

强化前体(UDP-GalNAc)合成路径提高果糖软骨素的生产

张 权^{1,2,3}, 酉相成^{1,2,3}, 陈修来^{1,2,3}, 刘 佳^{1,2,3}, 罗秋玲^{1,2,3}, 刘立明^{*1,2,3}

(1.食品科学与技术国家重点实验室,江南大学,江苏 无锡 214122;2.江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122;3.江南大学 食品微生物制造工程实验室,江苏 无锡 214122)

摘要: 硫酸软骨素是一种重要的糖胺聚糖,广泛应用于医药、食品、保健品行业。为了提高硫酸软骨素类似物果糖软骨素的生产,通过过量表达磷酸葡萄糖胺变位酶 (GlmM)、葡萄糖胺合酶 (GlmS),优化融合蛋白 glmM-glmS 的表达水平,获得了最优工程菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS,并确定了最适 IPTG 浓度(0.4 mmol/L)以及诱导温度(37 °C)。最后,在 5-L 罐水平下,借助 DO-stat 补料模式,果糖软骨素的产量达到了 3.99 g/L,较原始菌株提高了 108.9%,为工业化生产果糖软骨素奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌 K4;代谢路径;果糖软骨素;代谢工程;发酵工程

中图分类号: Q 815 文章编号:1673-1689(2020)03-0071-10 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.010

Improving Fructosylated Chondroitin Production by Enhancement of UDP-GalNAc Synthetic Pathway

ZHANG Quan^{1,2,3}, YOU Xiangcheng^{1,2,3}, CHEN Xiulai^{1,2,3}, LIU Jia^{1,2,3},
LUO Qiuling^{1,2,3}, LIU Liming^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Laboratory of Food Microbial—Manufacturing Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Sulfated chondroitin is an important glycosaminoglycans, which is widely used in medical, food and cosmetic fields. To improve the production of fructosylated chondroitin, GlcN synthase (GlmM) and GlcN-6-P synthase (GlmS) were overexpressed, the fusion protein was constructed and a recombinant strain *E. coli* K4-H-glmM-glmS was obtained. Then, the optimal induction conditions including IPTG concentration and induction temperature were established. Finally, with the DO-stat feeding strategy in a 5 L fermenter, the yield was up to 3.99 g/L, which was 108.90% higher than that with wild type strain. The study provides a basis for industrial-scale

收稿日期: 2018-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(21676118); 江南大学自主科研计划重点项目(JUSRP51611A)。

* 通信作者: 刘立明(1976—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事代谢工程、酶工程与发酵工程的研究。

E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

production of fructosylated chondroitin.

Keywords: *Escherichia coli* K4, metabolic pathway, fructosylated chondroitin, metabolic engineering, fermentation engineering organic acid

硫酸软骨素 (sulfated chondroitin, CS) 是一类硫酸化的糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan, GAG), 由葡萄糖醛酸 (UDP-GlcA) 和 N-乙酰氨基半乳糖 (UDP-GalNAc) 通过 $\beta 1 \rightarrow 3$ 或者 $\beta 1 \rightarrow 4$ 糖苷键交替连接而成^[1]。根据二糖单位中硫酸基团数量和位置的差异, CS 可以分为 A、B、C、D、E、F 等类型, 动物来源的 CS 单体多为 CS-A、C^[2]。CS 存在于动物软骨组织中, 具有良好的生物活性和药用价值, 广泛用于医药行业、食品保健品行业和护肤化妆品行业^[3-5]。CS 的生产方法包括动物组织提取法、化学合成法和微生物发酵法。由于原材料匮乏, 生产周期较长, 提取工艺复杂, 产品质量不稳定, 环境污染严重等缺点, 严重制约了 CS 的工业化生产^[6-8]。微生物发酵法与上述方法相比有着独特的优势, 微生物利用廉价的营养物质生产高价值的 CS, 能够显著降低生产成本, 增加经济效益; 发酵液提取与纯化工艺过程较其他方法简单, 得到的产品质量安全稳定; 此外, 发酵法具有环境友好、低污染等优势^[9-10]。

Escherichia coli K4 作为软骨素及其类似物的主要生产菌株, 其荚膜多糖 (capsular polysaccharide, CPS) 是由 UDP-GlcA 和 UDP-GalNAc 通过 $\beta 1 \rightarrow 3$ 或者 $\beta 1 \rightarrow 4$ 糖苷键交替连接而成, 并且 UDP-GlcA 的 C-3 位置被果糖基团所取代^[11]。近年来, 国内外学者从生化工程和代谢工程 2 个方向研究软骨素及其类似物的生产。Cimini 团队以 *E. coli* K4 作为出发菌株进行营养条件的优化, 选择葡萄糖和甘油, 酪蛋白和大豆蛋白胨分别作为碳源和氮源进行摇瓶实验。最终选择甘油和大豆蛋白胨进行 2-L 罐进行发酵实验, 此时最大的细胞密度为 56 g_{cdw}/L, 对应的 CPS 产量为 1.4 g/L^[12]。Restaino 课题组通过向培养基中添加 K4 CPS 的前体物质 UDP-GlcA 和 UDP-GalNAc、果糖, 果糖软骨素的产量提高了 68% 和 57%^[13]。然而这些生化工程策略并不能从根本上解决果糖软骨素低产量、低产率、低生产强度的问

题。因此, 学者从代谢工程方向对 *E. coli* K4 菌株进行代谢改造提高果糖软骨素的产量。K4 CPS 属于 Group II K 抗原, 一共可以分为 3 个功能区^[14]。Region 1 和 region 3 作为 Group II 保守基因, 主要负责多糖的修饰和转运。Region 2 根据不同类型的 K 抗原而有所差异, K4 CPS 基因簇全长 14 kb, 包括 7 个基因 (*kfoA*, *kfoB*...*kfoG*) 和一个转座元件 IS2, 总结于表 1。其中部分基因已经作为代谢工程靶点进行改造, 例如启动子工程策略: 利用不同强度的启动子 Trc 和 T7 过量表达软骨素合成酶 KfoC, 工程菌株 BK4063 产量较原菌提高了 113%^[15]; 转录工程策略: 利用诱导型表达载体和组成型表达载体过表达全局调控因子 SlyA^[16] 和转座子策略表达抗终止子 RfaH^[17], 果糖软骨素的产量均有所提高; 基因敲除策略: 利用 Red 同源重组技术敲除果糖转移酶 KfoE, 终产物为软骨素^[18]。此外, Cimini 课题组还研究了前体 UDP-GlcA 合成路径上的葡萄糖磷酸变位酶 PGM 和焦磷酸化酶 GalU 对荚膜多糖合成的影响, 即在重组菌株 EcK4r3 中过量表达 *pgm* 和 *galU*。虽然 *pgm* 和 *galU* 的表达量较对照菌株分别提高了 1.6 和 1.3 倍, 但是荚膜多糖的产量并未发生变化, 然而在添加谷氨酰胺的培养基中, 荚膜多糖的产量却提高了 45%^[19], 因此我们推测前体 UDP-GalNAc 合成路径对荚膜多糖的生产可能具有促进作用。

为探究前体 UDP-GalNAc 合成路径对果糖软骨素生产的影响, 本研究中选择关键酶 GlmS 和 GlmM 强化 UDP-GalNAc 路径 (图 1)。首先分别单独过量表达 *glmM* 和 *glmS* 基因, 为增强底物之间的转化效率, 构建了融合蛋白 *glmM*-*glmS*, 然后通过利用不同表达强度的核糖体结合位点 (Ribosome binding site, RBS) 控制融合蛋白起始翻译速率, 从而控制融合蛋白的表达强度, 最终获得了最优工程菌株 *E. coli* K4-H-*glmM*-*glmS*。

Table 1 Proteins involved in the biosynthesis of K4 CPS^[14]

蛋白质	作用
KpsF	参与多糖修饰基团 CMP-Kdo 的合成
KpsE	负责将多糖从细胞外膜滴味道细胞膜表面
KpsD	负责将多糖从细胞外膜滴味道细胞膜表面
KpsU	参与多糖修饰基团 CMP-Kdo 的合成
KpsS	参与 Kdo 的合成和转运
KpsC	参与 Kdo 的合成和转运
KpsT	ABC 转运蛋白,负责内膜多糖的转运
KpsM	ABC 转运蛋白,负责内膜多糖的转运
KfoA	差向异构酶,催化 UDP-GlcNAc 转化为 UDP-GalNAc
KfoB	未知
KfoC	软骨素合成酶,N 端和 C 端分别具有 UDP-GlcA 和 UDP-GalNAc 的糖基转移酶活性位点
KfoD	未知
KfoE	果糖转移酶,负责在 GlcA 上添加果糖基团
KfoF	UDP-葡萄糖脱氢酶,催化 UDP-Glc 转化为 UDP-GlcA
KfoG	未知

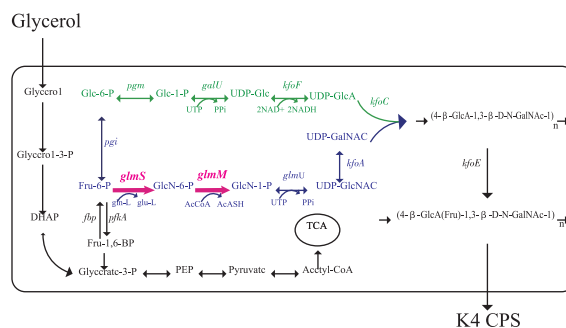


Fig. 1 Synthesis pathway of CPS in *E. coli* K4

1 材料与方法

1.1.1 菌株和质粒

JM109 为本实验室保存;pETM6R1 载体由 pETM6 载体改变启动子区域而来;pETM6 载体, 购买于美国 Addgene 公司;大肠杆菌 K4, 购买于美国菌种保藏中心(ATCC)。本研究用质粒和菌株详见表 2。

Table 2 Plasmids and strains used in this study

名称	描述	来源
质粒		
pTrcHisA	Trc promoter, pBR322 ori, Amp ^R	作者所在实验室
pETM6R1	Trc promoter, ColE1 ori. Amp ^R	作者所在实验室
pTrcHisA-glmM	PTrcHisA 连接 <i>glmM</i> 基因	本研究构建
pTrcHisA-glmS	pTrcHisA 连接 <i>glmS</i> 基因	本研究构建
pTrcHisA-glmM-glmS	PTrcHisA 连接融合蛋白 glmM-glmS	本研究构建

续表 2

名称	描述	来源
pETM6R1-RBS _L -GFP	pETM6R1 连接低表达水平的 <i>GFP</i> 基因	本研究构建
pETM6R1-RBS _M -GFP	pETM6R1 连接中等表达水平的 <i>GFP</i> 基因	本研究构建
pETM6R1-RBS _H -GFP	pETM6R1 连接高表达水平的 <i>GFP</i> 基因	本研究构建
pETM6R1-L-glmM-glmS	pETM6R1 连接低表达水平的融合蛋白 glmM-glmS	本研究构建
pETM6R1-M-glmM-glmS	pETM6R1 连接中等表达水平的融合蛋白 glmM-glmS	本研究构建
pETM6R1-H-glmM-glmS	pETM6R1 连接高表达水平的融合蛋白 glmM-glmS	本研究构建
菌株		
<i>E. coli</i> JM109	General cloning host	作者所在实验室
<i>E. coli</i> K4	Wild type Serotype O5:K4(L):H4	ATCC
<i>E. coli</i> K4-RBS _L -GFP	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pETM6R1-RBS _L -GFP	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-RBS _M -GFP	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pETM6R1-RBS _M -GFP	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-RBS _H -GFP	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pETM6R1-RBS _H -GFP	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-glmM	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pTrcHisA-glmM	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-glmS	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pTrcHisA-glmS	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-glmM-glmS	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pTrcHisA-glmM-glmS	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-L-glmM-glmS	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pETM6R1-L-glmM-glmS	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-M-glmM-glmS	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pETM6R1-M-glmM-glmS	本研究构建
<i>E. coli</i> K4-H-glmM-glmS	<i>E. coli</i> K4 带有重组质粒 pETM6R1-H-glmM-glmS	本研究构建

1.1.2 主要试剂和仪器 限制性内切酶 *AvrII*、*SalI*、*SpeI*、*XbaI*、*XhoI*、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker, 购自大连宝生物工程公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、氨苄青霉素 (Amp)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、呋唑、葡萄糖醛酸, 购自生工生物工程 (上海) 公司; 细菌基因组提取试剂盒, 购自天根公司; PCR 引物 (表 2) 由苏州泓迅生物科技有限公司合成; 其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。PCR 扩增仪、全自动凝胶成像系统、电穿孔仪 Green Pulser、核酸电泳仪, 购自美国 Bio-rad 公司; 5-L 发酵罐, 购自上海保兴生物有限公司。

1.1.3 培养基 种子培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10。

发酵培养基 (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.4, KH_2PO_4 13.5, 柠檬酸 1.7, 甘油 20, 维生素 B1 4.5 mg/L, 金属离子液 10 mL/L。

补料培养基 (g/L): 甘油 500, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10, 维生素 B1 0.2。

以上培养基均在 121 °C 条件下灭菌 15 min, 维生素 B1 过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 种子培养方法 取保存于含体积分数 15% 甘油的菌液 100 μL , 接种到装有培养基 25 mL/250 mL 的摇瓶中, 加入质量浓度为 100 mg/mL 氨苄青霉素 25 μL , 在 37 °C、200 r/min 下培养 10 h 待用。

1.2.2 摇瓶发酵 将种子液按发酵总体积 1% 的接种量, 接种到装液量 50 mL/500 mL 的摇瓶中, 添加质量浓度为 100 mg/mL 氨苄青霉素 50 μL , 37 °C、200 r/min 培养 37 h。当 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时, 采用 0.2~1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 诱导温度为 25~42 °C。

1.2.3 5 L 罐补料分批发酵 采用 5 L 发酵罐进行补料分批发酵。发酵罐初始装液量为 2.5 L。将种子液按总体积 10% 的接种量接种至发酵罐中, 菌体浓度 (OD₆₀₀) 达到 10.0 左右时, 采用 0.4 mmol 的 IPTG 进行诱导。初始条件: 转速为 400 r/min, 通气量为 1.0 vvm, pH 为 7.0。发酵过程中通过流加氨水控制 pH 至 7.0。培养 7 h, 发酵液的溶氧值陡然上升, 20 g/L 的初始甘油消耗完全, 此时即启动 2 种补料模式。当采用 DO-stat 补料模式时, 先通过调节通气量和搅拌转速将溶氧控制在 30% 以上, 补料时流加补

料培养基将溶氧控制在 30%以下;当采用恒速补料模式时,补料培养基的流加速率为 20 mL/h,整个发酵周期为 37 h(见图 5(a),(b))。

1.3 工程菌株的构建

1.3.1 表达载体的构建 结合 The RBS calculator v2.0, 在线预测得到了 3 组不同强度的 RBS 序列,如表 3 中斜体部分所示^[20]。以 RBS-S_i (i: L, M, H)/RBS-A 为引物对,pET-28a-eGFP 为模板,扩增 *eGFP* 基因。分别使用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Xho*I 对表达载体 pETM6R1 和经琼脂糖凝胶回收的 PCR 产物进行双酶切。酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化至 *E. coli* JM109 中,得到表达载体 pETM6R1 -RBS_L -GFP、pETM6R1 -RBS_M -GFP、pETM6R1-RBS_H-GFP。

以 *E. coli* K4 基因组为模板,引物对 KZ-glmM-S/KZ-glmM-A 和 KZ-glmS-S/KZ-glmS-A (表 3)分别扩增基因 *glmM* 和 *glmS*。分别使用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 对表达载体 pTrcHisA 和经琼脂糖凝胶回收的 PCR 产物进行双酶切。酶切产物纯化后

用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化至 *E. coli* JM109 中,得到表达载体 pTrcHisA-glmM、pTrcHisA-glmS。

以 *E. coli* K4 基因组为模板,引物对 RH-glmM-S/RH-glmM-A 和 RH-glmS-S/RH-glmS-A (表 3)分别扩增基因 *glmM* 和 *glmS*。然后以 *glmM* 和 *glmS* 为模板,引物对 RH-glmM-S/RH-glmS-A 进行融合 PCR 得到融合蛋白 glmM-glmS,融合蛋白通过寡肽连接子“GGGS”相连^[21]。

以融合蛋白 glmM-glmS 为模板,引物对 L-glmM -glmS -S/glmM -glmS -A,M -glmM -glmS -S/glmM-glmS-A,H-glmM-glmS-S/glmM-glmS-A PCR 扩增得到不同表达强度的融合蛋白 glmM-glmS。分别使用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Xho*I 对表达载体 pETM6R1 和经琼脂糖凝胶回收的 PCR 产物进行双酶切。酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化至 *E. coli* JM109 中,得到表达载体 pETM6R1-L -glmM -glmS,pETM6R1 -M -glmM -glmS 和 pETM6R1-H-glmM-glmS(图 2)。

表 3 本研究中所用的引物

Table 3 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
KZ-glmM-S	CGCGGATCCATGAGTAATCGTAAATATTTTCGGTAC
KZ-glmM-A	CCGCTCGAGTTAAACGGCTTTTACTGCATCG
KZ-glmS-S	CGCGGATCCATGTGTGGAATTGTTGGCG
KZ-glmS-A	CCGCTCGAGTTACTCAACCGTAACCGATTTTG
RH-glmM-S	CGCGGATCCATGAGTAATCGTAAATATTTTCGGTAC
RH-glmM-A	CGCCAACAATTCCACACATAGAACCACCACCAACGGCTTTTACTGCATCG
RH-glmS-S	CGATGCAGTAAAAGCCGTTGGTGGTGGTCTATGTGTGGAATTGTTGGCG
RH-glmS-A	CCGCTCGAGTTACTCAACCGTAACCGATTTTG
RBS-S _L	<u>GCTCTAGACGACA TAA CGTTA GAAAA GAATA AGGTA GTTTCATG</u> GTGAGCAAGGGCG
RBS-S _M	<u>GCTCTAGATA TTTAAA CTATCA CGACA TAA GGA GGTCA GGGATG</u> GTGAGCAAGGGCG
RBS-S _H	<u>GCTCTAGAAA GAGGGCGCGGCAGAGAAGGAGGAGTAAGAAATG</u> AGTAATCGTAAATATTTTCGGT
RBS-A	<u>CGGGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG</u>
L-glmM-glmS-S	<u>GCTCTAGACGACATAACGTTAGAAAAGAATAAGGTAGTTTCATG</u> AGTAATCGTAAATATTTTCGGT
M-glmM-glmS-S	<u>GCTCTAGATTTAAACTATCACGACATAAGGAGGTCAGGGATG</u> AGTAATCGTAAATATTTTCGGT
H-glmM-glmS-S	<u>GCTCTAGAAAGAGGGCGCGGCAGAGAAGGAGGAGTAAGAAATG</u> AGTAATCGTAAATATTTTCGGT
glmM-glmS-A	CCGCTCGAGTTACTCAACCGTAACCGATTTTG

注:划线处表示限制性内切酶

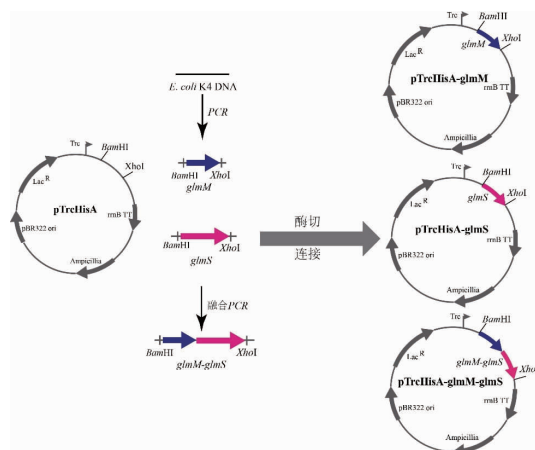


图2 表达载体的构建过程

Fig. 2 Process of constructing expression vector

1.3.2 *E. coli* K4 的转化与重组子的鉴定 *E. coli* K4 的转化采用电击转化方式,转化后涂布于含 100 mg/mL 氨苄青霉素的筛选平板,挑选转化子,提取质粒进行 PCR 验证。获得工程菌株 *E. coli* K4-RBSL-GFP、*E. coli* K4-RBSM-GFP、*E. coli* K4-RBSH-GFP、*E. coli* K4-glmM、*E. coli* K4-glmS、*E. coli* K4-glmM-glmS、*E. coli* K4-L-glmM-glmS、*E. coli* K4-M-glmM-glmS、*E. coli* K4-H-glmM-glmS。

1.4 果糖软骨素的定量检测

1.4.1 GFP 表达检测 菌体在用 0.4 mmol/L IPTG 诱导后,每隔 2 h 检测一次荧光密度的测定,具体方法参照 Gao et al., 2017^[22]。

1.4.2 果糖软骨素的定量检测 采用硫酸咔唑法测量果糖软骨素的产量^[23]。发酵液在 10 000 r/min 条件下离心 5 min,取上清液加入一定量乙醇,过夜放置,沉淀杂质,离心去除样品上清液,适当烘干去除乙醇后,加入 1 mL 超纯水复溶;在冰浴的 25 mL 具塞比色试管中加入配置好的 5 mL 硼酸盐硫酸溶液(25 mmol/L 四硼酸钠),再加入 1 mL 经超纯水复溶的样品混匀,沸水浴 10 min 后冰浴冷却。向冷却的试管中加入 100 μ L 咔唑-乙醇试剂(0.125 g/dL)混匀,沸水浴 15 min 后冰浴冷却;以超纯水为空白对照,50 mg/L D-葡萄糖醛酸为标准品,按上述方法测定标准曲线,再进行浓度换算。

2 结果与分析

2.1 路径酶 GlmM、GlmS 的过量表达对果糖软骨素合成的影响

通过在 *E. coli* K4 中表达磷酸葡萄糖胺变位酶

GlmM 获得了重组菌株 *E. coli* K4-glmM,果糖软骨素的产量、单位细胞的生产能力、单位甘油的生产能力分别达到了 138.71 mg/L、57.09 mg_{K4CPS}/g_{DCW}、9.96 mg_{K4CPS}/g 甘油,较对照菌株 *E. coli* K4 分别提高了 35.98%、42.12%、45.19%(图 3)。该结果表明,在胞质中过量表达 GlmM 能将更多的碳流导向 UDP-GalNAc,进而提高果糖软骨素的产量。

通过在 *E. coli* K4 中表达葡萄糖胺合酶(GlmS)获得了重组菌株 *E. coli* K4-glmS 中,果糖软骨素的产量、单位细胞的生产能力、单位甘油的生产能力分别达到了 153.63 mg/L、61.86 mg_{K4CPS}/g_{DCW}、10.21 mg_{K4CPS}/g 甘油,较重组菌株 *E. coli* K4-glmM 分别提高了 10.77%、8.36%、2.51%(图 3)。该结果表明,在胞质中过量表达 GlmS 能够有效的疏导碳流至 UDP-GalNAc,从而提高了果糖软骨素的产量。

为了增强 Fru-6-P 到 UDP-GalNAc 的转化效率,构建了融合蛋白 glmM-glmS,并在野生型 *E. coli* K4 中进行过量表达。结果表明,重组菌株 *E. coli* K4-glmM-glmS 的果糖软骨素生产能力获得了较大幅度的提高,达到了 191.23 mg/L,较 *E. coli* K4 和 *E. coli*-glmS 分别提高了 87.48%和 24.47%(图 3)。该结果表明,融合蛋白 glmM-glmS 能够将更多的 Fru-6-P 代谢流导向前体 UDP-GalNAc,从而强化了进入果糖软骨素的碳流。

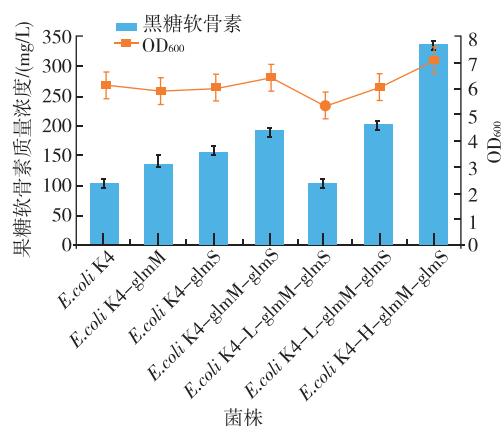


图3 工程菌株摇瓶发酵结果

Fig. 3 Fermentation of engineered strains in shake flask

2.2 融合蛋白 glmM-glmS 的表达水平对果糖软骨素合成的影响

为了进一步精细化控制果糖软骨素合成路径,通过优化融合蛋白 glmM-glmS 的表达水平,提高果

糖软骨素的生物合成能力。首先,实验得到的相对荧光强度分别与预测的 RBS 序列强度一致(图 4)。通过在引物上添加不同强度的 RBS 序列得到不同表达水平的融合蛋白 glmM-glmS,成功构建了 3 株工程菌株 *E. coli* K4-L-glmM-glmS、*E. coli* K4-M-glmM-glmS、*E. coli* K4-H-glmM-glmS。

重组菌株 *E. coli* K4-L-glmM-glmS 的果糖软骨素的生产能力和单位细胞生产 K4CPS 的能力为 103.54 mg/L 和 46.87 mg_{K4CPS}/g_{DCW},较对照菌株 *E. coli* K4-glmM-glmS 下降了 45.86%和 35.42%。表明低强度的融合蛋白 glmM-glmS 不能有效地提高果糖软骨素的产量。然而,重组菌株 *E. coli* K4-M-glmM-glmS 和 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 摇瓶发酵,果糖软骨素的产量分别为 200.21 mg/L 和 334.50 mg/L,较重组菌株 *E. coli* K4-glmM-glmS 分别提高了 4.70%、74.92%。重组菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 单位细胞生产 K4CPS 的能力和单位甘油生产 K4CPS 的

能力分别为 114.67 mg_{K4CPS}/g_{DCW} 和 21.42 mg_{K4CPS}/g 甘油,较菌株 *E. coli* K4-glmM-glmS 分别提高了 58.80%和 69.33%(见表 4)。上述结果表明,优化融合蛋白 glmM-glmS 的起始翻译速率能够提高融合蛋白的表达强度,进而强化了果糖软骨素的合成能力。

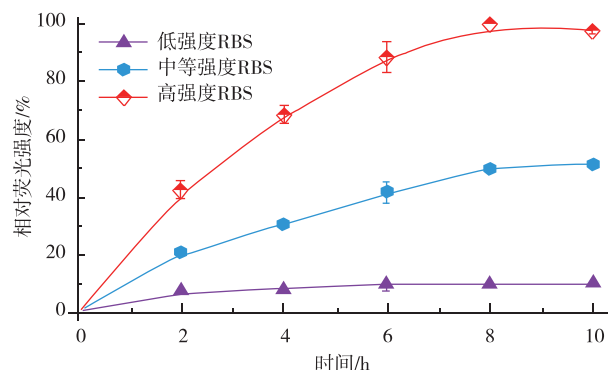


图 4 RBS 序列表达水平的确定

Fig. 4 The expression level of RBS sequence

表 4 菌株摇瓶发酵参数

Table 4 The fermentation parameters of engineered strains in shake flask

菌株	OD ₆₀₀	K4CPS/ (mg/L)	K4CPS 对细胞得率/ (mg _{K4CPS} /g _{DCW})	K4CPS 对甘油得率/ (mg _{K4CPS} /g 甘油)	改变量/ (B-A)/A %
<i>E. coli</i> K4	6.16	102.00	40.17	6.86	0
<i>E. coli</i> K4-glmM	5.91	138.71	57.09	9.96	35.98
<i>E. coli</i> K4-glmS	6.04	153.63	61.86	10.21	50.59
<i>E. coli</i> K4-glmM-glmS	6.43	191.23	72.21	12.65	87.45
<i>E. coli</i> K4-L-glmM-glmS	5.36	103.54	46.87	8.17	1.48
<i>E. coli</i> K4-M-glmM-glmS	6.09	200.21	79.79	14.20	96.27
<i>E. coli</i> K4-H-glmM-glmS	7.08	334.50	114.67	21.42	227.94

注:A 代表 *E. coli* K4 生产果糖软骨素的能力,B 代表工程菌株生产果糖软骨素的能力,A,B 的单位均为 mg/L。

2.3 诱导策略对果糖软骨素产量的影响

为了高效表达融合蛋白 glmM-glmS,借助工程菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS,优化了诱导温度和诱导剂浓度。首先研究了诱导剂 IPTG 的浓度对菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 生产果糖软骨素的影响,结果如图 5(a)所示。随着诱导剂浓度的不断提高,果糖软骨素的合成能力不断增强。当 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 时,果糖软骨素合成能力最强,达到了 340.25 mg/L,当超过 0.4 mmol/L 时,K4CPS 的合

成能力不断减弱,并且菌体生长受到抑制。

其次研究了诱导温度对菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 生产果糖软骨素的影响,结果如图 5(b)所示。当诱导温度为 25 ℃时,K4CPS 合成能力最弱,此时的 OD₆₀₀ 为 5.32,当诱导温度为 37 ℃时,K4CPS 的合成能力最强,达到了 340.25 mg/L,菌体 OD₆₀₀ 为 7.08,当诱导温度为 42 ℃时,K4CPS 产量开始下降。上述结果表明最佳 IPTG 浓度和诱导温度分别为 0.4 mmol/L 和 37 ℃。

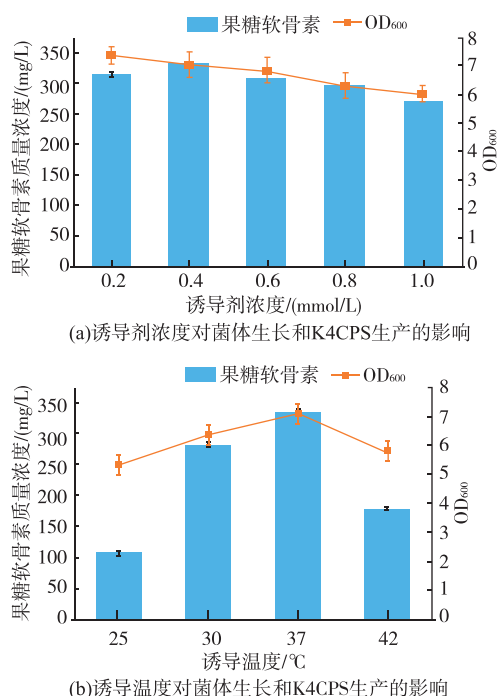
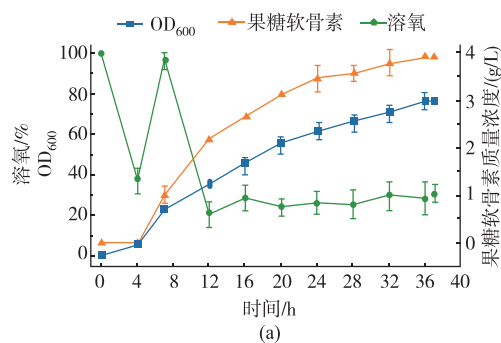


图5 诱导策略对菌株生长和 K4CPS 生产的影响

Fig. 5 Effects of induction strategy on cell growth and production of K4CPS



2.4 5 L 罐补料分批发酵

为了进一步提高果糖软骨素的产量,将最优工程菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 在 5-L 发酵罐上的 2 种补料策略优化,即 DO-stat 补料模式和恒速补料模式(图 6)。

采用恒速补料策略,发酵 36 h,工程菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 的 OD₆₀₀ 达到了 90.4, K4CPS 的产量、单位细胞的生产能力和甘油的生产能力分别为 3.39 g/L、91.02 mg_{K4CPS}/g_{DCW} 和 21.05 mg_{K4CPS}/g 甘油,采用 DO-stat 补料策略,发酵 37 h,工程菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 的 OD₆₀₀ 达到了 76.4,较恒速补料策略降低了 15.48%;K4CPS 的产量、单位细胞的生产能力和甘油的生产能力分别为 3.99 g/L、126.12 mg_{K4CPS}/g_{DCW} 和 29.01 mg_{K4CPS}/g 甘油,较恒速补料策略分别提高了 17.70%、38.56%和 37.81%(见表 5)。此结果表明,DO-stat 补料模式有利于菌株生产 K4CPS,而恒速补料模式更有利于菌体生长。

2.5 讨论

利用果糖软骨素生产菌株 *E. coli* K4 作为代谢

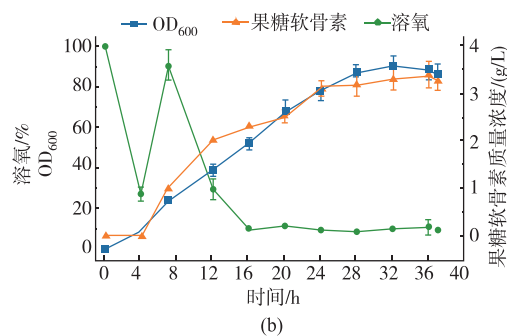


图6 补料模式对菌株生长和 K4CPS 生产的影响

Fig. 6 Effects of feeding mode on cell growth and production of K4CPS.

表5 工程菌株 *E. coli* K4-H-glmM-glmS 在不同补料模式下的发酵情况Table 5 The fermentation parameters of *E. coli* K4-H-glmM-glmS in the 5 L fermentor

发酵参数	补料模式	
	DO-stat	Constant speed
起始 OD ₆₀₀	0.636±0.08	0.636±0.05
最大 OD ₆₀₀	76.40±4.92	90.40±5.12
K4CPS/(g/L)	3.97±0.02	3.39±0.28
K4CPS 对细胞得率/(mg _{K4CPS} /g _{DCW})	126.12±7.44	91.02±2.37
K4CPS 对甘油得率/(mg _{K4CPS} /g 甘油)	29.01±2.58	21.05±1.50
生产强度/(mg/(L·h))	107.30±0.54	94.17±7.78

改造的宿主,由于代谢路径之间的竞争导致果糖软骨素的产量、产率和生产强度较低。本文以野生型 *E. coli* K4 为出发菌株,在原有代谢路径的基础上,分别研究了过量表达 *glmM*、*glmS*,结果表明果糖软骨素的产量较野生型菌株均有所提高。

果糖软骨素生物合成路径中关键酶的融合不仅能够避免多步代谢路径中竞争性酶对底物的降解与转化,而且蛋白质复合体的形成能够拉近不同活性中心位点的空间距离、有利于形成更加有效地底物传输通道^[21]。此外,研究还表明,蛋白质复合体的形成可以阻止底物和某些中间代谢物的降解进而提高特殊代谢路径的效率^[24]。关键酶融合表达策略广泛用于富马酸、次丹参酮二烯的生物合成^[21,25]。

目标产物的合成与微生物的生长息息相关。在摇瓶发酵过程中,果糖软骨素的产量与菌株的生物量呈现正相关性。最优菌株 *E. coli* K4-H-*glmM*-*glmS* 果糖软骨素的产量与生物量达到最大时,与野生型菌株 *E. coli* K4 相比,分别提高了 227.94%、14.96%。可能的原因是果糖软骨素属于一种荚膜多糖,在菌株细胞生长的过程中进行释放,但是荚膜多糖的生物合成受生长条件和环境条件严格调控^[12]。重构微生物代谢路径可能会导致细胞生长延滞以及中间代谢物积累,进而减弱目标产物的生物合

成^[26-27]。因此,需要对代谢路径上关键基因的表达进行优化。为了解决上述问题,一些路径优化的代谢工程策略也应运而生。本研究通过控制 RBS 序列调控融合蛋白的起始翻译速率,从而控制融合蛋白的表达水平。除 RBS 调控策略外,还有一些常用于路径优化的方法:启动子工程,通过构建广泛的启动子库精细化调控基因的表达,替换启动子提高限速步骤酶的表达^[28-29];蛋白质工程,包括采用易错 PCR、点突变和交叉延伸技术改变底物结合口袋和蛋白编码序列的方式实现酶活力的提高^[30]。

3 结 语

作者利用代谢工程策略构建了工程菌株 *E. coli* K4-H-*glmM*-*glmS*,确定了最优诱导剂温度、诱导剂浓度分别为 37 ℃和 0.4 mmol/L,此时摇瓶水平果糖软骨素产量达到了 340.25 mg/L。在最优条件下,5-L 发酵罐采用 DO-stat 补料策略,果糖软骨素的产量达到了 3.99 g/L,较原始菌株提高了 108.9%,为工业化生产果糖软骨素奠定了基础。在后续的研究中,我们计划同时强化软骨素前体合成路径,并且采用模块路径工程策略组合优化前体合成路径和聚合路径关键酶的表达。

参考文献:

- [1] CIMINI D, DE-ROSA M, VIGGIANI A, et al. Improved fructosylated chondroitin production by kfoC overexpression in *E. coli* K4 [J]. *Journal Biotechnology*, 2010, 150(3): 324-331.
- [2] SCHIRALDI C, CIMINI D, ROSA M D. Production of chondroitin sulfate and chondroitin [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1209-1220.
- [3] HE W, ZHU Y, SHIRKE A, et al. Expression of chondroitin-4-O-sulfotransferase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(18): 6919-6928.
- [4] WANG J, GULERIAS, KOFFASM, et al. Microbial production of value-added nutraceuticals [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 37: 97-104.
- [5] SUFLITA M, FU L, HE W, et al. Heparin and related polysaccharides: synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(18): 7465-7479.
- [6] WU Q L, YANG A H, WEI Z, et al. Transcriptional engineering of *Escherichia coli* K4 for fructosylated chondroitin production [J]. *Biotechnology Progress*, 2013, 29(5): 1140-1149.
- [7] MACCARI F, GALEOTTI F, Volpi N. Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 129(4): 143-150.
- [8] WU Fengnan. Extraction of sulphuric acid cartilage biotin by alkali-enzyme process [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(1): 81-83. (in Chinese)
- [9] WU Qiulin, LIU Liming, CHEN Jian. Microbial production of chondroitin sulfate: a review [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*,

- 2012, 28(11):1281-1293. (in Chinese)
- [10] ZHANG Quan, CHEN Xiulai, LIU Jia, et al. Recent advances in microbial production of glycosaminoglycans[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2017, 5(15):40-47. (in Chinese)
- [11] RODRIGUEZ M L, JANN B, JANN K. Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1988, 177(1):117-124.
- [12] CIMINI D, RESTAINO O F, CATAPANO A, et al. Production of capsular polysaccharide from *Escherichia coli* K4 for biotechnological applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 85(6):1779-1787.
- [13] RESTAINO O F, DI LAURO I, CIMINI D, et al. Monosaccharide precursors for boosting chondroitin-like capsular polysaccharide production[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(4):1699-1709.
- [14] WHITFIELD C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 2006, 75(75):39.
- [15] CIMINI D, FANTACCIONE S, VOLPE F, et al. IS2-mediated overexpression of kfoC in *E. coli* K4 increases chondroitin-like capsular polysaccharide production[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2014, 98(9):3955-3964.
- [16] WU Qiulin, LIU Jia, YANG Aihua, et al. Promoter engineering of *Escherichia coli* K4 for production of fructosylated chondroitin [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2014, 12(3):19-25. (in Chinese)
- [17] CIMINI D, DE ROSA M, CARLINO E, et al. Homologous overexpression of rfaH in *E. coli* K4 improves the production of chondroitin-like capsular polysaccharide[J]. **Microbial Cell Factories**, 2013, 12(1):46.
- [18] LIU J, YANG A, LIU J, et al. KfoE encodes a fructosyltransferase involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* K4[J]. **Biotechnology Letters**, 2014, 36(7):1469-1477.
- [19] CIMINI D, CARLINO E, GIOVANE A, et al. Engineering a branch of the UDP-precursor biosynthesis pathway enhances the production of capsular polysaccharide in *Escherichia coli* O5:K4:H4[J]. **Biotechnology Journal**, 2015, 10(8):1307-1315.
- [20] TIAN T, SALIS H. A predictive biophysical model of translational coupling to coordinate and control protein expression in bacterial operons[J]. **Nucleic Acids Research**, 2015, 43(14):7137-7151.
- [21] ZHOU Y J, GAO W, RONG Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for multiradiene production[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2012, 134(6):3234-3242.
- [22] GAO C, WANG S H, HU G P, et al. Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2017, 116:661-672.
- [23] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. **Analytical Biochemistry**, 1962, 4(4):330-334.
- [24] SRERE P A. Complexes of sequential metabolic enzymes[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 1987, 56(1):89.
- [25] CHEN X L, DONG X X, WANG Y C, et al. Mitochondrial engineering of the TCA cycle for fumarate production[J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 31:62-73.
- [26] NIELSEN J, KEASLING J D. Engineering cellular metabolism[J]. **Cell**, 2016, 164(6):1185-1198.
- [27] LEE J W, NA D, PARK J M, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals[J]. **Nature Chemical Biology**, 2012, 8(6):536-546.
- [28] ALPER H, FISCHER C, NEVOIGT E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2005, 102(36):12678-12683.
- [29] PARK S H, KIM H U, KIM T Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. **Nature Communications**, 2014, 5:4618.
- [30] QU Ge, ZHAO Jing, ZHENG Ping, et al. Recent advances in directed evolution[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2018, 34(1):1-11. (in Chinese)