参数^[17]

Table 1. Kinetic parameters of the transporter proteins transporter ^[17]			
transporter	$K_m /$ ($\mu\text{mol/L}$)	$V_{max} /$ [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$]	energy
E II ^{Glc}	3 - 10	126	1 PEP
E II ^{Man}	15	72	1 PEP
GalP	10.2	15.6	1 H ⁺ + 1 ATP
MglABC	-	-	2 ATP
Glk	4.1×10^3	75	1 ATP

- not given.

1.3 改造大肠杆菌 PTS 系统优势及对莽草酸合成的影响

改造大肠杆菌 PTS 系统具有多种优势,且对莽草酸的合成有着重要的影响。

(1) 合理改造 PTS 系统有利于增加芳香族化合物合成前体 PEP,增加糖酵解途径和 TCA 循环的碳流量。磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 是连接 PTS 系统和 EMP 途径的关键中间产物。PEP 还参与众多代谢反应,是合成莽草酸的重要前体。含葡萄糖的培养基培养下,PTS 系统消耗近 50% 的 PEP^[14]。而非 PTS 系统的 GalP、Glk 协同作用途径以 ATP 为磷酸基团供体,不消耗 PEP。通过化学计量学分析,在葡萄糖转运磷酸化中若不消耗 PEP,莽草酸的产量将会提高一倍^[17]。

当大肠杆菌生长于含葡萄糖或者其他 PTS 糖类的培养基时,EMP 和 PPP 途径(磷酸戊糖途径)中 PEP 的浪费较大。研究显示^[18]:在 PTS⁺ 和 PTS⁻ Glc⁺ 中进入 EMP 和 PPP 途径的碳流分别是 76.6%、22.3% 和 93.1%、5.3%。比较结果表明 PTS⁻ galP⁺ glk⁺ 能够控制增加糖酵解途径中的碳流量,提高碳源利用率,有效降低发酵副产品的生成。

(2) 降低过流代谢,减少乙酸生成。乙酸盐是影响莽草酸途径合成效率的重要因素,乙酸形成的主要途径是由 PTS 系统中 *ptsG* 基因介导葡萄糖高效转运,糖酵解循环中丙酮酸和乙酰辅酶 A 大量形

成,乙酰辅酶 A 在磷酸转乙酰激酶 (*pta*) 和乙酸激酶 (*ack*) 作用下转化为乙酸。PTS 系统中 *ptsG* 基因或 *ptsH-I-crr* 操纵子基因的敲除能够减少乙酸的生成,使糖酵解循环与三羧酸循环相平衡^[19]。

(3) 消除碳代谢阻遏效应,使之能同时消耗多种碳源的混合物。碳代谢阻遏效应 (carbon catabolic repression, CCR) 是大肠杆菌所具有的能够从碳源混合物中选择一种提供最高生长率的碳源的能力,是其他糖类转运能力,酶活性和基因表达均受到一种快速代谢碳源抑制的结果^[17-18]。PTS 系统中的 E II A^{Glc} 具有 CCR 的活性中心,影响了细胞对除葡萄糖以外的其他碳源的同时吸收。改造 PTS 系统能够减弱或消除 CCR 效应,消除二次生长,充分利用多种碳源,缩短反应时间,提高莽草酸产量。

2 莽草酸合成途径的工程化修饰和改造

与通过传统诱变方法筛选高产工程菌不同,代谢工程可以有目的地改变代谢流向和代谢流量,从而达到高产的效果。通过对大肠杆菌中莽草酸合成相关途径的代谢流分析,主要有以下两种主要工程化修饰改造策略^[7]。

2.1 莽草酸激酶缺失菌株

在大肠杆菌中删除或失活编码莽草酸激酶基因 *aroL*、*aroK*, 阻断莽草酸向下游代谢产物 3-磷酸莽草酸 (S3P) 的转化,敲除后续芳香族氨基酸合成途径,是最为简单常见的一种构建高产莽草酸基因工程菌的方式,见图 1。此方法无需后续进一步化学反应,被广泛采用。

Draths 等^[20] 在敲除大肠杆菌中莽草酸激酶的基础上,过表达抗反馈抑制 DAHP 合酶 AroF^{dnr} 增加中心代谢的碳通量,表达 AroE 解除反馈抑制,结合 AroB 克服限速步骤,避免莽草酸激酶被破坏后对菌体生长的影响。发酵结果表明重组菌莽草酸浓度可达 27.2 g/L。但此方法存在缺陷,重组菌产生大量副产物 DHS (4.4 g/L) 和奎宁酸 (12.6 g/L),在总产物中占很大比例,给分离纯化发酵液中的主产物莽草酸带来极大负面影响。

2.2 EPSP 合酶缺失菌株

根据反应动力学原理,在副产物 DHS 和主产物莽草酸之间存在反应平衡,在删除了 5-烯醇式丙酮

酰莽草酸-3-磷酸 (EPSP) 合酶编码基因 *aroA* 后,积累 S3P 有助于推动反应平衡向生成莽草酸的方向进行,通过加热或者酸化的方法进一步使 S3P 转化为莽草酸^[21]。此方法已被成功应用于枯草芽孢杆菌^[21] 和大肠杆菌^[7] 中。

Iomantas 等^[21] 在枯草芽孢杆菌中成功构建了 AroA 缺失菌,并表达来源于淀粉液化芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 的莽草酸脱氢酶克服可能发生的反馈抑制,重组菌莽草酸产量提高到 2.8 g/L,同时副产物 DHS 产量显著降低 (1.1 g/L)。

Krämer 等^[7] 则将上述理论与 Draths 等^[20] 的经验同时成功地应用到了大肠杆菌中,在敲除 AroA 的基础上加强表达 AroF^{dnr}, AroB 和莽草酸激酶 II AroL。重组菌经过 48 h 发酵后莽草酸和 S3P 的总浓度可达到 20 g/L,同时副产物 DHS 与总体产物浓度的比率降低 40%。可以预期,在此基础上进一步改造莽草酸的转运系统,以得到更高的莽草酸产量。

此外,改变中心代谢流途径,加速限速反应,失活莽草酸转运基因 *shiA*^[22], 构建底物通道^[23], 提高 PEP 供量 (即改造大肠杆菌内的葡萄糖转运系统的代谢流向) 等也可达到提高产量的目的。

3 PTS 系统的工程化修饰和改造

尽管根据理论研究显示,PTS 改造后工程菌优势十分显著,但据报道改造后菌株生长情况大部分均弱于野生型。而已经报道过可在大肠杆菌胞内进行葡萄糖磷酸化转运的蛋白很多,见表 1。若能减少 PTS 系统对 PEP 损失,同时达到与其相类似的转运效率和生长状况,对工业化生产具有极高价值和意义。目前 PTS 工程菌中常加强表达其自身 GalP 蛋白表达实现葡萄糖转运功能。

3.2 GalP 转运系统

在大肠杆菌中,葡萄糖也可通过半乳糖透性酶 (GalP)^[24-25] 介导的活性转运系统磷酸化转运至胞内。Martínez^[24] 等研究表明 GalP 转运系统能够解除 CCR 效应,提高工程菌对不同碳源的利用率。但是只有在胞外葡萄糖浓度很低 (< 1 μmol/L) 的时候,相关基因才会在乳糖存在的条件下被诱导。此系统中主要参与的是一种 H⁺ 协同载体蛋白 GalP (*galP* 编码),动力学参数见表 1。当胞外葡萄糖浓度较低时,GalP 与外膜上 LamB 一起构成葡萄糖高

效转运途径。通过 GalP 蛋转运葡萄糖的同时还需要对胞内葡萄糖进行磷酸化的物质,才能构成完整的葡萄糖磷酸化转运系统,此时葡萄糖激酶蛋白 Glk (*glk* 编码) 的活性也会对菌体生长造成很大影响。Lu 等^[25] 针对 GalP 和 Glk 转运系统的启动子选择进行了研究,通过结合不同强弱启动子,表明葡萄糖的利用率与 GalP 的表达密切相关,当 GalP 表达升高时葡萄糖利用率显著升高。

3.3 Glf 转运系统

通过在 PTS⁻ 菌株中表达运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中葡萄糖易化体蛋白 Glf (*glf* 编码) 和葡萄糖激酶蛋白 Glk (*glk* 编码) 的质粒^[26-27],也能够达到与表达 GalP 和 Glk 的菌株相似的效果,动力学参数见表 1。Glf 是一种转运蛋白,能够促进葡萄糖吸收,与 GalP 相比转运效率相似,不需要 H⁺ 协同参与运输,不需要在低葡萄糖浓度条件下诱导发生作用,减轻了膜孔蛋白向胞内运输的压力,但所需葡萄糖底物浓度较高。通过对表达 Glf 和 Glk 的 PTS⁻ 菌株与表达 GalP 和 Glk 的 PTS⁻ 菌株的比较,它们产 DHS 的得率可基本达到相似^[28]。Ren 等研究显示^[29] Glf 蛋白也能够明显减弱 CCR 效应,提高碳源利用效率。由此可见 Glf 转运系统也是一种较为有效的葡萄糖活性磷酸化转运系统,但目前还未见染色体水平改造的报道。

4 改造 PTS 系统后工程菌产莽草酸应用实例及比较

Chandran 等^[30] 首次对缺失 PTS 系统的大肠杆菌在生产莽草酸方面做了比较完整且系统的研究和分析(参见表 2)。通过不同质粒分别表达 Glf 和 Glk 蛋白使 PTS⁻ 宿主菌重新获得吸收葡萄糖能力,同时解除反馈抑制,加强各种限速步骤酶的表达。图 2 结果显示,在未表达 Glf 蛋白的 PTS 型大肠杆菌内 SP1.1/pKD12.138 内,莽草酸产率为 18%,低于同时表达 Glf 和 Glk 蛋白的 SP1.1/pSC6.090B (21%),可见 Glf 和 Glk 蛋白协同作用能够对葡萄糖的吸收起到促进效果。进一步研究结果显示,删除了大肠杆菌 PTS 系统关键操纵子 (*ptsH-I-crr*) 后的 SP1.1*pts*/pSC6.090B 表现出了极高的莽草酸产率 (27%) 和低于 10 g/L 的较低副产物水平(详见图 3)。在添加 15 g/L 酵母提取物的 10L 罐中效果更

为显著,莽草酸浓度可以达到 84 g/L,产率达到 33%。因此,Glf 和 Glk 蛋白协同作用能够促进甚至完全替代 PTS 系统的功能,经过 PTS 系统改造后的大肠杆菌重组菌在莽草酸生产应用方面具有显著优势。

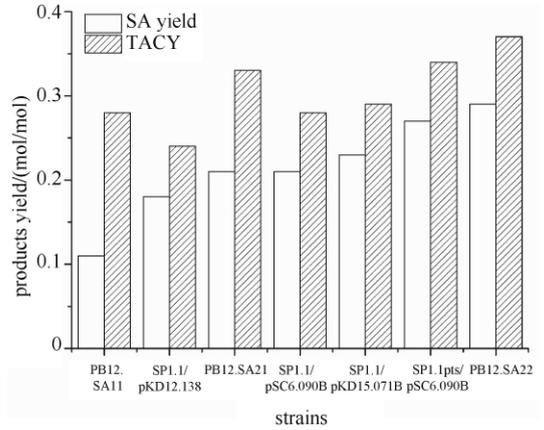


图 2. 不同基因修饰下莽草酸和总芳香族氨基酸产率 (mol/mol) 比较^[30-31]

Figure 2. Comparison of SA yield (mol/mol) and TACY (mol/mol) with different gene modification. * TACY, total aromatic compound yield, mol aromatic compounds/mol glucose.

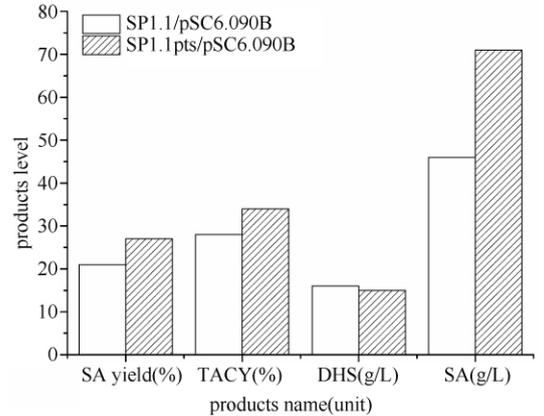


图 3. 改造 PTS 系统前后表达相同质粒的同一菌株相关产物水平变化比较^[30]

Figure 3. Comparison of products level in the same strain before and after transforming PTS system. * TACY, total aromatic compound yield, mol aromatic compounds/mol glucose.

Gosset 团队对 PTS 系统的机理和改造做了许多研究^[14-15,19,24,28],其中 Escalante 等^[31] 以一株自然筛选获得的 PTS⁻ 型菌株为研究对象,该宿主菌在缺失 PTS 系统内 *ptsH-I-crr* 操纵子基础上表达了大肠杆菌 GalP 蛋白来替代 PTS 系统行使葡萄糖磷酸化转运的功能。从表 2 可知,删除莽草酸激酶 (*aroL*

和 *aroK*), 同时加强对限速步骤酶 *AroB* 和 *AroE* 的表达, 莽草酸产量显著提高。其中构建所得的 PB12. SA22 莽草酸产量和总芳香族化合物产率可分别达到 29% 和 37%。

也有报道^[28] 通过对莽草酸前体 DHS 产量在表达 *Glf* 和 *Glk* 的 *PTS*⁻ 菌株与表达 *GalP* 和 *Glk* 的 *PTS*⁻ 菌株中的比较, DHS 产率分别能够达到 41% 和 43%。此结果也反映了 *PTS*⁻ 菌株在生产莽草酸方面的应用是可行的。

邹永康等^[32] 以 *PTS* 系统敲除菌 *DH5 α Δ ptsHI err* (*DHP*) 为宿主菌, 敲除 *aroL*, *ydiB* 基因构建产莽草酸重组菌。同时构建 *aroE*、*aroB*、*tktA*、*glk*、*aroF*^{thr} 串

联基因表达质粒, 重组菌 *DHPYA-T7/pAOC-TGEFB* 经摇瓶发酵后, 莽草酸最高产量为 0.392 g/L。

李明明等^[33] 利用代谢工程手段改造了野生型大肠杆菌 *CICIM B0013*, 连续删除了该菌株的 *aroL*、*aroK*, *PTS* 系统中 *ptsG* 以及奎宁酸脱氢酶 *ydiB* 等基因, 重组菌 (*CICIM B0013 SA4*) 经初步发酵显示生产莽草酸产量为 0.568 g/L, 比原始菌提高 90 余倍。

综上所述, 利用改造大肠杆菌中的 *PTS* 系统为基础构建高产莽草酸是切实可行且意义重大的。将大肠杆菌中 *PTS* 系统的改造作为背景, 进一步改进和完善, 对莽草酸及以此为前体的芳香族氨基酸的合成都会有所提高。

表 2. 不同基因修饰下大肠杆菌莽草酸等产物水平比较

Table 2. Comparison of SA and other products level with different gene modification

strains	gene modification	SA / (g/L)	SA / (mol/mol)	DHS / (g/L)	TACY / (mol/mol)	Ref.
PB12	JM101 Δ (<i>ptsH-I-err</i>):: <i>kan</i> , <i>glc</i> ⁺	-	-	-	0	31
SP1.1	RB791 <i>serA</i> :: <i>aroB aroL</i> 478::Tn10 <i>aroK</i> 17:: <i>Cm</i> ^R	-	-	-	-	20, 30
SP1.1 _{pts}	SP1.1 Δ (<i>ptsH-ptsI-err</i>)	-	-	-	-	30
PB12. SA11	PB12 Δ <i>aroL</i> , pJLBaroG ^{thr} <i>tktA</i> pTOPO <i>aroB</i>	2.82 \pm 0.01	0.11	2.79 \pm 0.21	0.28	31
SP1.1/pKD12.112	SP1.1 <i>serA</i> :: <i>aroB</i> , Δ <i>aroL</i> , Δ <i>aroK</i>	27.2	0.15	4.4	-	20
SP1.1/pKD12.138	SP1.1 <i>Ap</i> ^R , <i>aroF</i> ^{FBR} , <i>tktA</i> , <i>P</i> _{lac} <i>aroE</i> , <i>serA</i>	52	0.18	11	0.24	30
PB12. SA21	PB12 Δ <i>aroL</i> , Δ <i>aroK</i> :: <i>Cm</i> , pJLBaroG ^{thr} <i>tktA</i> , pTOPO <i>aroB</i>	5.07 \pm 0.00	0.21	2.49 \pm 0.06	0.33	31
SP1.1/pSC6.090B	SP1.1 <i>P</i> _{lac} <i>glfglk</i> , <i>aroF</i> ^{FBR} , <i>tktA</i> , <i>P</i> _{lac} <i>aroE</i> , <i>serA</i>	46	0.21	16	0.28	30
SP1.1/pKD15.071B	SP1.1 <i>ppsA</i> , <i>aroF</i> ^{FBR} , <i>tktA</i> , <i>P</i> _{lac} <i>aroE</i> , <i>serA</i>	66	0.23	16	0.29	30
SP1.1 _{pts} /pSC6.090B	SP1.1 _{pts} Δ (<i>ptsH-ptsI-err</i>), <i>P</i> _{lac} <i>glfglk</i> , <i>aroF</i> ^{FBR} , <i>tktA</i> , <i>P</i> _{lac} <i>aroE</i> , <i>serA</i>	71	0.27	15	0.34	30
PB12. SA22	PB12 Δ <i>aroL</i> , Δ <i>aroK</i> :: <i>Cm</i> , pJLBaroG ^{thr} <i>tktA</i> , pTOPO <i>aroBaroE</i>	7.05 \pm 0.06	0.29	1.46 \pm 0.14	0.37	31
SP1.1 _{pts} /pSC6.090B	SP1.1 _{pts} /pSC6.090B, 10L	84	0.33	10	0.38	30
DHPYA-T7/pAOC-TGEFB	DH5 α Δ ptsHI err , Δ <i>aroL</i> , Δ <i>ydiB</i> , knock-in of T7-RNA-Pol gene, pAOC:: <i>aroE</i> , <i>aroB</i> , <i>glk</i> , <i>tktA</i> , <i>aroF</i> ^{thr} , <i>Cm</i> ^r	0.392	-	-	-	32
CICIM B0013 SA4	CICIM B0013 Δ <i>aroL</i> :: <i>dif</i> , Δ <i>aroK</i> :: <i>dif</i> , Δ <i>ptsG</i> :: <i>dif</i> , Δ <i>ydiB</i> :: <i>dif</i>	0.568	-	-	-	33

* TACY, total aromatic compound yield, mol aromatic compounds/mol glucose. * - data not given.

5 结论和展望

莽草酸是合成抗流感药物“达菲”的重要前体, 从八角植物中提取是目前获取莽草酸的主要来源。现今, 利用大肠杆菌发酵生产莽草酸也逐渐成为工业化生产趋势。

目前大部分莽草酸发酵工程菌的改造工作仍是以失活莽草酸激酶为基础。大肠杆菌 *PTS* 系统对莽草酸合成前体 PEP 浪费较大, 结合莽草酸途径修

饰改造 *PTS* 系统是目前构建莽草酸高产菌的研究热点。而现今报道多停留在仅破坏或失活 *PTS* 系统中某一特定基因(如 *ptsG*, *ptsI* 等), 再通过外源质粒表达 *GalP* 蛋白或 *Glf* 和 *Glk* 蛋白来加强甚至替代 *PTS* 系统的功能。这也提示我们可以在染色体上对工程菌进行进一步改造, 对 *PTS* 系统的改造还有很大发展空间。据报道, 产量最高的重组菌是由 Chanderan 等^[30] 构建的 *SP1.1_{pts}/pSC6.090B*, 莽草酸浓度可达 84 g/L, 产率为 0.36 mol/mol, 国内相关报道^[33] 最高摇瓶发酵产量为 0.568 g/L。

利用代谢工程技术手段可进一步在主代谢途径上改造分支代谢途径, 生产奎宁酸, 原儿茶酸, 邻苯二酚, 没食子酸, 连苯三酚等其他难以合成的生物化学原料^[3]。同时莽草酸也是芳香族氨基酸合成的重要前体, 在改造 PTS 系统的基础上能够获得更加高产的工程菌株, 为后续构建高产苯丙氨酸及其他芳香族氨基酸工程菌等提供了新思路。

参考文献

- [1] Rawat G, Tripathi P, Saxena RK. Expanding horizons of shikimic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013: 1-11.
- [2] Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119 (4) : 681-690.
- [3] Ghosh S, Chisti Y, Banerjee UC. Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*, 2012, 30:1425 - 1431.
- [4] Krämer R. Production of amino acids: physiological and genetic approaches. *Food Biotechnology*, 2005, 18 (2) : 171-216.
- [5] Liao JC, Hou SY, Chao YP. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 52 (1) : 129-140.
- [6] Johansson L, Lidén G. Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon-and phosphate-limited conditions. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126 (4) : 528-545.
- [7] Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering*, 2003, 5 (4) : 277-283.
- [8] Liu SP, Xiao MR, Zhang L, Xu J, Ding ZY, Gu ZH, Shi GY. Production of L-phenylalanine from glucose by metabolic engineering of wild type *Escherichia coli* W3110. *Process Biochemistry*, 2013, 48 (3) : 413-419.
- [9] Dell KA, Frost JW. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115 (24) : 11581-11589.
- [10] Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20 (6) : 651-658.
- [11] Chávez-Béjar MI, Báez-Viveros JL, Martínez A, Bolívar F, Gosset G. Biotechnological production of L-tyrosine and derived compounds. *Process Biochemistry*, 2012. 47: 1017-1026
- [12] Shang L, Fan CS, Jin RL, Liu DX, Wang JG, Yin J, Song DX. Knockout of *tyrR* gene in *Escherichia coli* and its effects on the phenylalanine biosynthesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35 (8) : 728-733. (in Chinese)
商量, 范长胜, 金瑞良, 刘东信, 王建冈, 尹隽, 宋大新. 大肠杆菌 *tyrR* 基因剔除及其对苯丙氨酸生物合成的影响. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35 (8) : 728-733.
- [13] Pittard AJ, Davidson BE. TyrR protein of *Escherichia coli* and its role as repressor and activator. *Molecular Microbiology*, 1991, 5 (7) : 1585-1592.
- [14] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4 (1) : 14.
- [15] Escalante A, Cervantes AS, Gosset G, Bolívar, F. Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94 (6) : 1483-1494.
- [16] Matsuoka Y, Shimizu K. Importance of understanding the main metabolic regulation in response to the specific pathway mutation for metabolic engineering of *Escherichia coli*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2013, 3 (4) .
- [17] Gabor E, Göhler AK, Kosfeld A, Gabor E, Göhler AK, Kosfeld A, Staab A, Kremling A, Jahreis K. The phosphoenol pyruvate-dependent glucose-phosphotransferase system from *Escherichia coli* K-12 as the center of a network regulating carbohydrate flux in the cell. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90 (9) : 711-720.
- [18] Flores S, Gosset G, Flores N, De Graaf AA, Bolivar F. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by (13) C labeling and NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*,

- 2002, 4 (2) : 124.
- [19] De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo, V, Gosset, G, Bolívar, F, Ramírez, OT. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering*, 2006, 8 (3) : 281-290.
- [20] Draths KM, Knop DR, Frost JW. Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121 (7) : 1603-1604.
- [21] Iomantas YAV, Abalakina EG, Polanuer BM, Yampolskaya, TA, Bachina TA, Kozlov YI. Method for producing shikimic acid. U. S. Patent 6,436,664. 2002-8-20.
- [22] Whipp MJ, Camakaris H, Pittard AJ. Cloning and analysis of the *shiA* gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Gene*, 1998, 209 (1) : 185-192.
- [23] Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL, von Daeniken R, Weber W, Frost JW. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123 (42) : 10173-10182.
- [24] Martínez K, de Anda R, Hernández G, Escalante A, Gosset G, Ramírez O, Bolívar F. Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7 (1) : 1.
- [25] Lu J, Tang J, Liu Y, Zhu X, Zhang T, Zhang X. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93 (6) : 2455-2462.
- [26] Snoep JL, Arfman N, Yomano LP, Fliege RK, Conway T, Ingram LO. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (7) : 2133-2135.
- [27] Weisser P, Krämer R, Sahn H, Sprenger G A. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (11) : 3351-3354.
- [28] Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnology Progress*, 2003, 19 (5) : 1450-1459.
- [29] Ren C, Chen T, Zhang J, Liang L, Lin Z. An evolved xylose transporter from *Zymomonas mobilis* enhances sugar transport in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8 (66) , 1-9.
- [30] Chandran SS, Yi J, Draths KM, Daeniken RV, Weber W, Frost JW. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*, 2003, 19 (3) : 808814.
- [31] Escalante A, Calderón R, Valdivia A, de Anda R, Hernández G, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9 (1) : 21.
- [32] Zou YK, Zhou JZ, Sun X, Cai YF, Dai HM, Li SL, Zhou CL, Fang HQ. Construction of shikimic acid-producing engineered *Escherichia coli* strains based on *ptsHI_{err}* mutants. *Microbiology China*, 2011, 38 (8) : 1186-1192. (in Chinese)
邹永康, 周军智, 孙旭, 蔡亚非, 戴红梅, 李树龙, 周长林, 方宏清. 基于 PTS 缺陷型大肠杆菌构建莽草酸生产菌. *微生物学通报*, 2011, 38 (8) : 1186-1192.
- [33] Li MM, Chen XZ, Zhou L, Shen W, Fan Y, Wang ZX. Rational design and construction of an overproducing shikimic acid *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29 (1) : 56-67. (in Chinese)
李明明, 陈献忠, 周丽, 沈微, 樊游, 王正祥. 理性设计和构建过量合成莽草酸的大肠杆菌代谢工程菌. *生物工程学报*, 2013, 29 (1) : 56-67.

Improvements of shikimic acid production in *Escherichia coli* with ideal metabolic modification in biosynthetic pathway—A review

Mengrong Xiao, Liang Zhang, Guiyang Shi*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: Shikimic acid (SA) is an important intermediate in the synthesis of aromatic amino acids and has emerged as a key chiral starting material for the synthesis of antiviral drug oseltamivir phosphate (Tamiflu®). Microbial production of SA has a variety of advantages, and *E. coli* is commonly applied in large-scale fermentation and industrial production. Metabolic engineering is one of the main technical methods to construct the industrialized high-yield shikimic acid producing strains. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) is the major active transport system involved in the glucose internalization and phosphorylation in *E. coli* in which it affects the use ratio of PEP in cell. Modification and transformation of the PTS system could regulate the flow of intracellular metabolism and reduce the waste of PEP caused by the PTS system, in the same time, a more ideal shikimic acid producing strain can be constructed combined with the specific modifications of metabolic pathways. It was reported that in the 10 L system, shikimic acid yield reached up to 0.36 mol/mol, with concentration up to 84 g/L. This paper takes a brief overview of the metabolic engineering in the shikimic acid pathway and the transformation of the glucose transporter system, summarizes some latest researches and developments in recent years.

Keywords: *E. coli*, shikimic acid, aromatic amino acid, PTS, metabolic engineering, fermentation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA021201), by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-11-0665), by the Innovative Research Team of Jiangsu Province, the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, the Innovative Program for Graduate Student of Jiangsu Province (CXLX12_0733) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUDCF12016)

* Corresponding author. E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

Received: 2 May 2013 / Revised: 27 June 2013