

改造细胞质膜促进途径酶组装及 N-乙酰氨基葡萄糖合成

张成^{1,2}, 吕雪芹^{1,2}, 金柯^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 刘龙^{*1,2}

(1. 江南大学 未来食品科技中心, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 功能膜微域(FMMs)可以作为内源性空间支架进行途径酶组装,适度地提高FMMs在质膜中的占比能够明显提高产物合成量,然而对FMMs进行改造后,细胞生长和产物的合成均受到抑制。在课题组前期研究的基础上,对细胞质膜进行理性改造以缓解FMMs过度改造对细胞造成的影响。首先通过过表达PlsX,PlsY和PlsC改造细胞质膜,之后,以枯草芽孢杆菌合成N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)为例,发现质膜改造的菌株中GlcNAc产量达到(5.18±0.16)g/L,与对照菌株相比产量提升了41.9%,同时,细胞质膜改造也明显降低FMMs过度修饰对菌株生长产生的不利影响。

关键词: 功能膜微域;细胞质膜;N-乙酰氨基葡萄糖;枯草芽孢杆菌

中图分类号:Q 815 文章编号:1673-1689(2021)10-0007-09 DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2021.10.002

Engineering Plasma Membrane to Promote Enzyme Assembly and N-Acetylglucosamine Synthesis

ZHANG Cheng^{1,2}, LYU Xueqin^{1,2}, JIN Ke^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, LIU Long^{*1,2}

(1. Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Functional membrane microdomains (FMMs) can be used as the endogenous spatial scaffolds for pathway enzyme assembly. Moderately increasing the proportion of FMMs in plasma membrane can significantly increase the synthesized product yield. However, the cell growth and product synthesis were both inhibited after further modification of FMMs. Based on the previous research of our group, the rational modification of plasma membrane was carried out to alleviate the effects of excessive FMMs modification on cells. First, the plasma membrane was rationally engineered by overexpression of PlsX, PlsY and PlsC. Then, taking the synthesis of N-acetylglucosamine (GlcNAc) by *Bacillus subtilis* as an example, it was found that GlcNAc titer in the plasma lemma-modified strains was (5.18±0.16) g/L, which was almost 41.9% higher than that of the control strain. In addition, cell membrane modification also reduced the adverse effect of

收稿日期: 2020-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(21808084); 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFA0900300)。

* 通信作者: 刘龙(1980—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事发酵过程优化与控制、酶工程与技术和微生物代谢工程改造方面的研究。E-mail:longliu@jiangnan.edu.cn

FMMs over modification on the growth of the strain.

Keywords: functional membrane microdomains, cytoplasmic membrane, N-acetylglucosamine, *Bacillus subtilis*

微生物在自然进化过程中,主要通过形成多酶复合体来生成底物通道,防止有毒中间代谢物扩散至细胞质,以此来提高代谢途径连续多步反应的催化效率^[1]。因此,如何模拟多酶复合体,将产物合成途径中的关键酶类进行空间组装,目前已成为代谢工程领域的一个研究热点。近年来,研究者发现,将途径酶通过人工构建的蛋白质支架、DNA 支架、RNA 支架、微室结构等空间支架进行组装,可以减少反应中间物传递壁垒,从而显著提高反应效率^[2-7]。为了减少上述外源支架对细胞造成的代谢负担,课题组前期开展了一系列内源性空间支架的研究工作,最终发现枯草芽孢杆菌中功能膜微域(FMMs)具有较高的空间和时间稳定性,可作为内源平台在基因组水平组装的多种途径酶,最终显著提高产物的合成量^[8]。进一步分析显示,当使用质粒对途径酶进行过表达时,由于菌株自身 FMMs 数量有限,无法提供足够的空间满足途径酶的组装,最终导致代谢效率无法进一步提高^[9]。针对上述问题,研究者通过对 FMMs 进行理性改造,提高了质膜上 FMMs 的占比。以 GlcNAc 合成为例,发现 FMMs 的理性改造促使 GlcNAc 的产量提高了 292%^[9]。然而,当进一步改造 FMMs 时,菌株形态发生弯曲并且菌株生长受到抑制,且 GlcNAc 产量下降。推测造成该现象的主要原因是质膜上 FMMs 区和非 FMMs 区需要维持一定的平衡,当这种平衡被打破时,细胞的生长等过程即会受到抑制。

细胞质膜主要由磷脂构成,磷脂酸(PtdOH)是磷脂合成的前体,同时也是细胞质膜的重要结构成分^[10],因此调节 PtdOH 合成是改造细胞质膜的有效策略^[11]。PtdOH 在枯草芽孢杆菌中的合成途径如下:首先,PlsX 催化酰基-ACP 生成酰基-磷酸,之后由 PlsY 将酰基转移到甘油-磷酸的 1 位形成 1-酰基甘油-磷酸,最后 PlsC 将酰基转移到 1-酰基甘油-磷酸的 2 位形成 PtdOH^[10,12-13]。因此 PlsX、PlsY、PlsY 是枯草芽孢杆菌细胞质膜改造的关键靶点。该研究以本课题组前期获取的菌株 BSGN6-Y1 为出发菌株,首先通过过表达 PlsX、PlsY 和 PlsC 对细胞质膜

进行改造;之后,以枯草芽孢杆菌合成 GlcNAc 为例,将 GNA1 和 YqaB 两个异源途径酶通过 SPFH 结构域组装到 FMMs。发酵结果显示,GlcNAc 产量得到显著提高;同时还发现细胞质膜改造能够降低 FMMs 自身过度修饰对菌株形态和生长产生的不利影响。这些结果表明,改造细胞质膜能够改善 FMMs 的途径酶组装,最终增加 GlcNAc 的产量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 本研究中使用的菌株、质粒见表 1。BSGY1:本研究的出发菌株,由 BSGN6(野生型菌株 *B. subtilis* 168 衍生菌株)改造而成;大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 (*E. coli* JM109):用于重组 DNA 实验;菌株和质粒全部保藏在作者所在实验室。

1.1.2 培养基与试剂 Luria-Bertani (LB)培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L。

发酵培养基:蛋白胨 6 g/L,酵母粉 12 g/L,(NH₄)₂SO₄ 6g/L,KH₂PO₄ 2.5g/L,K₂HPO₄·3H₂O 12.5 g/L,葡萄糖 60 g/L,微量金属溶液 10 mL/L(CaCl₂ 4.0 g/L,MnSO₄·5H₂O 1.0 g/L,CoCl₂·6H₂O 0.4 g/L,FeSO₄·7H₂O 4.0 g/L,ZnSO₄·7H₂O 0.2 g/L,CuCl₂·H₂O 0.1 g/L,AlCl₃·6H₂O 0.1 g/L,NaMoO₄·2H₂O 0.2 g/L,H₃BO₄ 0.05 g/L)。

培养基中添加抗生素的剂量分别为:氨苄青霉素 100 μg/mL,卡那霉素 50 μg/mL,氯霉素 5 μg/mL,壮观霉素 100 μg/mL。

TaqDNA 聚合酶、Prime STAR (max)DNA 聚合酶、DNA marker:购自 TaKaRa 公司;试剂和试剂盒:均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体的构建和异源基因的融合 使用引物 F-*yisP* 和 R-*yisP*,从 *B. subtilis* 168 基因组上扩增出 *yisP* 基因,同时使用引物对 F-PHT01 和 R-PHT01 将质粒 pHT01 线性化,最后利用 Gibosen 将 *yisP* 基因和线性化质粒无缝组装。将组装后质粒转

表1 本研究所用菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

名称	特性	来源
	菌株	
BSGN6-Y1	BSGN6 derivate, expressing a copy of <i>yisP</i> gene under the control of P43	作者所在实验室保藏
BSGN6-Y1SY	BSGN6-Y1 derivate, expressing the <i>SPFH-yqaB</i> under the control of <i>Pveg</i> by genome integration	作者所在实验室保藏
BSGN6-Y1M	BSGN6-Y1 derivate, co-overexpression of <i>plsX</i> , <i>plsY</i> and <i>plsC</i> genes under the control of P43 by genome integration	本研究构建
BSGN6-Y1MY	BSGN6-Y1M derivate, expressing the <i>SPFH-yqaB</i> under the control of <i>Pveg</i> by genome integration	本研究构建
BSGN6-Y1TS	BSGN6-Y1 derivate, transfer an empty plasmid pHT01, and overexpression of <i>SPFH</i> under the control of P43 promoter via the plasmid pP43NMK	本研究构建
BSGN6-Y1PS	BSGN6-Y1 derivate, overexpressing <i>yisP</i> gene under the control of <i>lytR</i> promoter via the plasmid pHT01, and overexpression of <i>SPFH</i> under the control of P43 promoter via the plasmid pP43NMK	本研究构建
BSGN6-Y1MPS	BSGN6-Y1M derivate, overexpressing <i>yisP</i> gene under the control of <i>lytR</i> promoter via the plasmid pHT01, and overexpression of <i>SPFH</i> under the control of P43 promoter via the plasmid pP43NMK	本研究构建
BSGN6-Y1SYTA	BSGN6-Y1SY derivate, transfer an empty plasmid pHT01, and overexpression of <i>SPFH-GNA1</i> under the control of P43 promoter via the plasmid pP43NMK	本研究构建
BSGN6-Y1SYPA	BSGN6-Y1SY derivate, overexpressing <i>yisP</i> gene under the control of <i>lytR</i> promoter via the plasmid pHT01, and overexpression of <i>SPFH-GNA1</i> under the control of P43 promoter via the plasmid pP43NMK	本研究构建
BSGN6-Y1MYPA	BSGN6-Y1MY derivate, overexpressing <i>yisP</i> gene under the control of <i>lytR</i> promoter via the plasmid pHT01, and overexpression of <i>SPFH-GNA1</i> under the control of P43 promoter via the plasmid pP43NMK	本研究构建
	质粒	
pP43NMK	AMP, Kana, <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector	作者所在实验室保藏
pHT01	AMP, Kana, <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector	作者所在实验室保藏
pP43NMK-SPFH	pP43NMK derivate with <i>SPFH</i> gene under the control of P43 promoter	作者所在实验室保藏
pP43NMK-SPFH-GNA1	pP43NMK- <i>SPFH</i> derivate by inserting <i>GNA1</i> gene fragment into the C-terminal of <i>SPFH</i> (removing TAA)	作者所在实验室保藏
pHT01-YISP	pHT01 derivate with <i>yisP</i> gene under the control of <i>lytR</i> promoter	本研究构建

化 *E. coli* JM109,次日使用引物 F-*yisP* 和 R-*yisP* 进行菌落PCR,将条带大小约为 1 200 bp 的克隆子测序确认,得到重组质粒 pHT01-YISP,所用引物见表2。

异源基因的表达采用强启动子 P43,其通过质粒 P43NMK 扩增而来。通过融合聚合酶链反应(PCR)将整合位点两侧的上下游序列(800~1 000 bp)、lox71-Spec-lox66 盒、P43 启动子和目的基因进行连接,将纯化后的融合 PCR 产物转化枯草芽孢杆菌感受态细胞,筛选阳性转化子。为了避免多重抗性标记的影响,在下一轮基因过表达之前,用 Cre/lox 系统将抗性标记消除,所用引物见表 2。

1.2.2 GlcNAc 摇瓶发酵 将新鲜转化的单菌落接种到装有 5 mL LB 培养基的 50 mL 离心管中,于 37 °C、220 r/min 培养 10 h;取种子液 1 mL 接种到装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中,于 37 °C、220 r/min 培养 48 h。

1.2.3 细胞密度的检测 通过测量 600 nm 处的光吸收值(OD₆₀₀)来检测细胞密度。OD₆₀₀ 值按公式 1 OD₆₀₀=0.35 g/L 换算为细胞干质量(DCW)。

1.2.4 扫描电镜样品的制备 先用体积分数 5%戊二醛(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.2)进行预固定,再用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗,最后用体积分数 1%锇酸(0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.2)后固定。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	碱基序列 (5'-3')
F- <i>ysisP</i>	AGGTGAAATGTACACGTGATACATAGGAGTGAGAAAATGAAAG
R- <i>ysisP</i>	ACTCCTATGTATCACGTGTACATTTTACCTCCTTTA
F-PHT01	CTGTCTGATATCTAATCTAGAGTCGACGTCCCGG
R-PHT01	GACCTCGACTCTAGATTAGATATCAGACAGAATCTGCTTCACTTC
F- <i>pyisP</i>	TTTTGACTATTAACCCCGCAAC
R- <i>pyisP</i>	TAAGCCGATATTAGCCTCGTATG
<i>plsX</i> -up-F	TTATGGTGCCGCTTGCTCTGATT
<i>plsX</i> -up-R	AAATGTTATCCGCTCTCTTGACACTCCTTATTTGATTTTTGAAGACTTACT
<i>plsX</i> -spec-F	CTTCAAAAAATCAAATAAGGAGTGCTAAGAGAGCGGATAACAATTTACACACAGG
<i>plsX</i> -spec-R	TGCATCTACAGCTATTCTCATGTGTACATTCTCTTTACCTATAATGGTACCG
<i>plsX</i> - <i>plsX</i> -F	CATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGAGAATAGCTGTAGATGCAATGGG
<i>plsX</i> - <i>plsX</i> -R	CTGAACGAGAAGCCTACTCATCTGTTTTTTCTTCTTTCACCTTCTCC
<i>plsX</i> -down-F	GTGAAAGAAGAAAAACAGATGAGTAGGCTTCTCGTTCAGGCAGTACG
<i>plsX</i> -down-R	CAGGCAGCGTCAGCGTGTAA
<i>plsY</i> -up-F	CGCATTGTGGCAGTTCAGACAGA
<i>plsY</i> -up-R	TGTGTGAAATTGTATCCGCTCATTCTCTCCTTGTCTCTTAGCCC
<i>plsY</i> -spec-F	GAACAAGGAGGAGAATGAGCGGATAACAATTTACACACAGG
<i>plsY</i> -spec-R	AGGCCAAAATAATCAATAAAGCAATTAACATGTGTACATTCTCTTACCTATAATGG
<i>plsY</i> - <i>plsY</i> -F	GAGAGGAATGTACACATGTTAATTGCTTTATTGATTATTTGGCCTACTTG
<i>plsY</i> - <i>plsY</i> -R	ACGTATGGCTCCAAAAAGGTTATAACCATTTTACTTTAGGTTCTGTTTTATTGATAAT
<i>plsY</i> -down-F	AAACAGAACCTAAAGTAAAATGGTTATAACCTTTTGGAGCCATACGTTCAAT
<i>plsY</i> -down-R	ATGCCATCCGCTGTGTATGTTAAG
<i>plsC</i> -up-F	AACAAGGACTTAATGGCTGTGTACGG
<i>plsC</i> -up-R	TTATCCGCTCTAGCTCCAACCGTTCCCTTCTACA
<i>plsC</i> -spec-F	AGGGAACGGTTGGAGCTAGAGCGGATAACAATTTACACACAGG
<i>plsC</i> -spec-R	AAGCATTTGCACAAAACCTTATACATGTGTACATTCTCTTACCTATAATGGTACCG
<i>plsC</i> - <i>plsC</i> -F	GGTAAGAGAGGAATGTACACATGTATAAGTTTTGTGCAAATGCTTTAAAAGTTATTCTT
<i>plsC</i> - <i>plsC</i> -R	CTTCATTGGCAGCAGATTATAGCTGATCAAGTTTATCTCTAGTTCTTTAATCCCG
<i>plsC</i> -down-F	ACTAGAGAATAAACTTGATCAGCTATAATCGTGCAGCAATGAAGTATTGAAAAT
<i>plsC</i> -down-R	GCGTCTTTGTCAGCACTTCATAA

样品用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 分别经体积分数 20%、40%、60%、80%、100%、100%、100%、100% 梯度乙醇洗脱后, 样品在临界点 (LEICA CPD-300) 烘干, 离子溅射 (LEICA, ACE-600) 镀膜后粘贴在样品台面上, 置于冷场发射扫描电镜 (HITACHI SU8220) 中测试。

1.2.5 中间代谢产物的测定 将新鲜转化后的单菌落接种到装有 5 mL LB 培养基的 50 mL 离心管中, 于 37 °C、220 r/min 培养 8~10 h, 然后将 1 mL 种子液接种到装有 25 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 37 °C 和 220 r/min 下培养, 并于 12、24、36、48 h

分别取 3 mL 发酵液, 于 4 °C 离心机冷冻离心, 弃上清液。然后加入 1.2 mL 萃取液 ($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=4:4:2$), 于 4 °C 下萃取过夜。10 000 g 离心 15 min 后, 取上清液冷冻干燥。向样品中加入 100 μ L 超纯水, 1 000 g 离心 15 min 后取上清液测定细胞内代谢物浓度。采用液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 检测代谢产物。

1.2.6 GlcNAc 的测定方法 使用高效液相色谱法 (HPLC) 测定发酵液中 GlcNAc 质量浓度。HPLC 检测条件如下: 检测器为示差折光检测器; 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H; 流动相为硫酸水溶液

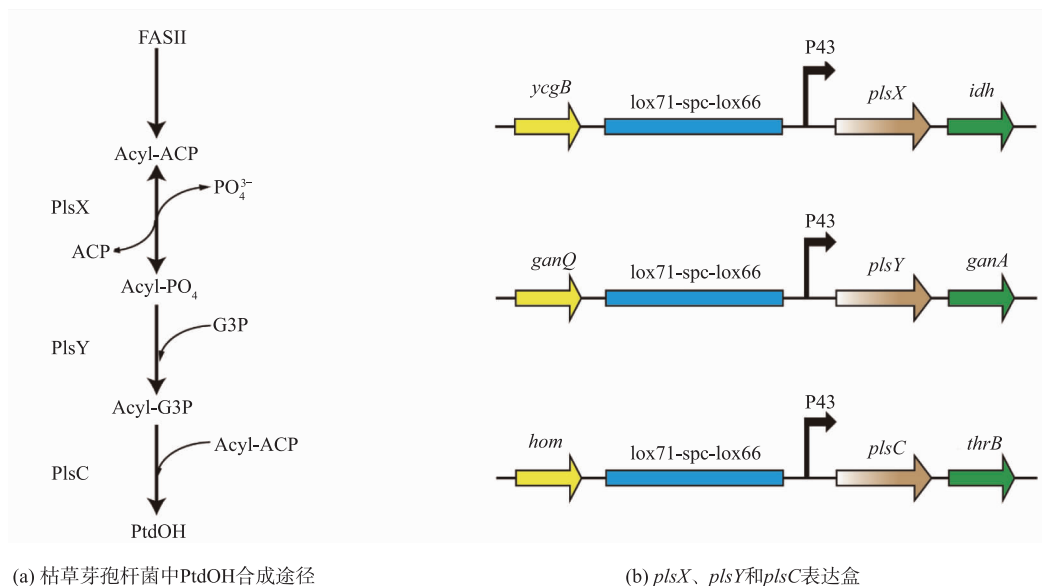
(5 mmol/L);流量 0.6 mL/min,温度 40 °C,进样体积 10 μL。样品处理条件:发酵液经 10 000 g 离心 5 min,取上清液用超纯水稀释到一定倍数,再用 0.22 μm 滤膜过滤稀释液。

2 结果与分析

2.1 质膜改造重组菌的构建

目前,质膜改造策略主要集中在操纵一个或几个已知的能够影响质膜组分或合成的基因、调节因

子和信号转导途径等方面^[14],通过这些改造能够改变质膜功能^[15-16]、质膜的生理特性^[17-19]和质膜形态^[20-21],达到提高底物利用率、改善细胞生长性能和提高代谢效率等目的。PtdOH 是细胞质膜的重要组成部分,枯草芽孢杆菌 PtdOH 合成途径见图 1(a)。PlsX、PlsY 和 PlsC 是该途径的关键酶,构建 *plsX*、*plsY* 和 *plsC* 表达盒,见图 1(b)。先后将上述 3 个重组片段转化到 BSGN6-Y1 菌株中,结合抗生素筛选和抗性标记消除,最终获得质膜改造菌株 BSGN6-Y1M。



(a) 枯草芽孢杆菌中PtdOH合成途径

(b) *plsX*、*plsY*和*plsC*表达盒

图 1 过表达 PtdOH 合成基因

Fig. 1 Overexpression of PtdOH synthetic gene

2.2 质膜改造对菌株生长的影响

细胞质膜是将细胞质和细胞外环境分开的保护性屏障^[22],它能够维持细胞内部环境的稳定,参与信号转导、蛋白质运输和能量代谢等^[23-25]重要细胞过程,暗示了细胞质膜的不当修饰或改造可能不利于菌株生长,因此我们分析了质膜改造对菌株生长的影响。为了探究质膜改造对 FMMs 过度修饰菌株生长的影响,我们构建了 pHT01-YISP 质粒,并将其与 pP43NMK-SPFH 质粒分别共转化 BSGN6-Y1 和 BSGN6-Y1M,得到 BSGN6-Y1PS 和 BSGN6-Y1MPS,此外将 pHT01 和 pP43NMK-SPFH 质粒共转化 BSGN6-Y1,得到 BSGN6-Y1TS,见图 2(a)。如图 2(b) 所示,在菌株培养的前 12 h,与对照菌株 BSGN6-Y1TS 相比,重组菌株 BSGN6-Y1PS、BSGN6-Y1MPS 的 OD₆₀₀ 没有明显变化,但是 12 h 后,BSGN6-Y1PS、BSGN6-Y1MPS 的 OD₆₀₀ 明显低

于 BSGN6-Y1TS。进一步扫描电镜观察发现,BSGN6-Y1PS、BSGN6-Y1MPS 的细胞形态发生了变化,首先细胞长度从 BSGN6-Y1TS 的 (2.11±0.21) μm 增加到 BSGN6-Y1PS 的 (3.29±0.33) μm 和 BSGN6-Y1MPS 的 (2.58±0.28) μm,见图 2(c)。BSGN6-Y1PS 菌株出现了明显的细胞弯曲现象,见图 2(d),这一结果与我们前期发现的 *ylsP* 高表达能够影响细胞生长或细胞形态相同^[9]。然而 BSGN6-Y1MPS 菌株 12 h 后的 OD₆₀₀ 明显高于 BSGN6-Y1PS,它的细胞长度低于 BSGN6-Y1PS 并且细胞没有发生明显的弯曲,这表明质膜改造能够有效降低 *ylsP* 高表达对细胞生长或细胞形态产生的不利影响。

2.3 质膜改造对中间代谢产物的影响

枯草芽孢杆菌以葡萄糖为碳源合成 GlcNAc 需要经由以下步骤:葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸

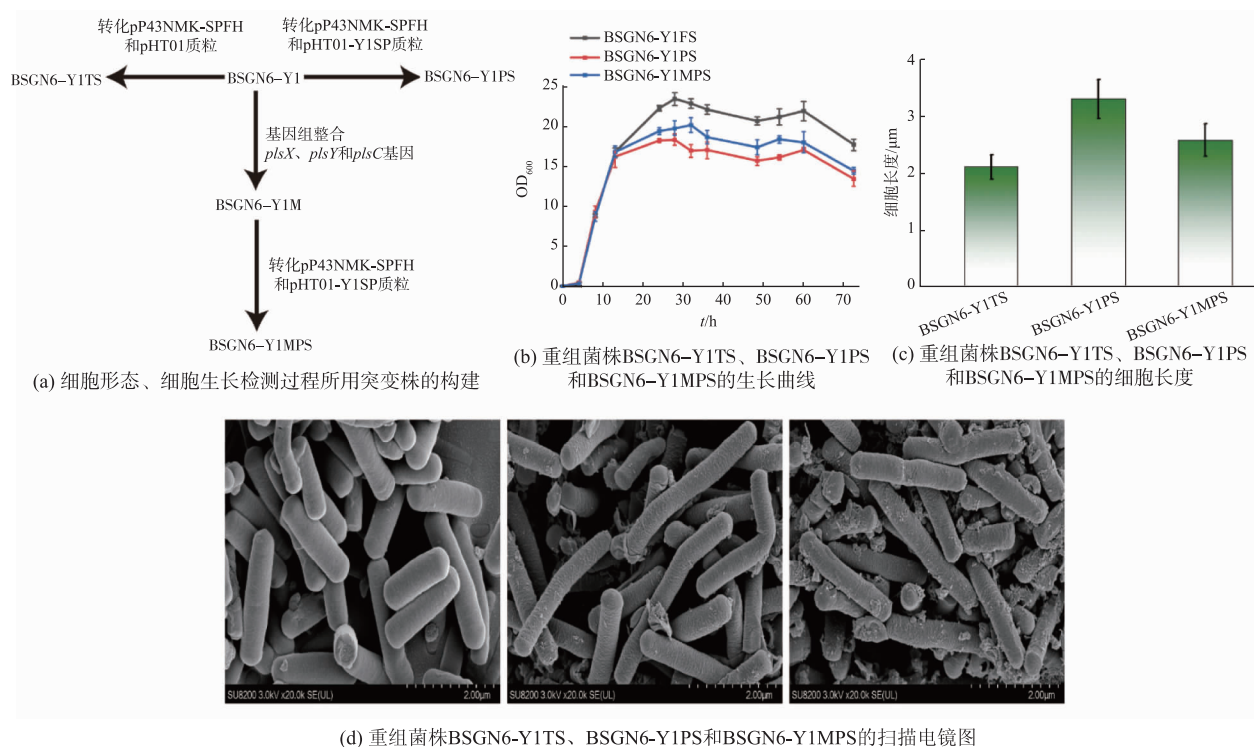


图 2 质膜改造对菌株生长的影响

Fig. 2 Effects of plasma membrane modification on strain growth

(G6P),再由磷酸葡萄糖异构酶(Pgi)和氨基葡萄糖-6-磷酸合成酶(GlmS)催化合成6-磷酸果糖(F6P)和氨基葡萄糖-6-磷酸(GlcN6P)。然后,GlcN6P被异源的氨基葡萄糖-6-磷酸乙酰转移酶(GNA1)转化为N-乙酰氨基葡萄糖-6-磷酸(GlcNAc6P),其中GNA1是合成GlcNAc的关键酶^[26]。GlcNAc的最终合成需要去磷酸化,大肠杆菌YqaB可以催化GlcNAc6P的去磷酸化^[27]。

途径酶的空间组装能够实现途径酶空间上的靠近,强化途径酶的协同催化作用,有利于中间代谢产物的加工进而提高产物的合成效率^[5,7,9,28]。为了探究质膜改造对G6P、F6P、GlcN6P和GlcNAc6P的影响,我们将前期构建的SPFH-yqaB融合基因整合到菌株BSGN6-Y1M中,获得BSGN6-Y1MY菌株;然后将pHT01质粒和pP43NMK-SPFH-GNA1质粒共转化前期构建的BSGN6-Y1SY,得到BSGN6-Y1SYTA;最后将pHT01-YISP和pP43NMK-SPFH-GNA1质粒分别共转化BSGN6-Y1SY、BSGN6-Y1MY,得到BSGN6-Y1SYPA、BSGN6-Y1MYPA,见图3(a)。图3(b)–(d)中,BSGN6-Y1MYPA的中间代谢产物G6P、F6P、GlcN6P和GlcNAc6P的质量分

数明显低于对照菌株BSGN6-Y1SYTA。上述结果表明,质膜改造能够促进多酶复合体对中间代谢产物的加工和利用,减少中间代谢产物向胞质内的扩散。

2.4 质膜改造对GlcNAc产量的影响

上述研究显示,质膜改造有利于中间代谢产物的加工,但对菌株生长和GlcNAc合成能力的影响还不清楚。为了确定质膜改造对菌株产GlcNAc性能的影响,将BSGN6-Y1SYTA、BSGN6-Y1SYPA和BSGN6-Y1MYPA进行摇瓶发酵。如图4(a)所示,发酵48 h后,菌株BSGN6-Y1MYPA的GlcNAc产量为(5.18±0.16) g/L,对照菌株BSGN6-Y1SYTA的GlcNAc产量为(3.65±0.12) g/L,质膜改造后GlcNAc产量提升了41.9%;同时BSGN6-Y1MYPA的OD₆₀₀低于对照菌株BSGN6-Y1SYTA,但是高于BSGN6-Y1SYPA,见图4(b)。上述结果表明,细胞质膜改造能降低yisP高表达对菌株生长产生的不利影响,并促进GlcNAc合成的代谢通量。

3 结语

研究了在枯草芽孢杆菌中过表达磷脂酸合成途径的关键基因,以维持质膜上FMMs和非FMMs

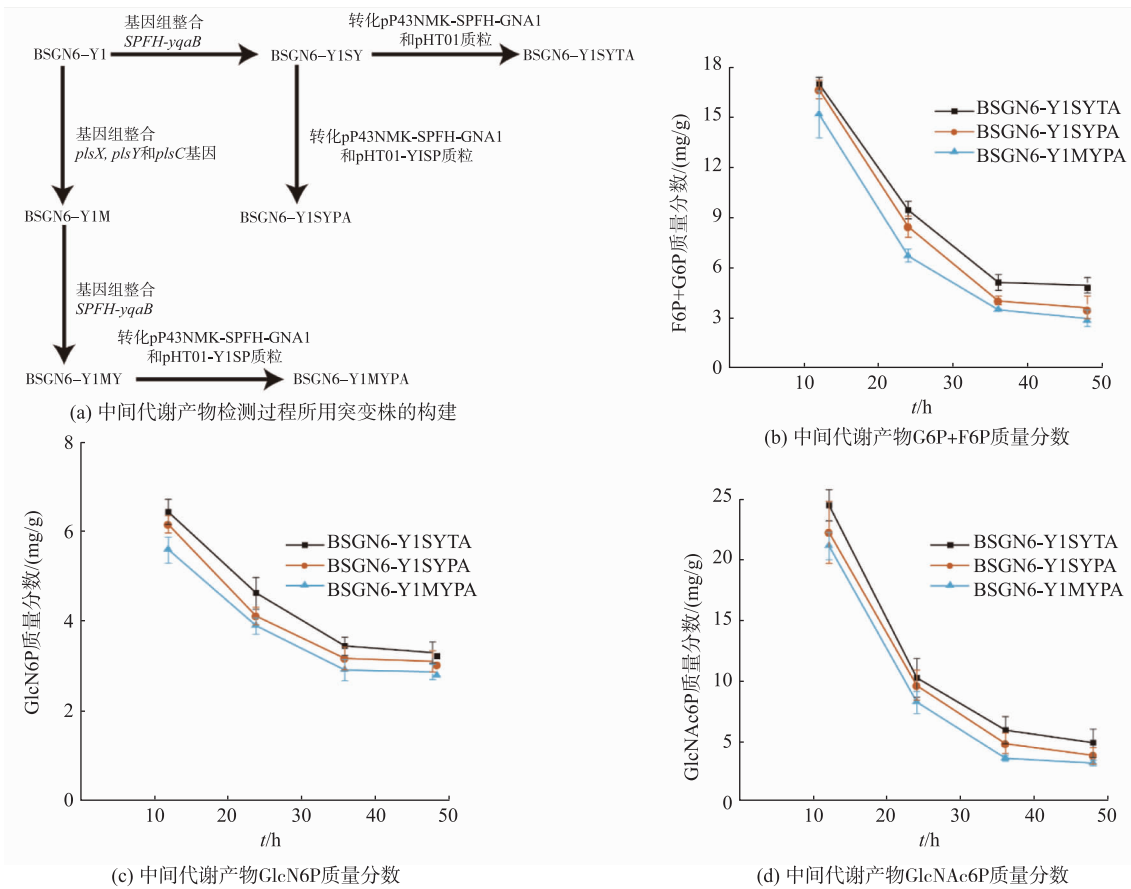


图3 质膜改造对中间代谢产物的影响

Fig. 3 Effects of plasma membrane modification on intermediate metabolites

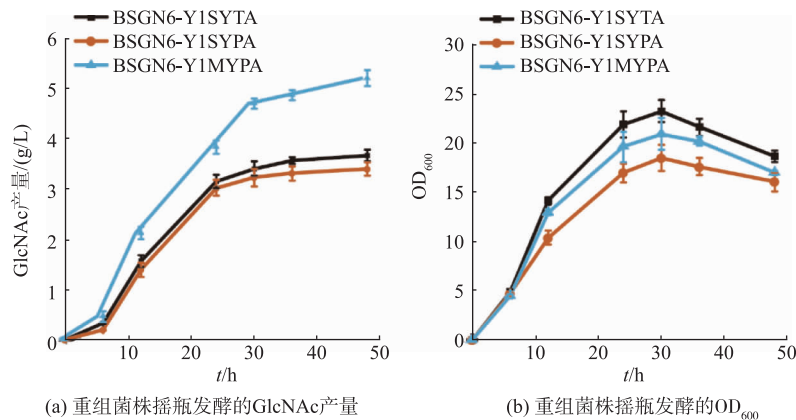


图4 质膜改造对菌株生长和菌株产GlcNAc能力的影响

Fig. 4 Effects of plasma membrane modification on strain growth and the ability to produce GlcNAc

的平衡。在此基础上,将GlcNAc合成所需的2个外源途径酶GNA1和YqaB通过SPFH结构域锚定于FMMs,发现细胞质膜改造不仅能够降低FMMs过度改造对菌株生长产生的不利影响,而且能够促进中间代谢产物的加工,导致G6P、F6P、GlcN6P和GlcNAc6P的质量分数明显低于对照菌株。基于上

述结果,质膜改造后菌株的GlcNAc产量达到(5.18±0.16)g/L,与对照菌株相比提升了41.9%。作者在前期FMMs过度修饰菌株的基础上,首次通过质膜改造来维持FMMs和非FMMs平衡,为降低FMMs过度修饰对菌株生长和产物合成产生的不利影响提供了新思路。

参考文献:

- [1] DIETL A, FEROUSI C, MAALCKE W J, et al. The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex[J]. **Nature**, 2015, 527(7578): 394-397.
- [2] YOUNG E J, BURTON R, MAHALIK J P, et al. Engineering the bacterial microcompartment domain for molecular scaffolding applications[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2017, 8: 1-9.
- [3] ABERNATHY M H, HE L, TANG Y J. Channeling in native microbial pathways: implications and challenges for metabolic engineering[J]. **Biotechnology Advances**, 2017, 35(6): 805-814.
- [4] LEE H, DELOACHE W C, DUEBER J E. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering[J]. **Metabolic Engineering**, 2012, 14(3): 242-251.
- [5] CONRADO R J, WU G C, BOOCK J T, et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency[J]. **Nucleic Acids Research**, 2012, 40(4): 1879-1889.
- [6] DELEBECQUE C J, LINDNER A B, SILVER P A, et al. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies[J]. **Science**, 2011, 333(6041): 470-474.
- [7] DUEBER J E, WU G C, MALMIRCHEGINI G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux [J]. **Nature Biotechnology**, 2009, 27(8): 753-107.
- [8] LV X Q, WU Y K, TIAN R Z, et al. Synthetic metabolic channel by functional membrane microdomains for compartmentalized flux control[J]. **Metabolic Engineering**, 2020, 59: 106-118.
- [9] LV X Q, ZHANG C, CUI S X, et al. Assembly of pathway enzymes by engineering functional membrane microdomain components for improved N-acetylglucosamine synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. **Metabolic Engineering**, 2020, 61: 96-105.
- [10] PAOLETTI L, LU Y J, SCHUJMAN G E, et al. Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2007, 189(16): 5816-5824.
- [11] ROETTIG A, ZUREK P J, STEINBUECHEL A. Assessment of bacterial acyltransferases for an efficient lipid production in metabolically engineered strains of *E. coli*[J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 32: 195-206.
- [12] LU Y J, ZHANG F, GRIMES K D, et al. Topology and active site of PlsY - The bacterial acylphosphate: glycerol-3-phosphate acyltransferase[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2007, 282(15): 11339-11346.
- [13] LU Y J, ZHANG Y M, GRIMES K D, et al. Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in gram-positive pathogens[J]. **Molecular Cell**, 2006, 23(5): 765-772.
- [14] QI Y, LIU H, CHEN X, et al. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains[J]. **Metabolic Engineering**, 2019, 53: 24-34.
- [15] WESTBROOK A W, REN X, MOO-YOUNG M, et al. Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2018, 115(1): 216-231.
- [16] SANDOVAL N R, PAPOUTSAKIS E T. Engineering membrane and cell-wall programs for tolerance to toxic chemicals: beyond solo genes[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2016, 33: 56-66.
- [17] FANG Z, CHEN Z, WANG S, et al. Overexpression of OLE1 enhances cytoplasmic membrane stability and confers resistance to cadmium in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2017, 83(1): 1-11.
- [18] KANONENBERG K, ROYES J, KEDROV A, et al. Shaping the lipid composition of bacterial membranes for membrane protein production[J]. **Microbial Cell Factories**, 2019, 18(1): 1-12.
- [19] SHIN H Y, NIJLAND J G, DE WAAL P P, et al. The amino-terminal tail of Hxt11 confers membrane stability to the Hxt2 sugar transporter and improves xylose fermentation in the presence of acetic acid[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2017, 114(9): 1937-1945.
- [20] WU T, YE L, ZHAO D, et al. Membrane engineering - A novel strategy to enhance the production and accumulation of beta-carotene in *Escherichia coli*[J]. **Metabolic Engineering**, 2017, 43: 85-91.
- [21] WU T, YE L J, ZHAO D D, et al. Engineering membrane morphology and manipulating synthesis for increased lycopene accumulation in *Escherichia coli* cell factories[J]. **3 Biotech**, 2018, 8(6): 1-8.
- [22] ROBERTSON J L. The lipid bilayer membrane and its protein constituents[J]. **Journal of General Physiology**, 2018, 150(11): 1472-1483.

- [23] RAY S, KASSAN A, BUSIJA A R, et al. The plasma membrane as a capacitor for energy and metabolism[J]. **American Journal of Physiology–Cell Physiology**, 2016, 310(3):181-192.
- [24] KELL D B, SWAINSTON N, PIR P, et al. Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis[J]. **Trends in Biotechnology**, 2015, 33(4):237-246.
- [25] KENTALA H, WEBER-BOYVAT M, OLKKONEN V M. OSBP-related protein family: mediators of lipid transport and signaling at membrane contact sites[J]. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 2016, 321:299-340.
- [26] LIU Y, ZHU Y, LI J, et al. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production[J]. **Metabolic Engineering**, 2014, 23:42-52.
- [27] LEE S W, OH M K. A synthetic suicide riboswitch for the high-throughput screening of metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Metabolic Engineering**, 2015, 28:143-150.
- [28] LV X Q, JIN K, WU Y K, et al. Enzyme assembly guided by SPFH-induced functional inclusion bodies for enhanced cascade biocatalysis[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2020, 117(5):1446-1457.

科技信息

欧盟重新批准活性物质碳酸氢钾为低风险物质

2021年9月3日,欧盟委员会发布法规(EU)2021/1452号条例,重新批准活性物质碳酸氢钾(potassium hydrogen carbonate)为低风险物质。

碳酸氢钾的批准期限为2036年10月31日。本条例自发布之日起第20天生效。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟重新批准活性物质碳酸氢钾为低风险物质

[EB/OL]. (2021-9-9). <http://news.foodmate.net/2021/09/605651.html>