代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效生产 MK-7

王永利[1,2,4]，付 刚[4]，张子梦[3,4]，林心萍[1,2]，张大伟[*4]

（1. 大连工业大学 食品学院，辽宁 大连 116034；2. 大连工业大学 国家海洋食品工程技术研究中心，辽宁 大连 116034；3. 大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连 116034；4. 中国科学院 天津工业生物技术研究所，天津 300308）

摘要：七烯甲萘醌（MK-7）作为一种重要的 K 族维生素，在保健食品和医药制造领域具有良好的应用前景。为了得到一株高产 MK-7 菌株，作者以 *Bacillus subtilis* 168 为出发菌株，分别进行了代谢分支途径基因敲除、MK-7 合成途径关键基因 *menA* 的突变体筛选优化、人工操纵子强化部分途径基因的表达来提升 MK-7 发酵产量。最终构建得到高产菌株 MK7-13，发酵产 MK-7 达到（73.73±1.86）mg/L，与对照菌株相比提高了 9.71 倍，为后续微生物发酵法工业化生产 MK-7 奠定了基础。

关键词：七烯甲萘醌；枯草芽孢杆菌；人工操纵子；点突变

中图分类号：Q 81　**文章编号：**1673-1689(2022)08-086-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.08.009

Efficient Production of MK-7 by Metabolic Engineering in *Bacillus subtilis*

WANG Yongli[1,2,4]，*FU Gang*[4]，*ZHANG Zimeng*[3,4]，*LIN Xinping*[1,2]，*ZHANG Dawei*[*4]

（1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 3. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 4. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China）

Abstract: Menaquinone-7 (MK-7) has a promising application prospect in the fields of health food and pharmaceutical manufacturing as an important vitamin of the K family. In this work, the yield of MK-7 fermentation was improved by using *Bacillus subtilis* 168 as the starting strain, knocking out the genes from metabolic branch pathways, screening and optimizing the mutant of speed-limited gene *menA* of the MK-7 synthesis pathway, and enhancing the expression of several MK-7 biosynthesis pathway genes through an artificial operon. Finally, a high-yield strain MK7-13 was developed with the yield of (73.73±1.86) mg/L, which was 9.71 times higher than that of the original strain. In summary, a high-yield MK-7 strain was successfully constructed by a combinatorial metabolic engineering strategy, which laid a foundation for the subsequent industrial production of MK-7 by microbial fermentation.

Keywords: menaquinone-7, *Bacillus subtilis*, artificial operon, site-directed mutation

收稿日期：2022-03-03

基金项目：天津市合成生物技术创新能力提升行动项目（TSBICIP-CXRC-055，TSBICIP-CXRC-004）。

* **通信作者：**张大伟（1978—），男，博士，研究员，博士研究生导师，主要从事食品微生物代谢工程方面的研究。

E-mail：zhang_dw@tib.cas.cn

七烯甲萘醌(menaquinone-7,MK-7)是维生素K2的一种。维生素K2根据甲萘醌骨架C3侧链上异戊二烯基个数的不同有MK-3到MK-14等多种形式[1]。MK-7是脂溶性物质,可溶于异丙醇、甲醇等有机溶剂,见光易分解等。MK-7可预防或减轻很多病症,例如常见的心血管疾病、癌症、炎症、糖尿病、慢性肾脏疾病、免疫紊乱和阿尔茨海默氏病等[2-3]。此外,维生素K2相关产品可以有效预防和缓解由于人口老龄化、久坐不动的生活方式和普遍的维生素D缺乏导致的骨质疏松[4]。还有研究表明,维生素K2能充当γ-谷氨酰羧化酶的辅助因子,γ-谷氨酰羧化酶可以催化维生素K依赖性蛋白(VKDPs)由谷氨酸残基转化为γ-羧基谷氨酸[5-6]。

MK-7的大规模工业化生产是目前研究的重点问题之一。由于传统的化学合成法生产MK-7效率低下、污染环境和合成的顺式结构的低活性,利用微生物细胞工厂生产MK-7越来越受到关注。微生物发酵生产MK-7具有全反式结构活性的优势[7],近年来研究者相继在*Bacillus subtilis natto*[8]、*Lactococcus lactis*[9]、*Escherichia coli*[10]菌株中进行了MK-7合成的研究工作。现有对MK-7生物合成研究最多的菌株仍然是枯草芽孢杆菌,如:Ma等人在枯草芽孢杆菌168(*Bacillus subtilis* 168,*B. subtilis* 168)中设计过表达了不同组合的基因,增强了甲基赤藓糖醇-4-焦磷酸途径(MEP pathway)代谢流,从而提高了MK-7的生物合成量[11];Yang等人通过将整个代谢途径分为4个模块后,分别进行强化从而提高了MK-7发酵产量[12];Zhang等人设计构建了群体感应系统,实现了目标产物的高效合成与细胞生长之间的动态平衡,有效提高了MK-7的产量[13]。枯草芽孢杆菌通常被认为是食品安全级菌株(Generally regarded as safe),代谢工程研究中枯草芽孢杆菌作为模式菌株具有较高的遗传可操作性和稳定性。因此,在我们的研究中也将*B. subtilis* 168作为出发菌株。

微生物生产目标代谢产物是一个复杂的过程,需要许多中间产物的参与与多个反应的协调[14]。如图1所示,作者通过基因敲除、基因定点突变等策略验证了目标产物合成的部分瓶颈;同时通过构建及过表达人工操纵子,进一步明确了充足的前体供应有助于MK-7的积累,为后续代谢改造高产菌株的构建奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物 本研究所用菌株和质粒列于表1,所用引物列于表2。

1.1.2 主要试剂 酵母粉:北京拜尔迪生物技术有限公司;琼脂:上海吉至生化科技有限公司;正己烷、异丙醇、蛋白胨、$MgSO_4·7H_2O$、K_2HPO_4:上海麦克林生化科技有限公司;NaCl:生工生物工程(上海)股份有限公司;甘油、大豆蛋白胨、麦芽糖:北京索莱宝科技有限公司;异戊烯醇:北京华威锐科化工有限公司;质粒小提试剂盒、柱式PCR胶回收试剂盒:OMEGA公司;一步克隆试剂(ClonExpress® Ⅱ/Multis)、2×Taq PCR Master Mix:南京诺维赞生物科技有限公司。

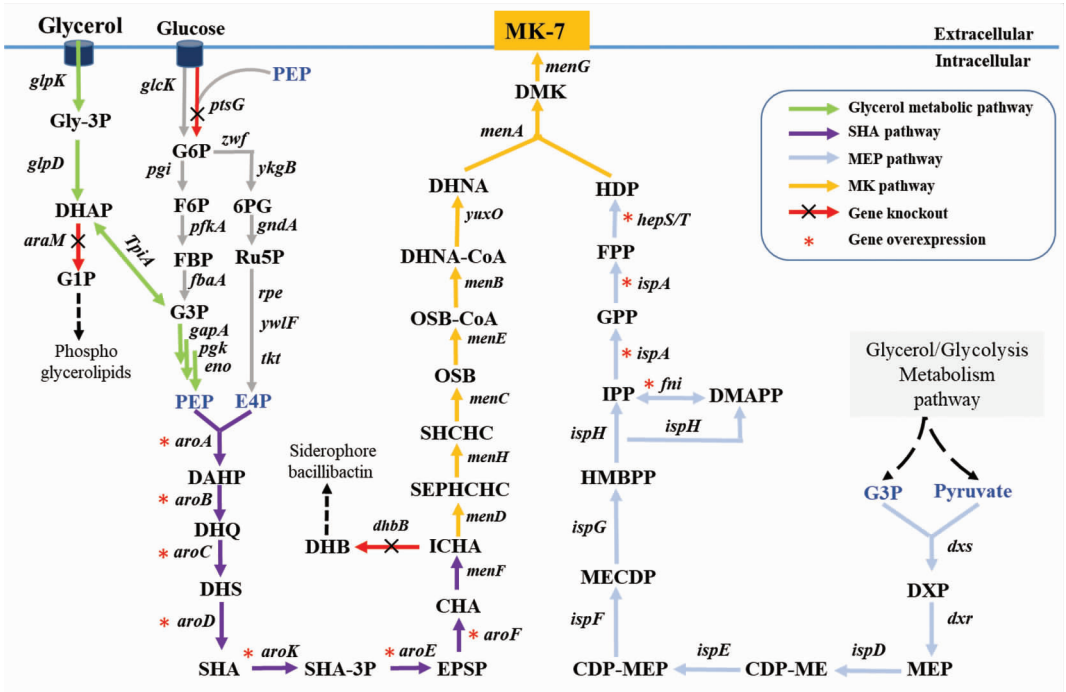
1.1.3 培养基 LB液体培养基(g/L):蛋白胨10,酵母粉5,NaCl 10;LB固体培养基:在LB液体培养基的基础上加入15~20 g/L琼脂,121 ℃灭菌20 min;发酵培养基(g/L):甘油30,大豆蛋白胨60,酵母粉5,$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 ,K_2HPO_4 3,121 ℃灭菌20 min。

1.1.4 主要仪器与设备 恒温摇床:上海知楚仪器有限公司;可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;小型台式离心机、PCR仪:Eppendorf公司;恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂;真空离心浓缩仪-CV200:北京吉艾姆科技有限公司;H-Class/QDa液质联用仪:沃特世公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因敲除 以在*B. subtilis* 168中敲除基因*araM*为例。以*B. subtilis* 168基因组为模板,分别用引物Δ*araM*-UP-F/R、Δ*dhbB*-DN-F/R进行PCR扩增,得到基因*araM*上下游片段:*araM*-UP、*araM*-DN;以质粒PDG为模板,用引物Δ*araM*-CR-F/R进行PCR扩增,得到氯霉素抗性基因片段*araM*-CR。将3个片段纯化后按照*araM*-UP、*araM*-CR、*araM*-DN的顺序进行多片段融合。利用同源重组整合到*B.subtilis* 168基因组完成敲除[15],同时在引物Δ*araM*-CR-R和ΔaraM-DN-F中各添加100 bp上游同源臂序列进行同源重组完成无痕敲除。基因*ptsG*和基因*dhbB*也用上述方法完成敲除。

1.2.2 人工操纵子的构建 以人工操纵子AO-KF的构建为例。以*B.subtilis* 168基因组为模板,分别用引物AO-KF-*aroK*-F/R、AO-KF-*aroE*-F/R、AO-



Glycerol：甘油；Glucose：葡萄糖；Gly-3P：甘油-3-磷酸；DHAP：磷酸二羟丙酮；G1P：甘油醛 1-磷酸；G6P：葡萄糖-6-磷酸；F6P：果糖-6-磷酸；FBP：果糖-1，6-二磷酸；G3P：甘油醛-3-磷酸；6PG：葡萄糖酸-6-磷酸；Ru5P：5-磷酸核酮糖；PEP：磷酸烯醇丙酮酸；E4P：赤藓糖-4-磷酸；DAHP：3-脱氧-阿拉伯-庚酮酸 7-磷酸；DHQ：3-脱氢奎宁酸；DHS：3-脱氢莽草酸；SHA：莽草酸；SHA-3P：莽草酸 3-磷酸；EPSP：5-氧-(1-羧基乙烯基)-3-磷酸莽草酸；CHA：分支酸；ICHA：异分支酸；SEPHCHC：2-琥珀酰-5-烯醇丙酮酸-6-羟基-3-环己烯-1-羧酸；SHCHC：2-琥珀酰-6-羟基-2，4-环己二烯-1-羧酸；OSB：2-琥珀酰苯甲酸；OSB-CoA：2-琥珀酰苯甲酸-CoA；DHNA-CoA：1，4-二羟基-2-萘甲酸-CoA；DHNA：1，4-二羟基-2-萘甲酸；Pyruvate：丙酮酸；DXP：1-脱氧木糖-5-磷酸；MEP：甲基赤藓糖醇-4-焦磷酸；CDP-ME：4-(胞苷 5'-焦磷酸)-2-碳-甲基赤藓糖醇；MECDP：2-磷酸-4-(胞苷 5-焦磷酸)-2-碳-甲基赤藓糖醇；HMBPP：1-羟基-2-甲基-2-丁烯基 4-焦磷酸；IPP：异戊烯基焦磷酸；DMAPP：二甲基烯丙基焦磷酸；GPP：香叶基焦磷酸；FPP：法尼基焦磷酸；HDP：庚丙烯基焦磷酸；DMK：2-去甲基甲萘醌；MK-7：七烯甲萘醌。

图 1　枯草芽孢杆菌中的 MK-7 合成途径

Fig. 1　MK-7 synthetic pathway in *B. subtilis*

表 1　本研究所用菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

菌株	菌株描述	来源
Escherichia coli DH5α	商业感受态细胞	南京诺唯赞公司
B. subtilis 168	Wild-type	作者所在实验室保存
MK7-01	*B. subtilis* 168 with Δ*araM*	本研究构建
MK7-02	*B. subtilis* 168 with Δ*ptsG*	本研究构建
MK7-03	*B. subtilis* 168 with Δ*dhbB*	本研究构建
MK7-04	*B. subtilis* 168 harboring pDG-*menA*	本研究构建
MK7-05	*B. subtilis* 168 harboring pDG-*menA* (*menA*-Q67D)	本研究构建
MK7-06	*B. subtilis* 168 harboring pDG-*menA* (*menA*-Q67R)	本研究构建
MK7-07	*B. subtilis* 168 harboring pDG-*menA* (*menA*-N74A)	本研究构建
MK7-08	*B. subtilis* 168 harboring pDG-*menA* (*menA*-N74D)	本研究构建
MK7-09	*B. subtilis* 168 harboring pDG-*menA* (*menA*-N74R)	本研究构建
MK7-10	*B. subtilis* 168 harboring pDG-AD	本研究构建

续表 1

菌株	菌株描述	来源
MK7-11	*B. subtilis* 168 harboring pDG-KF	本研究构建
MK7-12	*B. subtilis* 168 harboring pDG-HF	本研究构建
MK7-13	MK7-02 harboring pDG-*menA*(*menA*-Q67D)-KF	本研究构建
质粒		
pDG	*E. coli-B. subtilis* shuttle vector, PmalA, Amp^R, Cm^R	作者所在实验室保存
pDG-*menA*	pDG derivative, *menA* gene	本研究构建
pDG-*menA*(*menA*-Q67D)	pDG derivative, *menA* (Q67D) gene	本研究构建
pDG-*menA*(*menA*-Q67R)	pDG derivative, *menA* (Q67R) gene	本研究构建
pDG-*menA*(*menA*-N74A)	pDG derivative, *menA* (N74A) gene	本研究构建
pDG-*menA*(*menA*-N74D)	pDG derivative, *menA* (N74D) gene	本研究构建
pDG-*menA*(*menA*-N74R)	pDG derivative, *menA* (N74R) gene	本研究构建
pDG-AD	pDG derivative, *aroA*、*aroB*、*aroC*、*aroD* gene	本研究构建
pDG-KF	pDG derivative, *aroK*、*aroE*、*aroF* gene	本研究构建
pDG-HF	pDG derivative, *hepS*、*ispA*、*fni* gene	本研究构建
pDG-*menA*(*menA*-Q67D)-KF	pDG-*menA*(*menA*-Q67D) derivative, *aroK*、*aroE*、*aroF* gene	本研究构建

表 2　本研究所用引物

Table 2　Primers used in this study

引物名称	引物序列(5′-3′)
Δ*araM*-UP-F	ATGAAAAAAATGACTGTCTGTTTTCTTG
Δ*araM*-UP-R	GCTTTAGTTGAAGACTATTTCTGTTTCAGTTCACCTGC
Δ*araM*-CR-F	TGAAACAGAAATAGTCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTT
Δ*araM*-CR-R	GCCATAATACGCATCTATTTCTGTTTCAGTTCACCTGCCGCTCTGTCCAAGGCTTTATTCATTCAGTTTTCGTGCGG
Δ*araM*-DN-F	ACTGAATGAATAAAGCCTTGGACAGAGCGGCAGGTGAACTGAAACAGAAATAGATGCGTATTATGGCCAGTCAT
Δ*araM*-DN-R	TCATATCAGAATCCCCTCCTCAGC
Δ*ptsG*-UP-F	ATGACAAAGGAGCTGAGGATCGT
Δ*ptsG*-UP-R	GTGCTTTAGTTGAAGAAAGAATTGACCTCCTCTTTTTACTAGTCTGAC
Δ*ptsG*-CR-F	GAGGAGGTCAATTCTTTCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACAAAC
Δ*ptsG*-CR-R	GCTGTAAGGTCAGACTAGTAAAAAGAGGAGGTCAATTCTTGAAAGAATTGACCTCCTCTTTTTACTAGTCTGACCTTACAGC
Δ*ptsG*-DN-F	GCTGTAAGGTCAGACTAGTAAAAAGAGGAGGTCAATTCTTAAAACTGAATGAATAAAGCATTAAAGCAAGCGGTTCAG
Δ*ptsG*-DN-R	TTACTTGAATGTTTCTTTTACGAACGCGACA
Δ*dhbB*-UP-F	GGCTATCGAAACTGATTCCGAGG
Δ*dhbB*-UP-R	TTTGTTGAACTAATGGGTGCTTTAGTTGAAGAATGAACACTTCCTCTCAAATTGTTGTTTTATTTTTTAAATC
Δ*dhbB*-CR-F	TCTTCAACTAAAGCACCCATTAGTTC
Δ*dhbB*-CR-R	TATCAGGCATCCGTTTGTTTACCCTCCTTATGAACACTTCCTCTCAAATTGTTGTTTTATTTTTTAAATTTATTCATTCAGTTTTCGTGCGGAC
Δ*dhbB*-DN-F	AAGGAGGGTAAACAAACGGATGC
Δ*dhbB*-DN-F	GGCCAAATAATCTATGATTTTCTCCTATCAATTTCAG
menA-Frag-F	ATTAGCTAGGGGGAATAATTATGAACCAAACAAATAAGGGTGAGGG
menA-Frag-R	ACTGTCGGAACGAGACTTCTTTATCGGAAATAGCTGATCAATAATCCGATCG

续表 2

引物名称	引物序列(5′-3′)
menA-Vect-F	AGAAGTCTCGTTCCGACAGTTG
menA-Vect-R	AATTATTCCCCCTAGCTAATTTTCGTTTAAT
menA-Q67D-F	TCTTGCCTATGGATCGACATCGCGACGAAC
menA-Q67D-R	AAATAAGTTCGTCGCGGATGTCGATCCATAGGC
menA-Q67R-F	TCTTGCCTATGGATCAGAATCGCGACGAAC
menA-Q67R-R	AAATAAGTTCGTCGCGATTCTGATCCATAGGC
menA-N74A-F	CCAGATCGCGACGAACTTATTTGCAGAATACTATGATT
menA-N74A-R	CCGCGTTTAAAATCATAGTATTCTGCAAATAAGTTCGTCG
menA-N74D-F	CAGATCGCGACGAACTTATTTGACGAATACTATGATT
menA-N74D-R	CGCGTTTAAAATCATAGTATTCGTCAAATAAGTTCGTCG
menA-N74R-F	CAGATCGCGACGAACTTATTTAGAGAATACTATGATT
menA-N74R-R	CGCGTTTAAAATCATAGTATTCTCTAAATAAGTTCGTCG
AO-AD-*aroA*-F	ATGAAACGAGATAAGGTGCAGACCT
AO-AD-*aroA*-R	GCAGTGTCTTCATTTTGAATTCCTCCTTT TCAGGATTTTTTCGAAAGC
AO-AD-*aroB*-F	AATCGTTAACACGTTCATATGTAAATCGCTCCTTT TCATGATGTCTCCTCCAATCG
AO-AD-*aroB*-R	TCGAAAAAATCCTGAAAAGGAGGAATTCAAA ATGAAGACACTGCATGTTCAAAC
AO-AD-*aroC*-F	GGAGGAGACATCATGAAAAGGAGCGATTTACAT ATGAACGTGTTAACGATTAAAGGAG
AO-AD-*aroC*-R	CGTACAGCTTTTTCATTCAGATCCCCCCACTATCCCCGTGTGTTTTTAT
AO-AD-*aroD*-F	CACACGGGGATAGGGGGGGATCTGATATGAAAAAGCTGTACGG
AO-AD-*aroD*-F	TTAACATTCTGTTCCTCCTAATTTTCC
PDG-AD-Frag-F	TAGAAGGAGGTCGTCATATGAAACGAGATAAGGTGCAGACCT
PDG-AD-Frag-R	ACTGTCGGAACGAGACTTCTTTAACATTCTGTTCCTCCTAATTTTCC
PDG-AD-Vect-F	AGAAGTCTCGTTCCGACAGTTG
PDG-AD-Vect-R	ATGACGACCTCCTTCTATTTAAAAACAATTC
AO-KF-*aroK*-F	ATGAACGCTAAACGAGCCATC
AO-KF-*aroK*-R	CGTACAGCTTTTTCATCAAATCTCCTCCTTTGTTACATCGGCTGATAAAGATC
AO-KF-*aroE*-F	TATCAGCCGATGTAACAAAGGAGGAGATTTGATGAAAAAGCTGTACGGG
AO-KF-*aroE*-R	GGCTGTTAAATATCTCATCAAATCTCCTCCTTTGTTAACATTCTGTTCCTCCTAATTTTCC
AO-KF-*aroF*-F	GGAGGAACAGAATGTTAACAAAGGAGGAGATTTGATGAGATATTTAACAGCCGGAG
AO-KF-*aroF*-R	TTAAAATTCCCTCGACAGTTTTCTCATATTC
PDG-KF-Frag-F	AAATAGAAGGAGGTCGTCATATGAACGCTAAACGAGCCATC
PDG-KF-Frag-R	ACTGTCGGAACGAGACTTCT TTAAAATTCCCTCGACAGTTTTCTCATATTCTCC
PDG-KF-Vect-F	AGAAGTCTCGTTCCGACAGTTG
PDG-KF-Vect-R	ATGACGACCTCCTTCTATTTAAAAACAATTCCA
AO-HF-*hepS*-F	TTGCAAGACATCTACGGAACTTTAGC
AO-HF-*hepS*-R	CtCGTTAATTTATTTGTCATTAATTATTCCCCCTTTACCCTTCTTCCACTTTCTG
AO-HF-*ispA*-F	GAAAGTGGAAGAAGGGTAGGGGGAATAATTATGACAAATAAATTAACGAG
AO-HF-*ispA*-R	CGTTCTGCTCGAGTCATATGTAAATCGCTCCTTTCTTAGTGATCTCTTGCCGC
AO-HF-*fni*-F	GCGGCAAGAGATCACTAAAGGAGCGATTTACATATGACTCGAGCAGAACGAAAAAG
AO-HF-*fni*-R	TTATCGCACACTATAGCTTGATGTATTGACC
PDG-HF-Frag-F	AAATAGAAGGAGGTCGTCATTTGCAAGACATCTACGGAACTTT
PDG-HF-Frag-R	ACTGTCGGAACGAGACTTCTACTGTCGGAACGAGACTTCT
PDG-HF-Vect-F	AGAAGTCTCGTTCCGACAGTTG
PDG-HF-Vect-R	ATGACGACCTCCTTCTATTTAAAAACAATTCCA
PDG-*menA*(Q67D)-HF-Frag-F	TGATCAGCTATTTCCGATAAATGAACGCTAAACGAGCCATCC
PDG-*menA*(Q67D)-HF-Frag-R	ACTGTCGGAACGAGACTTCTTTAAAATTCCCTCGACAGTTTTCTCATATTCTCC
PDG-*menA*(Q67D)-HF-Vect-F	AACTGTCGAGGGAATTTTAAAGAAGTCTCGTTCCGACAGTTGG
PDG-*menA*(Q67D)-HF-Vect-R	ATGGCTCGTTTAGCGTTCATTTATCGGAAATAGCTGATCAATAATCCGATCG

KF-*aroF*-F/R 进行 PCR 扩增,得到 KF-*aroK*、KF-*aroE*、KF-*aroF* 共 3 个片段。将片段纯化后按照 KF-*aroK*、KF-*aroE*、KF-*aroF* 的顺序进行多片段融合[16-17],每个基因前通过引物添加 RBS 序列。

1.2.3 重组质粒的构建 以 pDG-*menA* 质粒的构建为例。以 *B. subtilis* 168 基因组为模板,用引物 *menA*-Frag-F/R 进行 PCR 扩增,得到片段 pDG-*menA*-Frag;以 pDG 质粒为模板,用引物 *menA*-Vect-F/R 进行 PCR 扩增,得到带有麦芽糖启动子 PmalA 的片段 pDG-*menA*-Vect。将片段纯化后利用一步克隆试剂盒完成无缝克隆[18-19],最后进行大肠杆菌商业感受态 DH5α 转化,利用氨苄西林(Amp)抗性筛选得到 pDG-*menA* 质粒。质粒 pDG-AD、pDG-KF、pDG-HF、pDG-*menA* (*menA*-Q67D)-KF 也用上述方法完成构建。

1.2.4 重组菌株的构建 用 Spizizen 转化方法[20]进行重组菌株的构建。

1.2.5 点突变 以 pDG-*menA* (*menA*-Q67D)点突变质粒构建为例。以 pDG-*menA* 质粒为模板,用引物 *menA*-Q67D-F/R 进行反向 PCR 扩增,将质粒片段纯化后进行大肠杆菌商业感受态 DH5α 转化,利用氨苄西林(Amp)抗性筛选得到 pDG-*menA*-Q67D 质粒。点突变质粒 pDG-*menA* (*menA*-Q67R)、pDG-*menA* (*menA*-N74A)、pDG-*menA* (*menA*-N74D)、pDG-*menA* (*menA*-N74R)也用上述方法完成构建。

1.2.6 生长量测定 根据发酵时长将菌液稀释至适当倍数,用分光光度计测定发酵液在 OD_{600} 处的吸光值。

1.2.7 菌株发酵培养 发酵种子培养:挑取活化的单菌落于 LB 培养基中培养 14 h,培养条件为 37 ℃、220 r/min。摇瓶发酵培养:种子培养液按照初始 OD=0.1 加到含有 30 mL 发酵培养基的摇瓶中,40 ℃、200 r/min 振荡培养 4 d。每组菌株发酵设置 3 个平行。

1.2.8 MK-7 萃取 取 5 mL 发酵液于 250 mL 三角瓶中,加入 5 mL 浓盐酸进行破壁。破壁完成后加入 5 mL 异丙醇于 200 r/min 振荡 10 min,再加入 10 mL 正己烷振荡 10 min。吸取上层萃取液 5 mL 放入 15 mL 离心管中进行真空浓缩。

1.2.9 MK-7 检测与分析 取 0.5 mL 上机液($V_{甲醇}$:$V_{乙腈}$:$V_{二氯甲烷}$=3:1:1)加入浓缩产物中进行复溶,随后过孔径为 0.22 μm 的有机滤头,取 200 μL 置于液相内衬管中进行检测。MK-7 采用超高效液相色谱(UPLC)检测,色谱柱为 Waters XBridge® BEH C18 (2.5 μm,3.0 mm×100 mm),柱温 40 ℃,进样量 3 μL,检测波长为 270 nm。流动相为 100% 纯甲醇,流量为 0.8 mL/min。使用 GraphPad Prism 8 软件对单因素实验进行显著性分析,用"均值±标准差"表示实验数据结果,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$。

2 结果与分析

2.1 代谢分支途径基因敲除对 MK-7 合成的影响

分支途径基因敲除是代谢工程中常用的改造策略之一。为了得到一株较好的底盘菌,在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168 的基础上分别敲除 *araM*、*ptsG*、*dhbB* 这 3 个基因。培养基中添加甘油进行发酵生产 MK-7 时,甘油经过甘油激酶(GlpK)、甘油-3-磷酸脱氢酶 (GlpD) 的催化生成磷酸二羟丙酮(DHAP),磷酸二羟丙酮可与甘油醛-3-磷酸相互转化进行 MK-7 的生产与菌体的生长。甘油-1-磷酸脱氢酶(AraM)可催化磷酸二羟丙酮转化成甘油醛-1-磷酸(G1P)进入磷酸甘油酯代谢途径,属于 MK-7 代谢竞争途径[21]。基因 *ptsG* 参与调控糖类的磷酸化与代谢,同时也会消耗 MEP 途径前体:磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)。由于 PEP 是 MK-7 合成的重要前体物质,敲除掉基因 *ptsG* 会积累 PEP 参与到 MK-7 代谢合成中。基因 *dhbB* 可以调控异分支酸(ICHA)进行铁载体杆菌凝集素的生物合成,属于 MK-7 合成途径的分支途径[22]。利用经典的同源重组方法分别敲除 *araM*、*ptsG*、*dhbB* 等 3 个基因,得到 MK7-01、MK7-02、MK7-03 菌株。

将 MK7-01、MK7-02、MK7-03 菌株活化后进行发酵产量验证。由图 2 可以看出,分别敲除掉这3 个基因都可以提高 MK-7 的产量。与对照菌株 *B. subtilis* 168 相比,敲除基因 *dhbB* 后 MK-7 产量提高了 49.8 %,达到(10.425±0.629) mg/L,是这 3 个基因敲除中产量提升效果最好的,说明沉默铁卟啉杆菌素途径可以使菌体的代谢更多流向 MK-7 的合成。另外,敲除掉 *araM* 基因和 *ptsG* 基因后,MK-7 产量分别提高了 19.4%和 46.7%。值得注意的是,MK7-02 菌株的 MK-7 产量与 MK7-03 菌株相差不多,生物量上具有明显的优势。

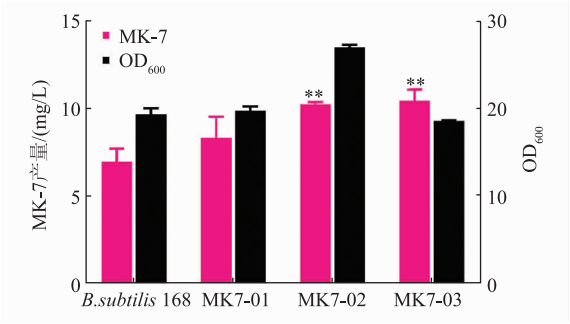


图 2 敲除基因 *araM*、*ptsG*、*dhbB* 对 MK-7 产量的影响

Fig. 2 Effects of *araM*, *ptsG* and *dhbB* gene knock on MK-7 production

2.2 关键基因 *menA* 及 *menA* 突变体的过表达对 MK-7 合成的影响

1,4-二羟基-2-萘甲酸-戊烯基转移酶(MenA)是决定 MK-7 合成途径效率的关键酶，可催化 1,4-二羟基-2-萘甲酸和异戊二烯侧链生产 DMK,进而生成 MK-7。构建好过表达重组质粒 pDG-*menA* 后,参考之前在纳豆芽孢杆菌的研究报道[23],在重组质粒 pDG-*menA* 的基础上分别设计进行 *menA* 基因单点突变。其中单点突变位点包括 Q67D、Q67R、N74A、N74D、N74R。将构建好的重组质粒 pDG-*menA* 及单点突变质粒 pDG-*menA* (*menA*-Q67D)、pDG-*menA* (*menA*-Q67R)、pDG-*menA* (*menA*-N74A)、pDG-*menA* (*menA*-N74D)、pDG-*menA* (*menA*-N74R) 采用 Spizizen 转化法分别转入枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168 中,成功得到菌株 MK7-04(pDG-menA)、MK7-05(Q67D)、MK7-06(Q67R)、MK7-07(N74A)、MK7-08(N74D)、MK7-09(N74R)。

将上述菌株活化后进行发酵产量验证。由图 3 可以看出，过表达关键基因 *menA* 可以明显提高 MK-7 的发酵产量，相比于对照菌株 *B. subtilis* 168 提高了 3.26 倍,MK-7 产量达到了(24.84±0.35) mg/L。与过表达 *menA* 菌株 MK7-04 相比，过表达 *menA* 突变菌株中 MK7-06 (Q67R)、MK7-07 (N74A)、MK7-09 (N74R) 的产量都出现不同程度的降低，MK7-05(Q67D)菌株和 MK7-08(N74D)菌株的发酵 MK-7 产量分别提高了 10.7% 和 9.6%，达到了(27.50±5.89)、(27.23±0.27) mg/L。说明过表达 *menA* 可以提高 MK-7 发酵产量，同时通过筛选途径关键基因突变体的方式也会进一步提升发酵产量。

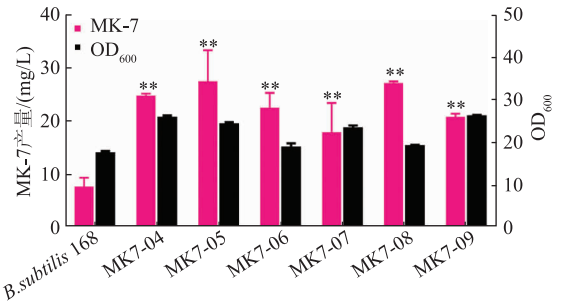


图 3 关键基因 *menA* 过表达及点突变菌株的 MK-7 产量

Fig. 3 MK-7 production of key gene *menA* overexpressed strain and *menA* mutant strains

2.3 人工操纵子过表达对 MK-7 合成的影响

人工操纵子 AO-AD 包含 4 个基因:*aroA*、*aroB*、*aroC*、*aroD*，将这 4 个基因组成人工操纵子并利用 Gibson assembly 的方法连接到麦芽糖诱导型质粒 pDG 上进行过表达。人工操纵子 AD 可以将磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P)催化生成莽草酸 (SHA)。人工操纵子 AO-KF 包含 3 个基因:*aroK*、*aroE*、*aroF*,可催化莽草酸(SHA)生成分支酸(CHA)进入 MK 代谢途径。人工操纵子 AO-HF 包含 3 个基因:*hepS*、*ispA*、*fni*，可催化五碳的异戊烯基二磷酸(IPP)叠加合成三十五碳的庚丙烯基二磷酸 (HDP)，进一步与 1,4-二羟基-2-萘甲酸(DHNA)缩合形成 MK-7。将上述人工操纵子过表达质粒 pDG-AD、pDG-KF、pDG-HF 采用 Spizizen 转化法转入枯草芽孢杆菌 *B.subtilis* 168 中,分别得到 MK7-10 菌株、MK7-11 菌株、MK7-12 菌株。

将 MK7-10 菌株、MK7-11 菌株、MK7-12 菌株活化后发酵验证产量。由图 4 可以看出,过表达 3种人工操纵子都可以明显提高 MK-7 的产量。与对照菌株 *B. subtilis* 168 相比,3 种操纵子中 KF 的过表达效果最好,MK-7 的产量提高了 2.63 倍,达到了(20.51±1.63) mg/L。过表达人工操纵子 AD 菌株 MK-7 产量达到了(15.94±0.30) mg/L,过表达人工操纵子 KF 的效果强于人工操纵子 AD,这一结果反映出莽草酸的积累量相对充足,而分支酸的量不足。同时也说明,在一定范围内分支酸的积累也会增加MK-7 的发酵产量。过表达人工操纵子 HF 菌株 MK-7 产量达到了(17.34±0.65) mg/L,是对照菌株的 2.2倍,这就表示 HDP 的积累会增加 MK-7 产量的积累。由此可见，以人工操纵子的形式构建多基因过表达重组菌株是提高 MK-7 发酵产量的一种有效方式。

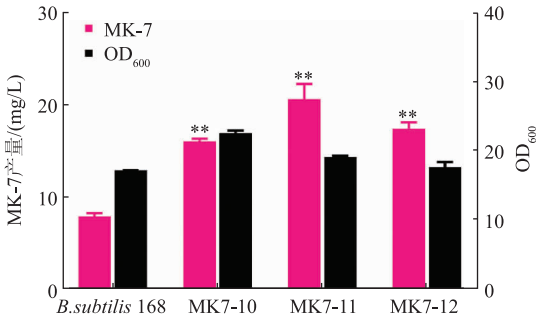


图 4　过表达不同人工操纵子 MK-7 产量变化情况

Fig. 4　Changes of MK-7 production by overexpress different artificial operons

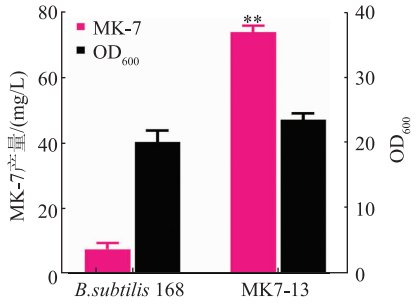


图 5　整合菌株的 MK-7 产量验证结果

Fig. 5　Verification result of MK-7 production of integrated strain

2.4　整合过表达提高 MK-7 发酵产量

将上述单因素实验中最优改造进行整合:在菌株 MK7-02 的基础上,将 *menA* 基因点突变(Q67D)和人工操纵子(KF)连接到带有麦芽糖启动子 PmalA 的 pDG 质粒骨架上得到过表达质粒 pDG-*menA*(Q67D)-KF,利用 Spizizen 转化方法将上述质粒转入 MK7-02 菌株构建得到整合菌株 MK7-13。

将整合菌株 MK7-13 活化后进行发酵产量验证。由图 5 可以看出,整合菌株 MK7-13 的 MK-7 发酵产量达到了(73.73±1.86) mg/L,与对照菌株相比提高了 9.71 倍,说明在分支途径基因敲除菌株 MK7-03 的基础上整合过表达可以进一步提高 MK-7 的发酵产量。

3　结　语

MK-7 在食品、医药、农业等领域应用广泛[24],利用微生物发酵法工业化生产 MK-7 具有重要意义。作者以 *B.subtilis* 168 为出发菌株,利用代谢改造的方法提高了 MK-7 发酵产量。在前期工作中分别验证了敲除分支途径基因、过表达关键基因 *menA* 及 *menA* 突变体、构建人工操纵子强化部分途径基因的表达可提升 MK-7 的发酵产量。最后结合上述分支途径基因敲除、关键基因及突变体过表达、人工操纵子多基因强化表达结果进行整合构建并成功得到高产菌株 MK7-13,最终的摇瓶发酵产量达到了(73.73±1.86) mg/L。随着近年来 *Bacillus subtilis* 越来越受到广泛关注,更多的改造策略与工具被相继开发出来。后续研究中对于 MK-7 合成竞争途径、不影响菌体自身生长的副产物代谢途径的敲除与弱化有望进一步提高 MK-7 发酵产量,同时 MK-7 合成过程中的能量供给、辅因子的形式转换也值得更加深入的探究。后续工作中需要进行更加系统、全面的菌种改造工作,并结合工业化放大培养以期进一步提高 MK-7 的发酵产量。

参考文献:

[1] MAHDINIA E,DEMIRCI A,BERENJIAN A. Production and application of menaquinone-7(vitamin K2):a new perspective[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2016,33(1):2.

[2] FUSARO M,COSMAI L,EVENEPOEL P,et al. Vitamin k and kidney transplantation[J]. **Nutrients**, 2020,12(9):2717.

[3] SCHWALFENBERG G K. Vitamins k1 and k2:The emerging group of vitamins required for human health[J]. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2017,2017:6254836.

[4] REN L,PENG C,HU X,et al. Microbial production of vitamin K2:current status and future prospects[J]. **Biotechnology Advances**, 2020,39:107453.

[5] CAPOZZI A,SCAMBIA G,MIGLIACCIO S,et al. Role of vitamin K2 in bone metabolism:a point of view and a short reappraisal of the literature[J]. **Gynecol Endocrinol**, 2020,36(4):285-288.

[6] SATO T,INABA N,YAMASHITA T. MK-7 and its effects on bone quality and strength[J]. **Nutrients**, 2020,12(4):965.

[7] SHEARER M J,NEWMAN P. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin k with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis[J]. **Journal of Lipid Research**, 2014,55(3):345-362.

[8] SONG J, LIU H, WANG L, et al. Enhanced production of vitamin K2 from *Bacillus subtilis* (natto) by mutation and optimization of the fermentation medium[J]. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2014, 57(4): 606-612.

[9] BØE C A, HOLO H. Engineering lactococcus lactis for increased vitamin K2 production[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, 8: 191.

[10] GAO Q, CHEN H, WANG G, et al. Highly efficient production of menaquinone-7 from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2021, 10(4): 756-765.

[11] MA Y, MCCLURE D D, SOMERVILLE M V, et al. Metabolic engineering of the MEP pathway in *Bacillus subtilis* for increased biosynthesis of menaquinone-7[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2019, 8(7): 1620-1630.

[12] YANG S, CAO Y, SUN L, et al. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* to promote de novo biosynthesis of menaquinone-7[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2019, 8(1): 70-81.

[13] ZHANG Q, WU Y, GONG M, et al. Production of proteins and commodity chemicals using engineered *Bacillus subtilis* platform strain[J]. **Essays in Biochemistry**, 2021, 65(2): 173-185.

[14] NIELSEN J, KEASLING J D. Engineering cellular metabolism[J]. **Cell**, 2016, 164(6): 1185-1197.

[15] GOPINATH K, WARNER D F, MIZRAHI V. Targeted gene knockout and essentiality testing by homologous recombination[J]. **Methods in Molecular Biology**, 2015, 1285: 131-149.

[16] BASITTA P, WESTRICH L, RÖSCH M, et al. TAGOS: a plug-and-play method for the assembly of artificial gene operons into functional biosynthetic gene clusters[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2017, 6(5): 817-825.

[17] ADHIKARY H, SANGHAVI P B, MACWAN S R, et al. Artificial citrate operon confers mineral phosphate solubilization ability to diverse fluorescent pseudomonads[J]. **Public Library of Science One**, 2014, 9(9): e107554.

[18] GIBSON D G, SMITH H O, HUTCHISON C A, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome[J]. **Nature Methods**, 2010, 7(11): 901-903.

[19] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. **Nature Methods**, 2009, 6(5): 343-345.

[20] SPIZIZEN J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1958, 44(10): 1072-1078.

[21] YANG S, WANG Y, CAI Z, et al. Metabolic engineering of Bacillus subtilis for high-titer production of menaquinone-7 [J]. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, 2019, 66(1): e16754.

[22] CUI S, LV X, WU Y, et al. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2019, 8(8): 1826-1837.

[23] HU L X, FENG J J, WU J, et al. Identification of six important amino acid residues of *menA* from *Bacillus subtilis* natto for enzyme activity and formation of menaquinone[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2020, 138: 109583.

[24] VOS M, ESPOSITO G, EDIRISINGHE J N, et al. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency[J]. **Science**, 2012, 336(6086): 1306-1310.