

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

生質物創新運用之轉換技術及其效益研究

受委託機關(構)：國立清華大學化工系

計畫主持人：沈若樸

聯絡電話：03-5715131 ext 35706

E-mail address：crshen@mx.nthu.edu.tw

報告日期：112 年 11 月 26 日

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、 研究計畫目的.....	3
開發以乙酸作為碳源之生物精煉平台.....	3
乙酸做為碳源之簡介.....	4
微生物乙酸利用機制.....	4
乙酸對微生物生長的抑制.....	5
透過突變篩選乙酸環境之優勢大腸桿菌株.....	5
表現基因提高乙酸進入中心代謝.....	6
合成紫色桿菌素之微生物簡介.....	7
代謝工程於合成紫色桿菌素之切入點及策略.....	8
合成紫色桿菌素之代謝負荷及代謝平衡.....	9
代謝平衡在紫色桿菌素之應用.....	9
貳、執行方法及進行步驟：.....	10
DEOXYVIOLACEIN 生產菌株篩選流程.....	10
DEOXYVIOLACEIN 及相關產物生產實驗.....	11
產物與分析方法.....	11
基因剔除方法.....	12
RBS LIBRARY 之建立方法.....	12
參、主要發現與結果：.....	13
透過環境突變篩選出乙酸優勢株.....	13
剔除抑制基因.....	14
表現 ACS 生產測試.....	14
增加色胺酸通量生產測試.....	15
最終生產測試.....	17
建立 RBS LIBRARY 調控代謝途徑基因表現.....	18
優化篩選方式.....	19
培養盤優化.....	19
篩選過程中第一次 OVERNIGHT 的優化.....	20
篩選過程中第二次 OVERNIGHT 的優化.....	21
以呈色法篩選具有生產潛力之菌株.....	21
結論.....	23
肆、參考資料.....	23

中文摘要

溫室氣體如二氧化碳和甲烷的回收及再利用為近年來全球在淨零排放和極端氣候的共同努力目標，其中已有研究團隊成功透過化學法將二氧化碳有效轉化成乙酸，由於乙酸相較於二氧化碳較容易做為碳源給微生物再利用並進行生物轉化，本計畫希望透過代謝工程建構並優化能有效高值化乙酸的生化合成平台。在之前的研究中，我們團隊已成功利用大腸桿菌轉化基本碳源如葡萄糖與甘油進入紫色桿菌素(Violacein、Deoxyviolacein)等具備抗真菌、抗癌以及染劑潛力的高價值化合物，我們以紫色桿菌素合成菌株作為基礎，建立一個以乙酸做為主要甚至唯一碳源的生產平台，透過邏輯途徑設計(Rational Design)提高了乙酸饋入中心代謝的效率，同時我們也將 RBS Library 結合到目標質體上利用優化後的篩選方法與呈色法，成功篩選出紫色桿菌素的生產優勢株，與控制組相比產量提高了五倍同時乙酸消耗率提升了 70%。最終利用 RBS calculator 計算基因間表現的強度進行討論。本研究將有助於了解與實現乙酸和二氧化碳再利用及高值化的願景。

英文摘要

In recent years, the world has been striving for net zero emissions and combating extreme climate events by pursuing the common goal of capturing and reusing greenhouse gases such as carbon dioxide and methane. Some research teams have successfully converted carbon dioxide into acetate through chemical methods. Acetate is more readily utilized as a carbon source for microbial bioconversion than carbon dioxide, making it an ideal target for efficient and high-value bioproduction. This project aims to construct and optimize a biochemical synthesis platform that can effectively convert acetate into high-value compounds through metabolic engineering. In previous studies, our team has successfully utilized *Escherichia coli* to convert basic carbon sources such as glucose and glycerol into high-value compounds such as violacein and deoxyviolacein, which have antifungal, anticancer, and dye potential. Employing a rational design approach, we have enhanced the efficiency of acetic acid integration into central metabolism. Additionally, we have integrated an RBS Library into the target plasmid, utilizing optimized screening methodologies and colorimetric assays to select and analyze high-performing strains with improved yield. By comparison with regular RBS strain, deoxyviolacein production increased five-fold while the consumption rate of acetic acid rose by 70%. Lastly, by RBS calculator analyzing we compared each gene's expression level. This study contributes to the comprehension and realization of the vision for acetic acid and carbon dioxide reuse and high-value transformation.

壹、 研究計畫目的

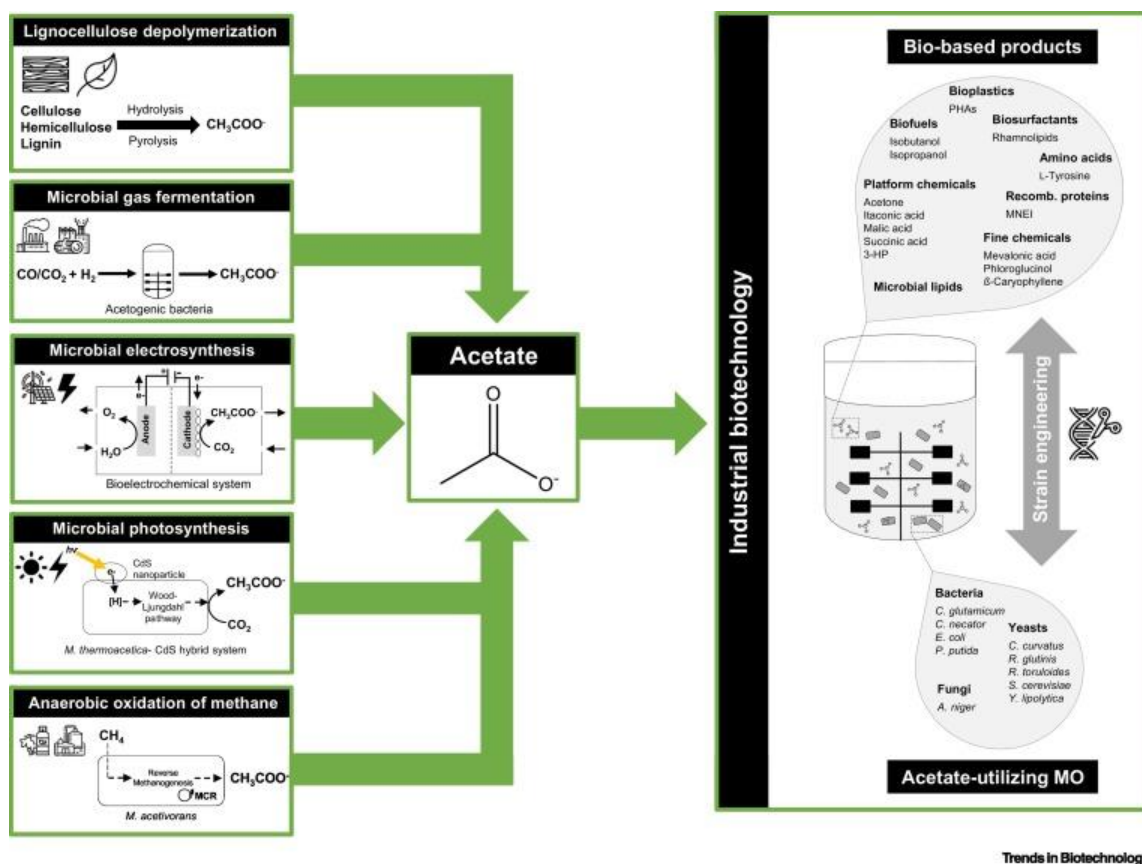
(以下文字節錄自 112 學年度清華大學碩士預口試論文: 透過呈色與生長篩選平台開發乙酸利用及碳鏈延)

開發以乙酸作為碳源之生物精煉平台

目前大多數生物技術產品都是基於含有糖或澱粉植物的碳水化合物底物的微生物轉化，例如葡萄糖或蔗糖。然而，考慮到全球人口的增長和糧食短缺，這些傳統材料主要都是透過作物例如澱粉、玉米等提煉而成，在食品和飼料工業中的競爭應用將成為未來生物產業與代謝工程所面臨的難題，因此找尋替代碳源在生物技術中更加重要。近年來許多研究團隊都將目光聚焦在開發微生物，使微生物利用其他替代碳源，其中一個例子就是乙酸，乙酸不僅存在於各式廢水處理過程中，也可藉由不同方式轉化而成(如圖一)，近年有研究團隊成功透過化學法將二氧化碳有效轉化成乙酸更是推動了乙酸再利用的研究契機。

儘管乙酸來源廣泛且可作為單獨碳源利用，但由於其毒性和轉化成其他有價值化學物質的效率較差，大多數微生物的生長受到培養基中乙酸的抑制，因此不被認為是一種良好的天然碳源[1]，為了將乙酸做為碳源必須加強其進入中心代謝的效率同時提高細胞對乙酸的耐受性[2, 3]。目前已有許多研究團隊利用各種策略做到以上成果，並透過額外表現不同基因引導乙酸碳通量到達各自目標產物，如合成可作為塑膠單體的衣康酸[4]與類固醇前驅物甲羥戊酸 mevalonate[5]等。由此可見，乙酸做為替代碳源是有相當程度的發展空間與潛力，如圖二所示，除了上述兩個例子外還可以合成出其他具有高附加價值的產物。

如同許多文獻提到[2]，建立以乙酸為碳源的生產平台時，首先需要建構能夠在乙酸培養環境下生長的菌株，提高乙酸進入細胞中心代謝的速度。我們將透過兩種不同策略去達成上述目標，分別是隨機突變(random mutagenesis)以及邏輯途徑設計(Rational Design)。



圖一 以乙酸作為碳源生產平台簡圖[2]

Organism	Bioproduct	Cultivation strategy	Maximum product concentration $C_{\max}$ [g l ⁻¹]	Product-per-substrate yield Y_{PIS} [g g ⁻¹]
Bacteria <i>E. coli</i>	Acetone	Resting cell fed-batch	6.57	0.29
	Itaconic acid	Fed-batch	3.57	0.12
	Isobutanol	Batch	0.13	0.06 ^a
	Isopropanol	Batch	1.11	0.26
	Mevalonic acid	Fed-batch	7.85	0.27
	MNEI protein	Fed-batch	0.18	0.02
	Phloroglucinol	Fed-batch	1.20	0.18
	P3HB	Batch	1.27	0.25
	P3HB4HB	Batch	1.71	0.34 ^a
	Succinic acid	Resting cell fed-batch	21.37	0.88
	Tyrosine	Batch	0.70	0.07 ^a
	3-HP	Batch	3.00	0.33 ^a
	β-Caryophyllene	Fed-batch	1.05	0.02
	Mcl-PHA	Fed-batch	0.67	0.03
	Mono-RL	Batch	0.27	0.05 ^a
<i>C. necator</i>	P3HB	Fed-batch	43.00	— ^b
Oleaginous yeasts <i>C. curvatus</i> <i>R. toruloides</i> <i>R. glutinis</i> <i>Y. lipolytica</i>	Lipids	Fed-batch	28.40	0.18
	Lipids	Batch	2.10 ^a	0.11 ^a
	Lipids	Fed-batch	35.80	0.10
	Lipids	Semicontinuous	115.00	0.16
Fungi <i>A. oryzae</i>	Malic acid	Batch	8.62	0.28

^aCalculated from given data.

^bNot determined or insufficient data available.

圖二 以乙酸作為碳源之產物與其產量[2]

乙酸做為碳源之簡介

乙酸除了上述所提到的擁有廣泛取得性外，同時具備以下特質，使得乙酸成為極具發展潛力的微生物碳源。首先，乙酸擁有極高的水溶性，生產過程中饋入高濃度甚至是純乙酸都能在培養液中達到良好的質傳，這項優勢也極大地減少生物反應器體積的稀釋。其次，當微生物消耗乙酸培養基的 pH 值會逐漸提高，培養基的 pH 值可以透過 On-Line Measurement 測量，並藉由乙酸溶液進行滴定，便能結合乙酸供給與培養基 pH 值控制。此外，相較於以葡萄糖等為基礎的碳源，乙酸是一種不具還原性的化合物。於滅菌、發酵或是合成下游產物時皆不會促使梅納反應(Maillard reaction)，同時生化工業上所使用的微生物大多都能在未開發的前提下於乙酸培養基下生長。最後，乙酸代謝不僅會產生乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA) 也會進入乙醛酸循環(Glyoxylate cycle)與三羧酸循環(TCA cycle)從而產出途徑的中間物，這些中間物都能作為高附加價值產品，如生物燃料、生物塑料、醫藥原料等的前驅物。

微生物乙酸利用機制

微生物需要透過以下步驟方能在乙酸培養基下生長，乙酸通過細胞膜進入細胞、進入細胞的乙酸激活形成乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA)，激活後的乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA)藉由乙醛酸循環(Glyoxylate cycle)與三羧酸循環(TCA cycle)轉化為用於生長與代謝的物質，下面針對各個步驟進行更詳細的討論。

細胞膜對於弱有機酸具備滲透性，乙酸主要由未解離的形式(HAc)透過被動運輸(Passive diffusion)進入細胞內膜，然而這種現象已被認定會阻礙細胞生長(會在下文進行描述)。因此許多微生物，如大腸桿菌(*Escherichia coli*)[6, 7]、谷氨酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glutamicum*)[8]藉由主動吸收(Active transport) 將解離後乙酸(Ac⁻)運輸至細胞中。

進入細胞後的乙酸，透過兩種方式，AckA-PTA 與 Acs pathway，將外源乙酸激活成中心代謝中間物乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA)，兩者皆須要消耗 ATP。儘管許多替代途徑如 ethylmalonyl-CoA[9] 與 methylaspartate pathway[10]能將乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA)以不同三羧酸循環(TCA cycle)的中間物進入三羧酸循環，乙醛酸循環(Glyoxylate cycle)仍是乙酸進入中心代謝的主要方法[11]。乙醛酸循環利用酵素的幫助避免三羧酸循環(TCA cycle)中兩個脫羧步驟，防止碳通量以 CO₂ 的形式流失，同時讓微生物生長時能將乙酸(C₂ 化合物)轉化成 C₄ 中心代謝前驅物，乙醛酸循環的酵素分別是異檸檬酸裂解(isocitrate lyase)酶與蘋果酸合酶(malate synthase)。每次的乙醛酸循環會合成出 1 當量的琥珀酸(Succinate)，琥珀酸(Succinate)進一步轉化成草酸乙酯(Oxaloacetate)作為胺基酸合成或糖質新生(Gluconeogenesis)的前驅物。糖質新生將草酸乙酯(Oxaloacetate)或蘋果酸(Malate)轉化為磷酸烯醇丙酮酸(PEP)。PEP 通過逆向糖解作用及糖質新生酵素果糖-1,6-二磷酸酶(FBPase)繞過糖解反應中不可逆步驟，最終合成出葡萄糖-6-磷酸(Glucose-6-phosphate)，以上是細胞利用乙酸生長的詳細過程。

乙酸對微生物生長的抑制

前文中提到乙酸若以未解離的形式通過細胞膜達到內膜時，會阻礙細胞的生長。接下來將對其機制進行進一步說明。在水溶液中，弱酸會透過化學平衡形成酸分子(HA)，當酸分子與水反應時會脫去其氫離子形成共軛鹼(A⁻)，同時產生氫氧離子(H₃O⁺)。乙酸(HAc)的 pK_a 值為 4.75，在中性 pH 的培養基中幾乎完全解離，但細胞膜具有半通透性(Semipermeable)，未解離的 HAc 分子可以自由地從培養基中擴散到細胞中，直至內外濃度平衡。細胞內部略為鹼性 (pH_i 介於 7.5~7.6)，其 pK_a 高於外部未解離的 HAc 分子，未達到內外濃度平衡，後者將會解離成 H⁺ 與乙酸根離子 Ac⁻ 導致細胞膜部分酸化。

乙酸對微生物生長的抑制有許多原因，主要原因包括以下機制：跨膜 pH 梯度差的解耦(uncoupling)、乙酸陰離子(Ac⁻)的累積與激活 stress 反應介入。分離 HAc 分子使細胞質酸化，會導致內外膜 pH 梯度的解耦(uncoupling) [12, 13]，這對細胞膜上的 ATP synthase (三磷酸腺苷合酶) 需要的質子動力勢(proton motive force) 形成是有害的。細胞質中乙酸陰離子(Ac⁻)累積會立即提高細胞內的滲透壓，伴隨著其他細胞內陰離子的干擾[14]，導致蛋氨酸有毒前驅物高半胱氨酸(homocysteine)在細胞內累積[15]。此外，乙酸會誘導 stress 反應相關的基因表達[16, 17]。即便不同微生物之間對乙酸的耐受度有一定的差異，0.5 g/L 以上乙酸濃度已經會影響大多數微生物的生長[18]。

透過突變篩選乙酸環境之優勢大腸桿菌株

突變是指細胞中遺傳基因發生的變化，包括單個鹼基改變所引起的點突變，以及多個鹼基的缺失、重複和插入等形式。這些變化的原因可能來自細胞分裂時遺傳基因複製錯誤、化學物質、基因毒性或外在環境改變。突變通常會導致細胞運作不正常或死亡，然而，突變也可以被視為演化的推動力，促進物種進化和適應環境的能力。

在本計畫中我們打算建構乙酸篩選平台，觀察不同大腸桿菌株在高濃度乙酸環境中的生長趨勢，期盼找出生長優勢株。我們擬定以兩種策略作為突變變因，化學物質與外在環境。先前有研究團隊展示過利用 MNNG (N-甲基 N'-硝基 N-亞硝基胍) 的全細胞突變(Whole cell mutagenesis)成功在大腸桿菌中篩選出 Vanillin 的生產優勢株，Vanillin 具備抗生物性，此抗生物性會不利細胞過量的生產 Vanillin，研究團隊通過突變提高了大腸桿菌對 Vanillin 的抗性[19]。我們團隊打算利用相同策略將突變過後的大腸桿菌培養在高濃度乙酸培養基，觀察生長曲線篩選出乙酸優勢菌株。也有研究團隊直接將目標菌株培養在高濃度乙酸環境中，利用天然環境去

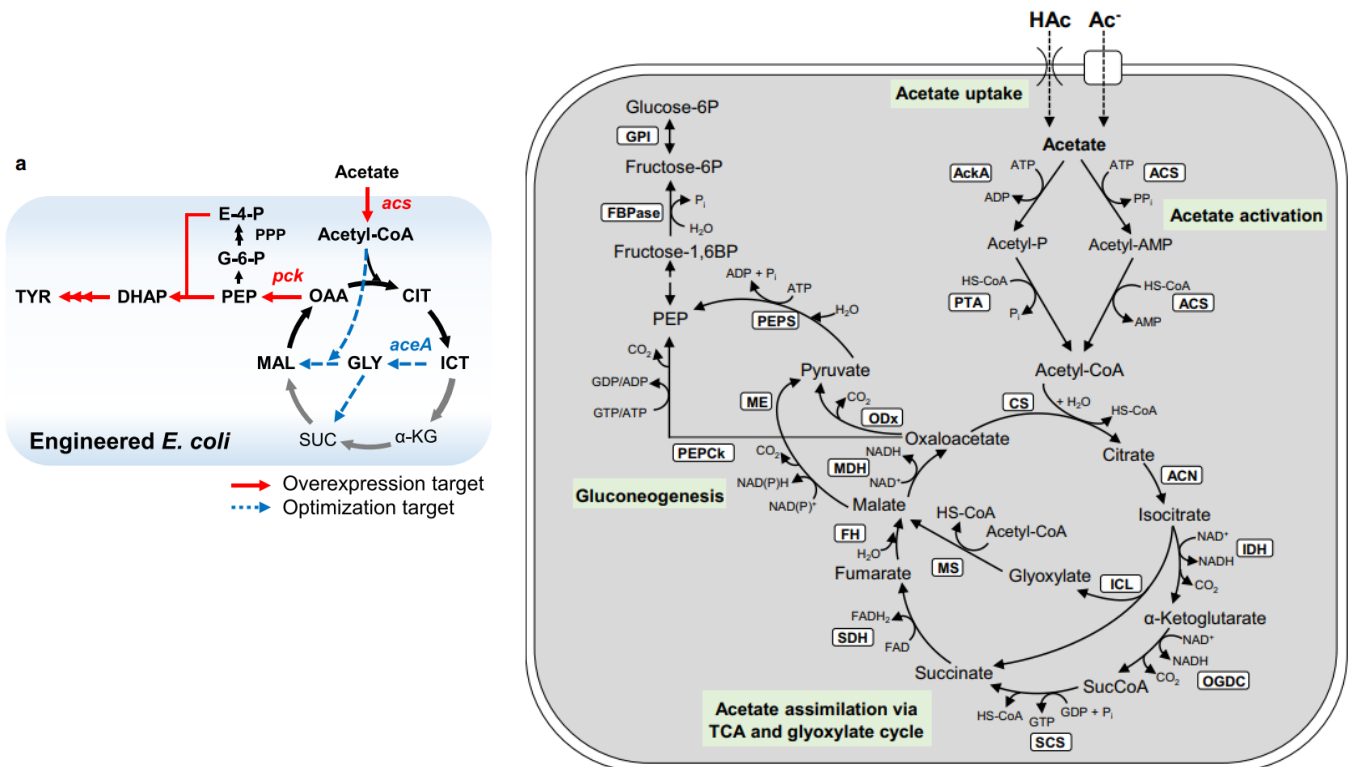
迫使細胞進行自體突變，也成功篩選出生長優勢株，與原先野生株相比提高了 25% 的生長速率 [20]。

表現基因提高乙酸進入中心代謝

乙酸在進入細胞中心代謝時，必須藉由 Acs (乙醯-CoA 合成酶) 或是 AckA 與 Pta 途徑將乙酸轉化成乙醯胺輔酶(acetyl-CoA)並進入三羧酸循環(tricarboxylic acid cycle)，但與一般代謝途徑相異，由於 Acetate 未參與醣解反應(Glycolysis)，必須透過乙醛酸循環(Glyoxylate cycle)合成出酸烯醇丙酮酸 (PEP)，回到細胞中心代謝從而恢復生長。其中 Glyoxylate shunt 除了受到 *iclR* 基因抑制外，*aceA* (異檸檬酸裂合酶)也是調控此路徑的關鍵酵素，為了能使更多 isocitrate(異檸檬酸)進入 Glyoxylate shunt，多數團隊都對以上基因進行過度表現或是剔除，也有的團隊會將 IDH 基因剔除，讓異檸檬酸鹽(Isocitrate)無法合成 α -酮戊二酸，從而提高進入乙醛酸循環(Glyoxylate cycle)的通量[4, 21, 22]。

為了有效地使用乙酸進行生化生產，可以透過提高對於目標基因的表現，優化整條路徑以增加碳通量，避免前驅物供應的短缺。已有許多團隊展示了利用額外表現基因使目標菌體提高其乙酸攝入量。其中使用乙酸高效生產酪氨酸的研究中[21, 22]，前驅物磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 及 4-磷酸麻酸醛 (E4P) 是必不可少的，研究成功透過過度表達 Acs (乙醯-CoA 合成酶) 和 *pck* (PEP 羧化酶) 來提高前驅物 PEP 的濃度。儘管途徑本身的過度表達時常由於代謝失衡而不能提高目標產物的產量，但通過調節甘醇酸循環，合理優化了路徑。最終，經過改造的菌株成功透過乙酸產生了 0.7 g/L 酪氨酸。

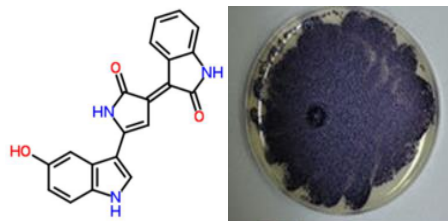
本計畫除了將嘗試上述透過突變篩選乙酸環境之優勢大腸桿菌株，也會嘗試表現與組合文獻中所提到的關鍵基因藉此提高乙酸進入中心代謝的速度，期盼能建立出以乙酸作為碳源之生產平台，並產出其他具有高價值的代謝物。



圖三 乙酸進入中心代謝途徑示意圖[21, 22]

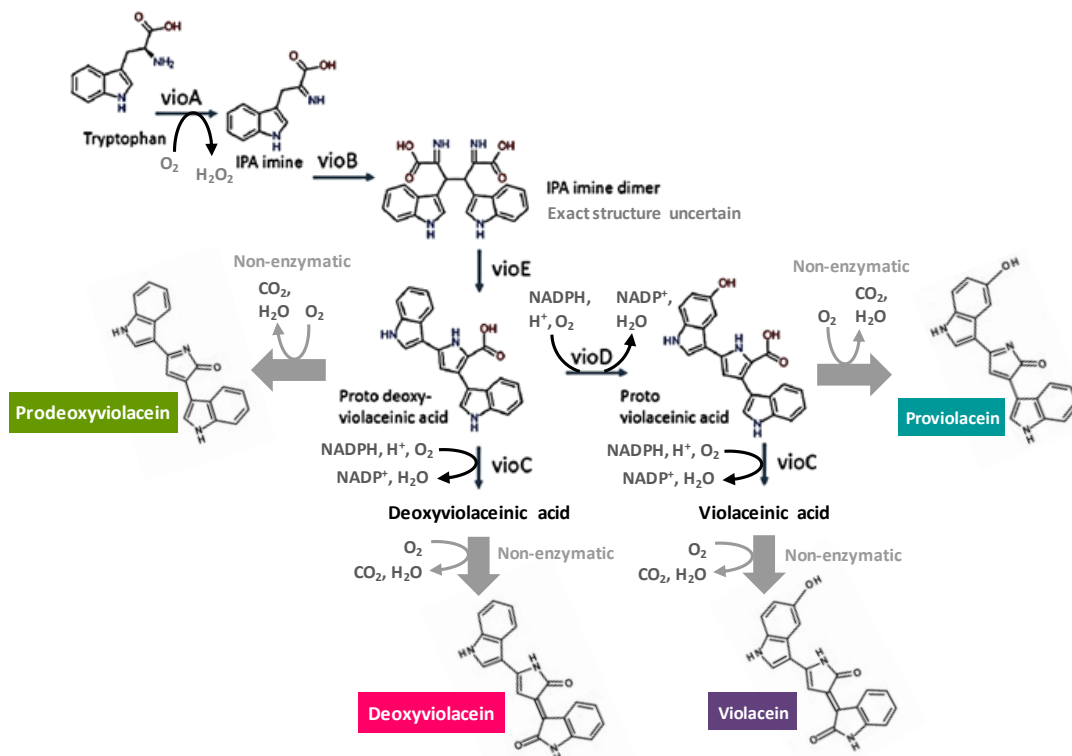
合成紫色桿菌素之微生物簡介

之前的計畫報告中提到紫色桿菌素(Violacein)為一種具有抗氧化[23]、抗生素特性的色胺酸衍生物，已被證實具抑制數種感染性微生物生長的潛力[24]。除此之外在醫療方面也被提及能成功對抗如肺癌、白血病等癌症[25]。紫色的 violacein 亦能作為染料，在經過適當條件處理後，能將包括棉、絲或化學纖維染上藍紫色。並且這些衣物上的染料同時兼具了其天然的抗菌效果[26, 27]。因上述數種特殊效用，violacein 在醫藥、化妝品及工業染料等等產業有不錯發展潛力，近年來在市場上越來越受重視[24]。



圖四 紫色桿菌素結構及外觀顏色

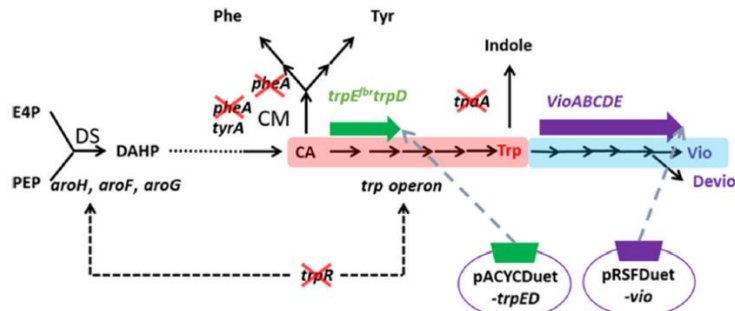
色胺酸為 violacein 的前驅物。在微生物的代謝途徑中經 *vioA*、*B*、*E*、*D* 及 *C* 的順序催化後(圖五)[28]，將兩分子的 tryptophan 合成 violacein[29]。然而除了 violacein 外，同一條代謝途徑同時也能生產出其他結構類似、具不同顏色的相關衍生物。從下圖的代謝步驟可以知道，tryptophan 一開始經過 *vioA*、*vioB* 及 *vioE* 催化後若不繼續參與反應，會行自發反應氧化成 prodeoxyviolacein。而如果接下來與 *vioC* 或 *vioD* 反應後，都能在輔因子 NADPH 的作用下朝不同產物前進。與 *vioC* 反應後能自發氧化成 deoxyviolacein；另一方面只與 *vioD* 反應可以形成 proviolacein。而先與 *vioC* 再與 *vioD* 反應則能生成 violacein。



圖五 violacein 代謝途徑

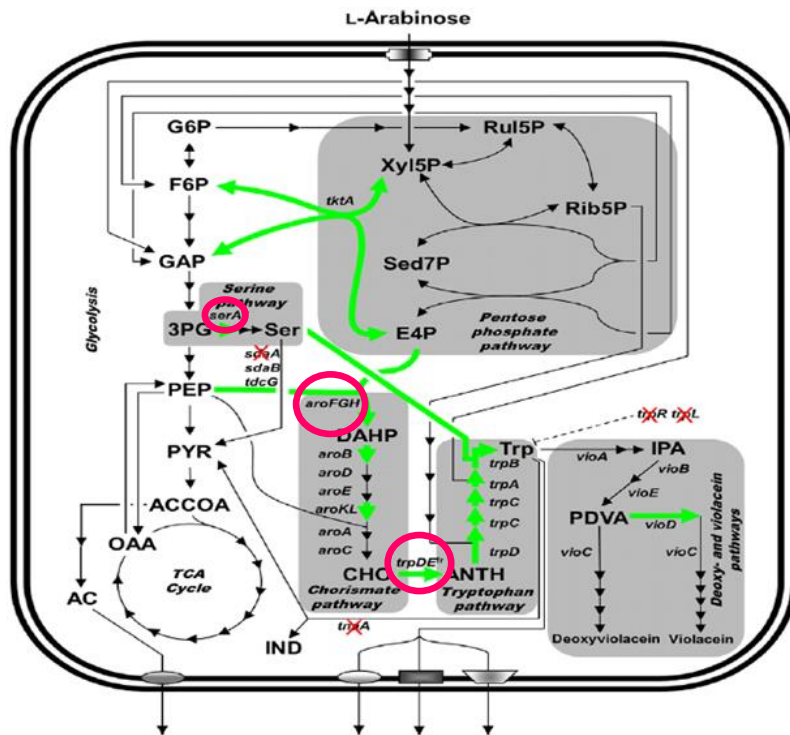
代謝工程於合成紫色桿菌素之切入點及策略

如前文所述色胺酸為 violacein 的前驅物，故增加色胺酸的供應量能提升 violacein 的產量。然而直接在培養基中添加色胺酸來合成 violacein 是比較不經濟實惠的。因此在使用 *E.coli* 生產時，大多會選擇加強其本身利用其他碳源自行合成色胺酸的能力。Fang 等人[30]將 *E.coli* 中不利於色胺酸合成的基因剔除，例如會產生 transcription repression 的基因 *trpR*、競爭其前驅物的其他胺基酸代謝途徑基因 *pheA*，以及降解途徑基因 *tnaA*。接著把利於合成的基因 *trpD* 及經過突變的 *trpE^{fbr}* 過度表現(圖六)。經過上述調整過後的 *E.coli* 能在 48 小時內利用葡萄糖生產 0.18 g/L 的色胺酸。



圖六 剔除反應以增加色胺酸產量 [30]

另一方面 Rodrigues[31]除了將上述的色胺酸抑制代謝相關基因踢除外，同時也加強了其前驅物的代謝途徑(圖七)。



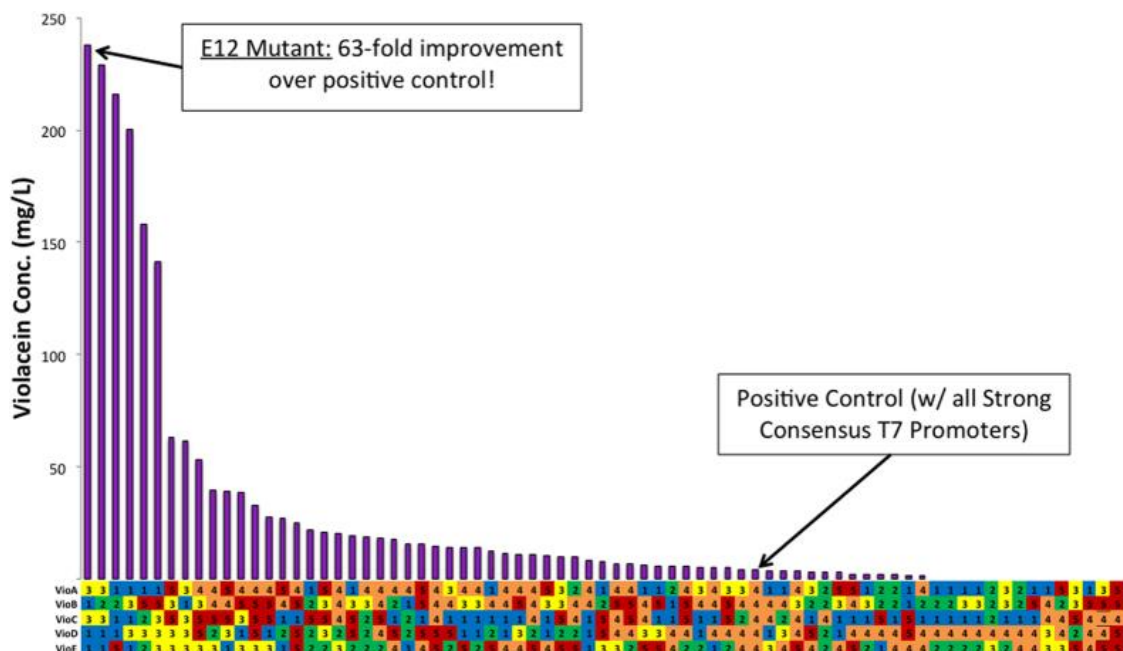
圖七 增加前驅物以提升色胺酸產量[31]。綠色箭頭表示 carbon flux 被增加的代謝途徑如圖所示，為了增加合成前驅物之一的 chorismate 的碳源量而過度表現 *tktA* 及剔除 serine 的代謝抑制基因 *sdaA*。在這兩條攸關前驅物合成路徑的加強下，他們能使大腸桿菌利用阿拉伯糖將色胺酸的產量提升二十倍。

合成紫色桿菌素之代謝負荷及代謝平衡

以往為了使微生物能將特定代謝產物的產量、生產效率最大化，常常會直觀地大量表現特定基因將代謝途徑中大部分碳源導向其前驅物。然而這樣的做法不僅會使得細胞內資源及能量，例如 ATP、NAD(P)H 等被過度消耗，也會使過多的中間產物累積在細胞內。其造成的代謝負擔 (metabolic burden) [32] 會影響微生物的生理機能，反而降低了整體的生產表現。因此重新分配、調整各代謝物，使代謝途徑之在細胞內重新回到平衡就是提升產量的關鍵因素。代謝途徑平衡 (metabolic pathway balancing) 的其中一個概念即是減少在細胞內過多累積的前驅物、中間產物，使的最終產物的轉換效率提高。對於上述概念的考量在使用微生物表現外源基因時極為重要，但即使是在表現原生基因及產物，一個平衡的代謝系統也有將產能大符提升的潛力。

代謝平衡在紫色桿菌素之應用

紫色桿菌素的代謝途徑可以生產至少四種顏色各異的產物，所以適合用來以顏色為區分，辨識及篩選有較高產量或特殊生產特性的菌株。這樣的特性使 violacein 被選為平衡代謝途徑的一個好例子。Jones 等人[33]首先將 T7 RNA 聚合酶結合點序列進行隨機突變。突變過的 T7 promoter 以螢光度進行對基因表現量的區分並篩選出了四個表現量高低有別的突變啟動子。接著配合上原本的 T7 promoter，將這五個各異的啟動子組成的 promoter library 克隆至 violacein 途徑中之基因，並以顏色挑選出產量最好的 *E.coli* 菌株。結果發現最好的產量比全是原本 T7 promoter 控制的代謝途徑成長了 63 倍。定序的結果顯示產量高之菌株其代謝途徑有很高的比例由表現較弱的突變啟動子所控制。因此再經由較弱的啟動子組成的 promoter library 篩選一次後，他們成功選出了產量又再高出四倍之菌株。他們研究再次強調了基因表現量並非與最終產量呈正相關。一個基因表現量經調整而達到平衡之代謝途徑，才能有機會因細胞內代謝負擔的減少，而有產量上的進步。



圖八 五種表現量高低有別的突變 T7 啟動子控制不同 Vio 基因所得到的 Violacein 產量[33]。

貳、執行方法及進行步驟：

本計畫目的在於利用乙酸作為生產紫色桿菌素的主要碳源，首先需要篩選出乙酸利用及適應的優勢大腸桿菌株，我們計畫以兩種不同方式進行。第一種透過演化與突變，利用化學物質 MNNG 對目標菌株進行隨機突變，將突變後的菌株培養在乙酸環境下，藉由觀察菌體生長濃度，將優勢群體擴大，最終在乙酸培養盤上塗盤並分離單一菌落。

另一方面透過合理路徑優化，我們也將額外調控關鍵基因以提高乙酸進入中心代謝的通量，如前文所述透過表現 *Acs*（乙醯-CoA 合成酶）、*Pck*（PEP 羧化酶）以及 *AceA* 並剔除 *IclR* 基因提高 Glyoxylate shunt 的通量等策略，找尋在乙酸環境下擁有最佳生長曲線的大腸桿菌株。

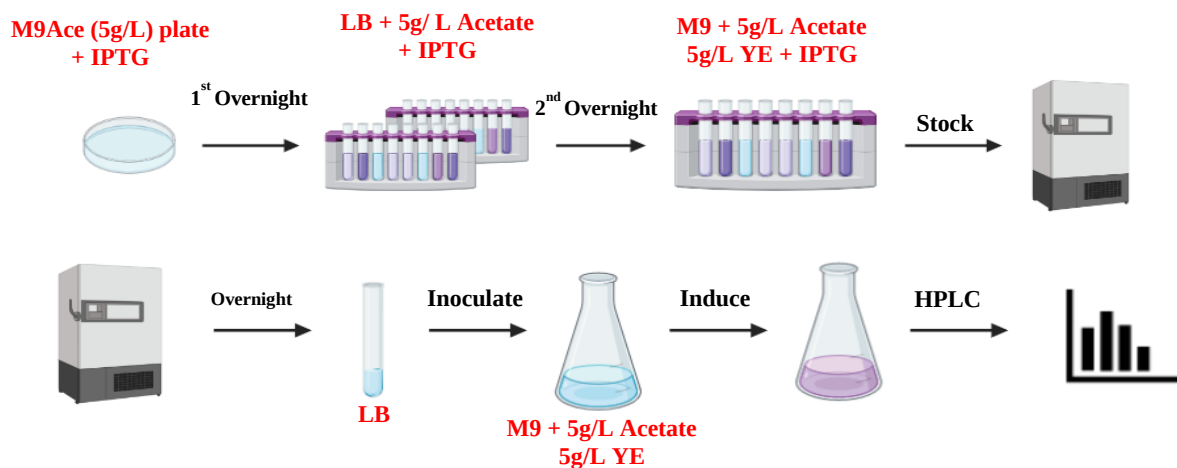
先前我們團隊已藉由在大腸桿菌 BW25113 剔除 *trpR* 以及 *tnaA* 基因成功提高了色胺酸在細胞內的含量及紫色桿菌素的合成。我們計畫利用相同策略藉由剔除乙酸生長優勢株上 *trpR* 以及 *tnaA* 基因，進而提高色胺酸的累積量，以將更多碳通量導入下游紫色桿菌素。

在成功建構可有效利用及適應乙酸的優勢大腸桿菌株後，我們將組合紫色桿菌素關鍵合成基因進入乙酸生長優勢株，並饋入乙酸進行目標產物紫色桿菌素的合成，得到初步結果後再利用 RBS library 調控多重基因間之表現強度，期盼能將代謝途徑壓力最小化，以將乙酸轉化進入大量的紫色桿菌素。我們將利用 Violacein 與 Deoxyviolacein 紫色與紫紅色的色澤直接判斷產量的多寡，以培養盤菌落呈色法來檢視是否代謝途徑達到平衡並提升產量，當用 RBS library 來控制紫色桿菌素與乙酸攝取相關基因的表現時，能以高通量(high throughput)的方式用顏色篩選出因基因表現量達到平衡後產量得以提升的菌株。

(以下文字節錄自 112 學年度清華大學碩士預口試論文: 透過呈色與生長篩選平台開發乙酸利用及碳鏈延)

Deoxyviolacein 生產菌株篩選流程

經移植含 RBS Library 質體之菌液塗在添加 5g/L 乙酸與 0.1mM IPTG 的 M9 agar 培養盤上，生長成菌落後透過呈色法挑選顏色較深之菌株，接種於 2 mL 添加 5g/L 乙酸、0.1mM IPTG 與適當濃度之抗生素(50µg/mL kanamycin、50µg/mL spectinomycin 與 50µg/mL chloramphenicol) 的 LB medium 中，以 37°C、250 rpm 培養，隔天將生長之種菌以 1%比例接種至 2 mL 添加 5g/L 乙酸、酵母菌萃取液的 M9 medium 中、加入適當濃度之抗生素及 0.1mM IPTG 之試管內，隔天將生長之種菌進行挑選，留下顏色較深之菌液，並將已篩選之菌株保存於-80°C 之甘油保存管中。將保存好的菌株接種在 LB medium 中進行培養，第二天將其轉移到 M9-YE-Ace medium 中，進行為期兩天的生產實驗並分析其產物，過程如圖九所示。



圖九 Deoxyviolacein 生產菌株之篩選流程圖

Deoxyviolacein 及相關產物生產實驗

含有紫色桿菌素途徑基因之種菌由-80°C 之甘油保存管或 LB agar 培養盤上的單一菌落，接種於含有 2 mL LB broth 與適當濃度抗生素(50µg/mL kanamycin、50µg/mL spectinomycin 與 50µg/mL chloramphenicol)的試管內並以溫度 37°C、轉速 250 rpm 培養 16~18 小時。隔天將生長之種菌以 1%的比例接種至 M9-YE-Ace medium、M9-YE medium、TB-Ace medium 或 TB medium 中並以溫度 37°C、轉速 250 rpm 進行培養。我們選擇在接種完約 2.5~4 小時加入 0.1 mM IPTG 進行誘導並以溫度 30°C、轉速 250 rpm 進行生產，於 24 小時之後進行取樣。

M9-YE medium 中含有 5g/L yeast extract、12.8g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3g/L KH_2PO_4 、0.5g/L NaCl、1g/L NH_4Cl 、1mM MgSO_4 、1mg/L vitamin B1、0.1mM CaCl_2 以及 1000x trace metal mix A5，其中 trace metal mix A5 的組成為 2.86g/L H_3BO_3 、1.81g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.222g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.079g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 0.049g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

TB medium 中含有 12g/L tryptone、2.4g/L yeast extract、0.017 M KH_2PO_4 以及 0.072 M K_2HPO_4 。以上兩種培養基皆會加入乙酸作為碳源，分別為 M9-YE-Ace medium 與 TB-Ace medium。並添加適當濃度之抗生素(50µg/mL kanamycin、50µg/mL spectinomycin 與 50µg/mL chloramphenicol)。

產物與分析方法

含產物紫色桿菌素之菌液經過轉速 13300 rpm 離心十分鐘，移除上清液之後，加入 1mL 之乙醇懸浮菌體，並將含懸浮物之溶液加至事先已填裝好 1mL 之 glass bead 破菌管進行破菌萃取 (MiniBeadBeater-16, model 607)。經過 2 輪 1 分鐘的破菌並以轉速 13300 rpm 離心十五分鐘後即可得到含紫色桿菌素之萃取液。我們使用液相層析儀(HPLC)做萃取液的分析計算，分析產物 deoxyviolacein 的 HPLC 機型為 SHIMADZU LC-2030C 3D PLUS、管柱為 InertSustain C18 column、移動相組成為 75% MeOH 及 25% H_2O 、流速為 1mL/min 以及管柱溫度 25 °C。Deoxyviolacein 在光譜上的吸收值為 563 nm，並以波峰面積推算產物之產量。

乙酸則將菌液經過轉速 13300 rpm 離心 10 分鐘後，抽取上清液並以液相層析儀(HPLC)進行產物之分析與計算，機型為 Agilent 1260 infinity、管柱為 Agilent Hi-Plex H column、移動相為 5 mM H_2SO_4 、流速為 0.6 mL/min 以及管柱溫度 50 °C，以波峰面積推算產物之產量。

細胞乾重則收集 2 mL 生產之菌液，經過轉速 13300 rpm 離心十五分鐘並去除上清液之後，放置於 50 °C烘箱進行烘乾，於 48 小時後秤重以得細胞乾重。

基因剔除方法

從 Keio collection 菌株庫中選定目標基因已被剔除之菌株，而該菌株中之基因已被兩端帶有 FRT(Flp recombination target)序列之 kanamycin 抗生素基因序列片段所取代，接著將該菌株藉由噬菌體(bacteriophages)感染以隨機剪切基因組序列後可得到溶菌液(lysate)，基因組剪切片段中可能含有部分與目標基因同源片段之 kanamycin 抗生素基因片段，之後利用溶菌液感染欲剔除目標基因之宿主，可透過同源互換將宿主之欲剔除目標基因替換為 kanamycin 抗生素基因片段，最後將溫度敏感質體 pCP20 植入上述宿主中，使其能夠將 kanamycin 抗生素基因自宿主中剔除，並將培養溫度提高溫度至 42 °C 使 pCP20 失活即完成基因之剔除。

RBS Library 之建立方法

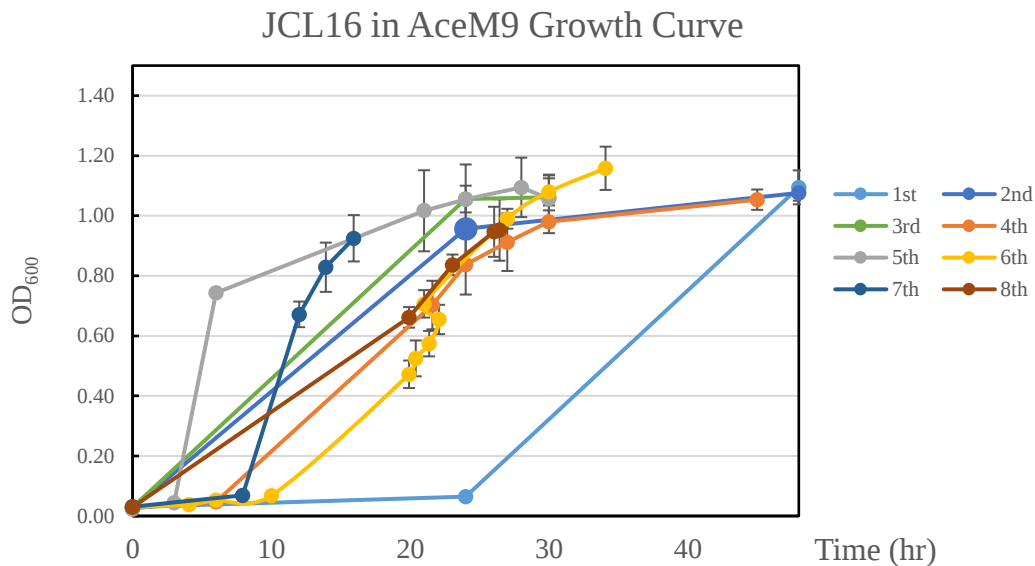
向 IDT 訂購並合成帶有隨機 RBS 序列之引子，利用其引子進行紫色桿菌素基因之 PCR，再藉由 Gibson Assembly 方法後即可得到含有隨機 RBS 序列的紫色桿菌素基因質體，接著將質體植入宿主中並以菌落數目確認其轉植效率及序列庫涵蓋範圍大小，最後透過 *E.coli* XL-1 Blue 將建構完成之 Library 質體進行放大。

參、主要發現與結果：

(以下文字節錄自 112 學年度清華大學碩士預口試論文: 透過呈色與生長篩選平台開發乙酸利用及碳鏈延)

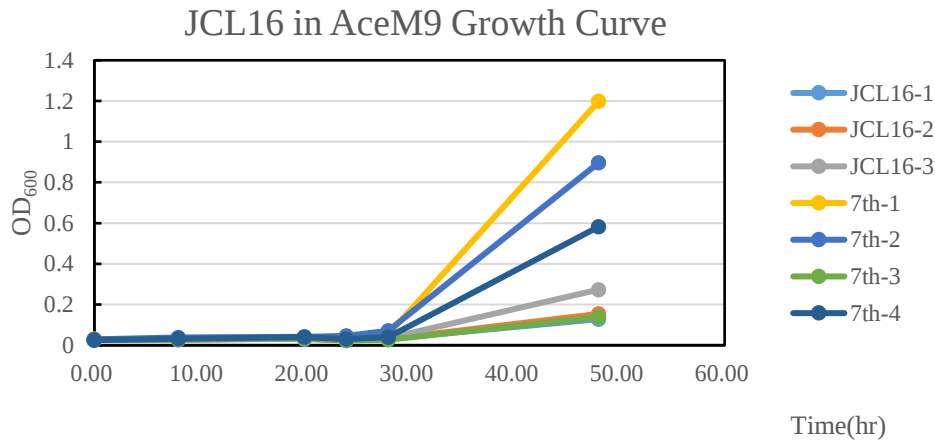
透過環境突變篩選出乙酸優勢株

我們將大腸桿菌 JCL16 (WT *lacIq*+) 培養在加入 10 g/L 乙酸的 M9 培養液中(以下簡稱為 AceM9)，並透過 OD₆₀₀ 測量細胞在培養基中的生長情況。在 OD₆₀₀ 接近 1 時，將菌液轉植至相同的培養基並將 OD₆₀₀ 控制在 0.03，繼續測量其子代的生長曲線，將生長曲線進行疊圖，生成圖十。



圖十 原生株與演化子代在乙酸溶液的生長曲線
(1st 為 JCL16 原生株，2nd ~ 8th 為第二至第八子代。
JCL16 為 BW25113 with *lacI^q* provided on F')

觀察圖十，我們發現大腸桿菌 JCL16 原先在 AceM9 培養液中的 log time 超過一天，但子代的 log time 有逐漸下降的趨勢，我們推測可能是大腸桿菌 JCL16 在 AceM9 培養基的環境下產生突變，部分突變的菌株在乙酸環境下具備生長優勢。在數個子代後可以發現與起始的 log time 有明顯的進步。然而當我們將子代凍入 -80°C 冰箱並重新與大腸桿菌原生株 JCL16 進行比較時卻發現兩者有相近的 log time，如圖十一，突變後的菌株在乙酸環境下並不穩定，同時考量到自然突變過於隨機對於後續深入討論較為困難，我們認為利用環境去演化大腸桿菌並非良好的策略。因此我們趨向使用邏輯途徑設計(Rational Design)，提高乙酸激活成中心代謝物乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA) 的效率，同時組合紫色桿菌素中 deoxyviolacein 關鍵合成基因 *vioABEC/trpED*，企圖以乙酸作為主要碳源合成出紫色桿菌素中 deoxyviolacein。

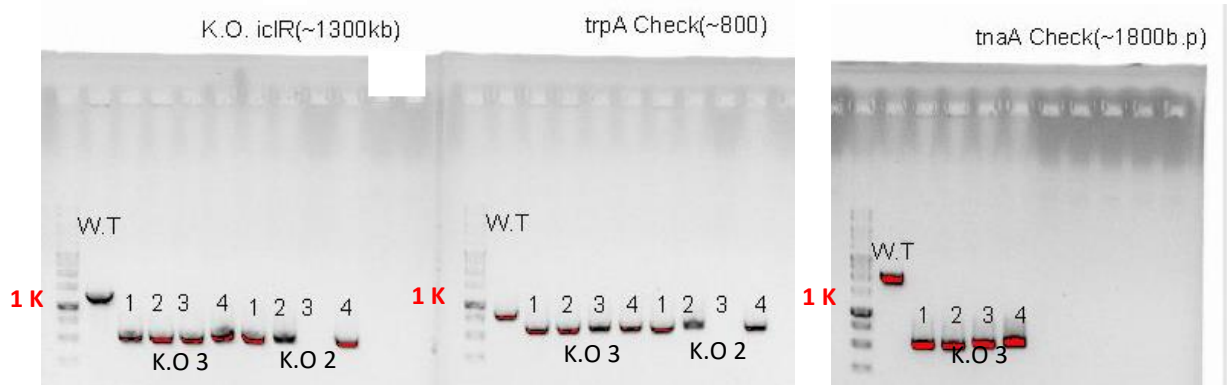


圖十一 保存於-80°C 的演化菌株與原生株生長比較

(7th 為演化後的第七子代並保存於-80°C，JCL16 為原生菌株，-1、-2、-3、-4 為四重複)

剔除抑制基因

在先前的研究中，我們成功地從大腸桿菌 BW25113 中剔除了 *trpR* 和 *tnaA* 這兩個與色胺酸轉錄調控及降解的相關基因。這使得細菌能夠在體內合成並積累紫色桿菌素的前驅物，色胺酸。為了進一步提高細胞將乙酸透過 Glyoxylate shunt 饋入中心代謝的效率，我們決定將 Glyoxylate shunt 的抑制基因 *iclR* 進行剔除。



圖十二 BW25113 $\Delta trpR \Delta tnaA \Delta iclR$ 與 BW25113 $\Delta trpR \Delta iclR$ 之凝膠電泳圖

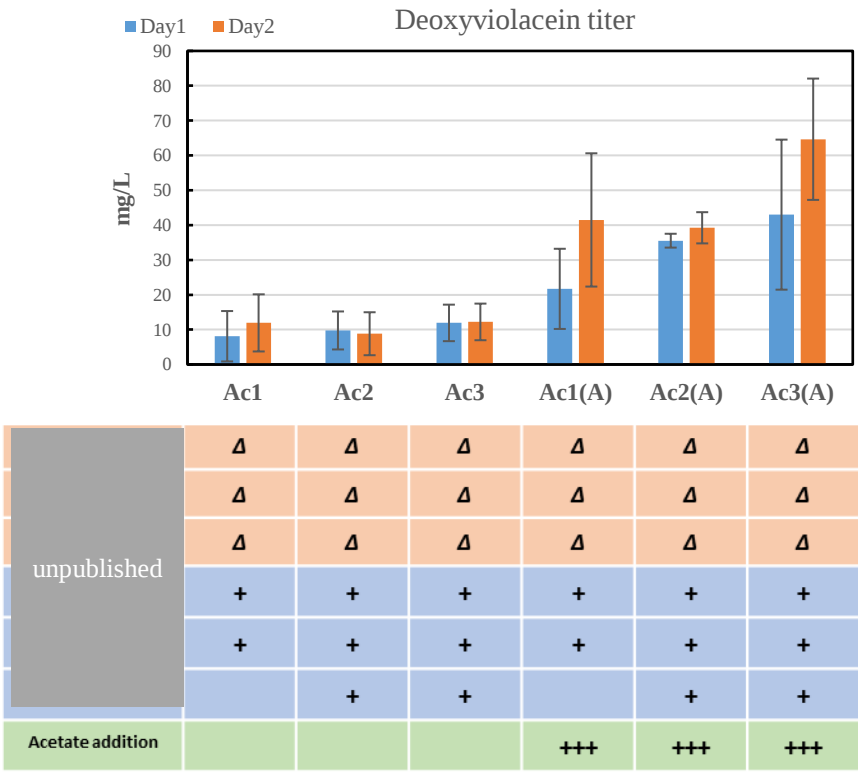
(左為剔除 *iclR*、中為確認 *trpA* 是否仍為剔除、右為確認 *tnaA* 是否仍為剔除)

我們成功地建構了兩種不同的基因剔除組合，分別為剔除了 *trpR*、*tnaA*、*iclR* 的 BW25113 (簡稱為 K.O 3) 和剔除了 *trpR*、*iclR* 的 BW25113 (簡稱為 K.O 2)。在圖十二中，我們展示了同源互換後的 cPCR 結果，觀察圖十二，我們可以清楚地看到 1 和 2 均成功地從基因中剔除了 *iclR* (大約 750bp)，僅保留了約 350bp 的 DNA 片段 (這些片段是設計在基因骨架上的引子)。同時在剔除 *iclR* 的過程中 *trpR* 與 *tnaA* 在基因上仍為剔除。

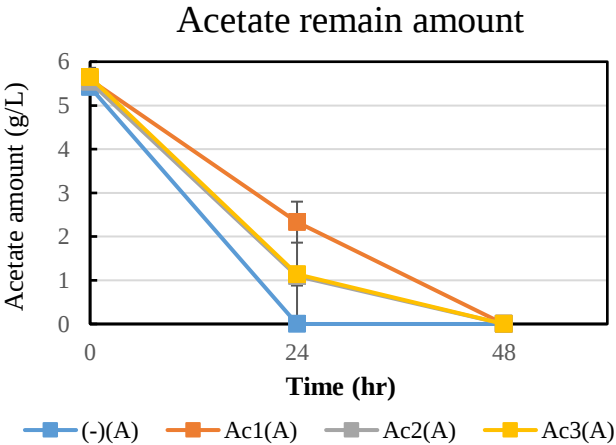
表現 Acs 生產測試

首先，我們測試 Acs (Acetyl-CoA 合成酶) 對產量的影響，我們將 pABE，pvioC 與 pHR02 植入先前的 BW25113 K.O 3 中得到 Ac1；pABE，pPK001 與 pHR02 植入先前的 BW25113 K.O 3 中得到 Ac2；pABE，pPK002 與 pHR02 植入先前的 BW25113 K.O 3 中得到 Ac3。將上述三個

質體組合與控制組 BW25113 K.O 3 分別在 M9-YE 與 M9-YE-Ace(本次實驗加入的 YE 與乙酸濃度皆為 5g/L)，進行兩天的生產測試並分析產物(圖十三與圖十四)。可以觀察到添加乙酸的實驗組均比未添加者產出更多產物。針對乙酸進行分析，我們發現未表現 Acetyl-CoA 合成酶的 Ac1 消耗最少乙酸，對比其他實驗組在生產 24 小時後幾乎將乙酸消耗完畢，為了確保生產過程中碳源不會短缺，我們將會在後續的實驗在 24 與 48 小時添加乙酸。



圖十三 表現 Acs 生產測試 Deoxyviolacein 產量
(下方圖表說明剔除基因(橘色)；表現基因(藍色)；乙酸添加(綠色，加號表示有添加))

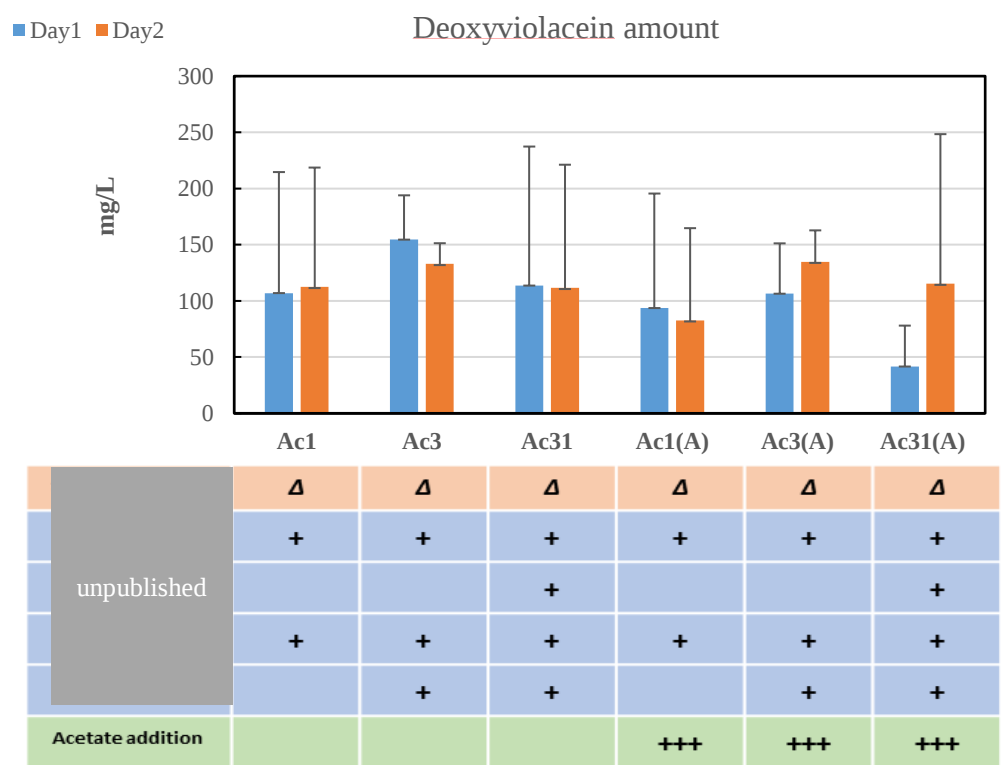


圖十四 表現 Acs 生產測試乙酸殘留濃度
(-)為 BW25113 knock out empty strain)

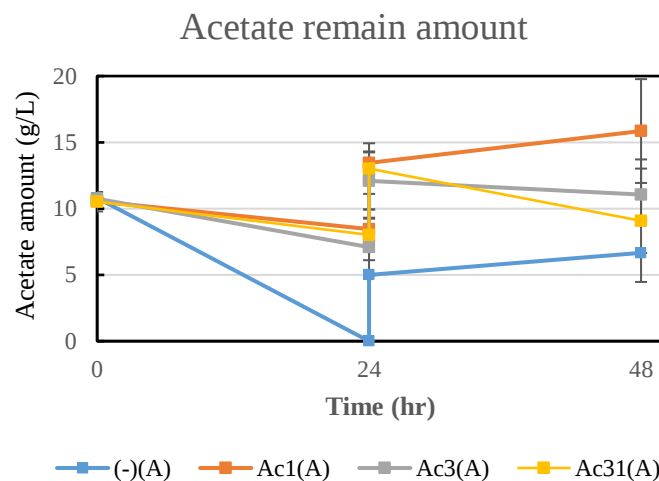
增加色胺酸通量生產測試

為了提高細胞使用乙酸合成 deoxyviolacein 的效率，除了提高乙酸進入中心代謝的速度外我們也可以增加色胺酸的通量，提升 deoxyviolacein 的產量。我們在 trpD、trpE 的基礎下額外選

擇了 aroG 與 serA 進行生產測試，將 pABE，pPK002 與 pHR01 植入先前的 BW25113 K.O 3 中得到 Ac31，與 Ac1、Ac3 以及控制組 BW25113 K.O 3 分別在 TB 與 TB-Ace (acetate 濃度皆為 10g/L)，進行兩天的生產測試並分析產物(圖十五與圖十六)。觀察圖表可以發現額外表現 aroG 與 serA 的 Ac31 平均產量並沒有提升，可能跟表現過多基因導致表現強度難以調控有關，因次我們選擇使用 Ac3 進行之後的優化與測試。本次實驗發現未添加乙酸的實驗組與額外添加乙酸實驗組有相近的產量，並未觀察到像第一次生產測試時明顯的產量差距，此外 24 小時後培養基中仍殘餘不少乙酸，我們推測可能是含有大量碳源的 TB medium 過於營養，大腸桿菌在生長或合成產物時不會優先選擇乙酸作為碳源，導致較高的乙酸殘留，針對培養基我們認為起始的乙酸濃度過高導致大腸桿菌生長受到抑制進而影響了 deoxyviolacein 的產量，因此在往後的測試中我們所使用的培養基會以 M9-YE 並添加少量的 acetate，確保大腸桿菌能以乙酸作為主要碳源的同時不去抑制其生長。



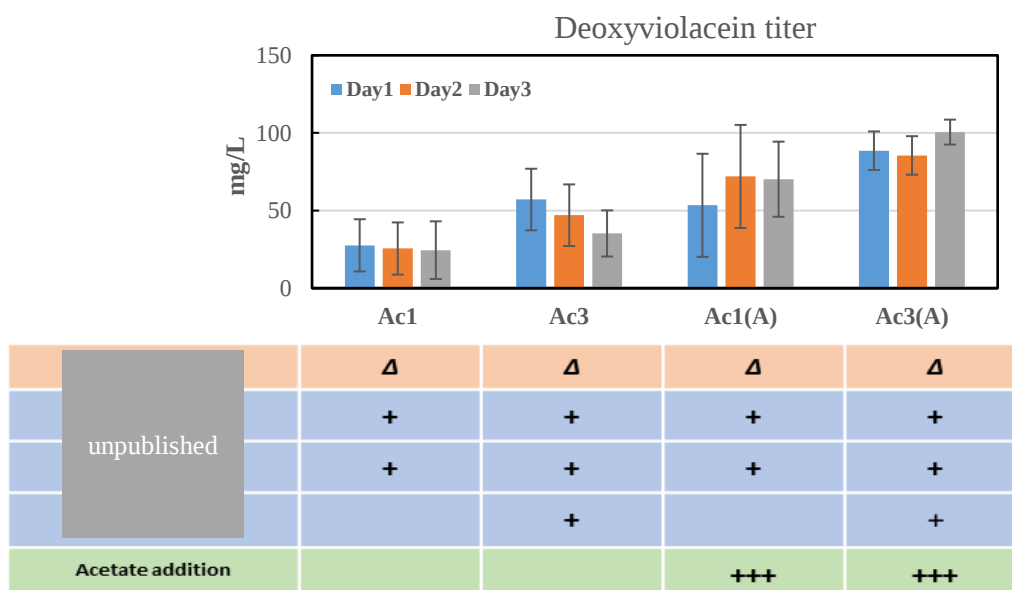
圖十五 增加色胺酸通量生產測試 deoxyviolacein 產量
(下方圖表說明剔除基因(橘色)；表現基因(藍色)；乙酸添加(綠色，加號表示有添加))



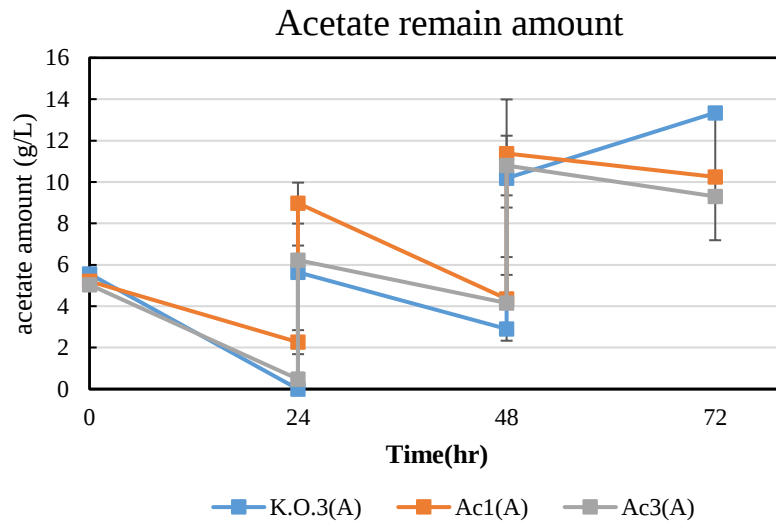
圖十六增加色胺酸通量生產測試乙酸殘留濃度
(-)為 BW25113 knock out empty strain)

最終生產測試

鑒於前兩次初步的生長測試，我們決定使用 M9-YE medium 作為合成產物的環境溶液，將乙酸的添加濃度調整為 5g/L 同時提高 YE (酵母萃取物)的比例至 10 g/L，並在每 24 小時進行碳源的補充(添加 5g/L 的乙酸)，使菌體能以乙酸作為主要碳源的同時又不會因過量的乙酸而抑制生長，我們將 pABE，pPK001 與 pHR02 植入先前的 BW25113 K.O 3 中得到 Ac1；pABE，pvioC 與 pHR02 植入先前的 BW25113 K.O 3 中得到 Ac3 以及控制組 BW25113 K.O 3 分別在 M9-YE 與 M9-YE-Ace，進行三天的生產測試並分析產物(圖十七與圖十八)。我們發現產物的結果與先前相似，添加乙酸的實驗組有較高的產量，比較 Ac3(A)與 Ac1(A)可以發現額外表現 Acs 的菌株平均生產了更多的 deoxyviolacein，最終在第三天平均產出 100 mg/L。觀察圖十八，Ac3 在 24 小時內的乙酸消耗量多於 Ac1 我們推測與額外表現 Acs 有正相關，同時可以發現在生產第二天後細胞使用乙酸的速度大幅地降低導致乙酸在培養基累積，我們認為此現象會影響產物的生成，為此我們將使用 RBS Library 調控基因表現的能力，加上產物本身帶有顏色，透過呈色法大量篩選菌株盼能選出最佳的基因表現調控比例並對之進行更進一步的研究與討論。



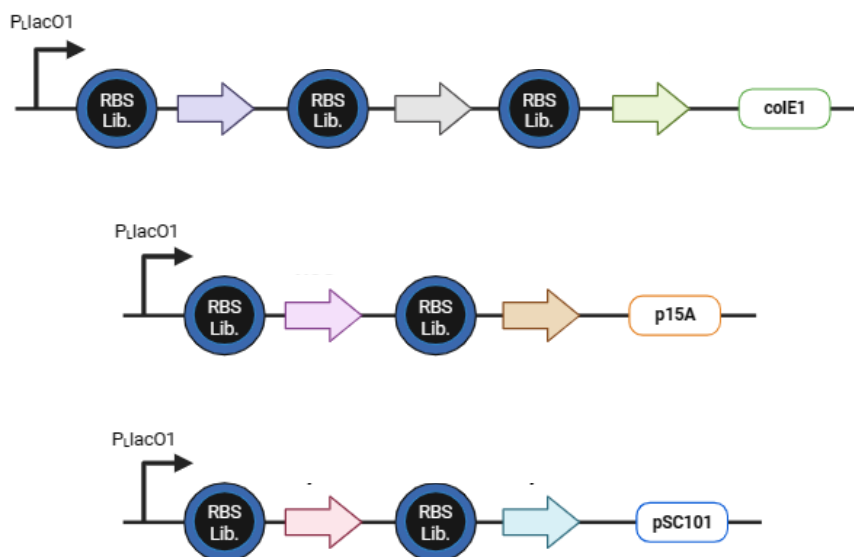
圖十七 最終生產測試 deoxyviolacein 產量
(下方圖表說明剔除基因(橘色)；表現基因(藍色)；乙酸添加(加號表示有添加))



圖十八 最終生產測試乙酸殘留濃度

建立 RBS Library 調控代謝途徑基因表現

我們將選定的 RBS Library 與色胺酸及紫色桿菌素合成途徑上之基因結合以隨機調控個基因的表現。



圖十九 不同質體之基因操作組示意圖

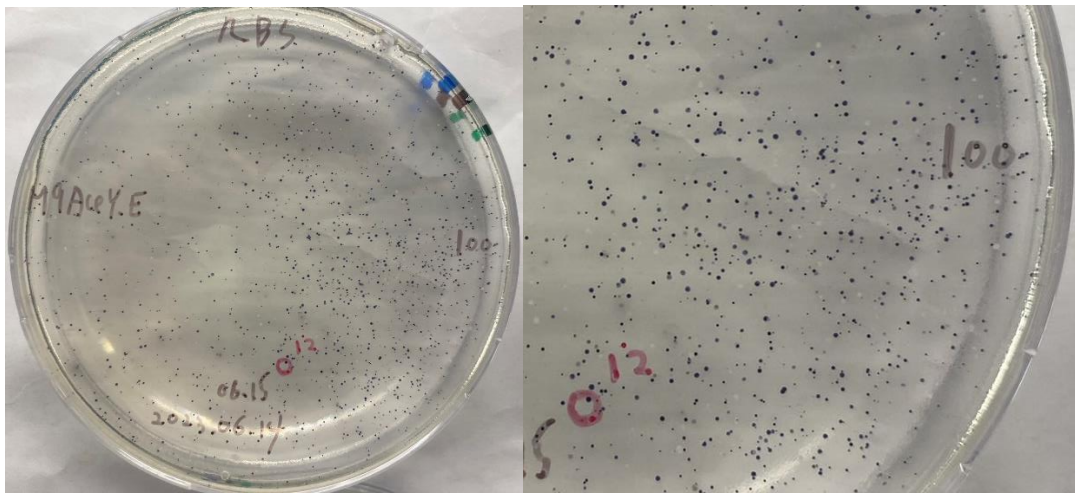
將上述三種質體植入大腸桿菌 BW25113 缺陷株後，由於有 7 種可調控 RBS 的基因，我們可以得到一個理論大小為 967 的 Library，將菌液塗在添加乙酸的 M9 培養盤並進行篩選，同時也嘗試許多篩選的優化如不同 YE 比例與生長環境溫度等。

優化篩選方式

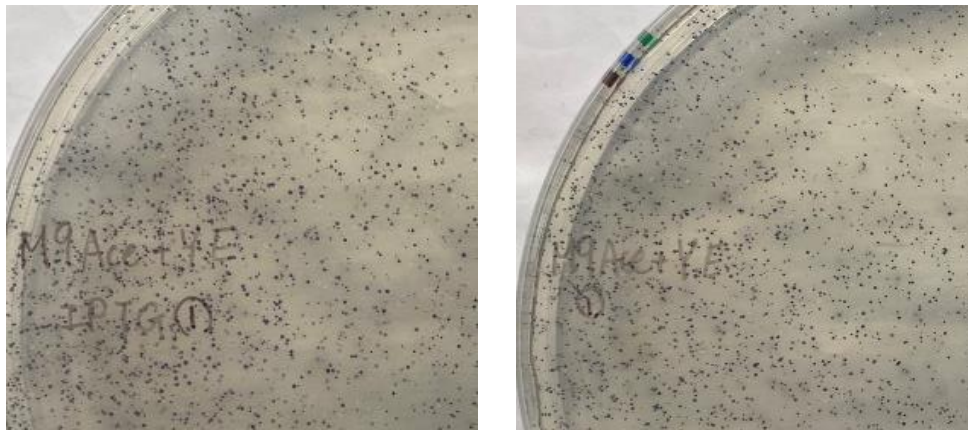
為了讓菌落在培養盤或是試管中更便於使用呈色法進行篩選，我們針對篩選方法進行測試，以下是不同步驟的優化與結果。

培養盤優化

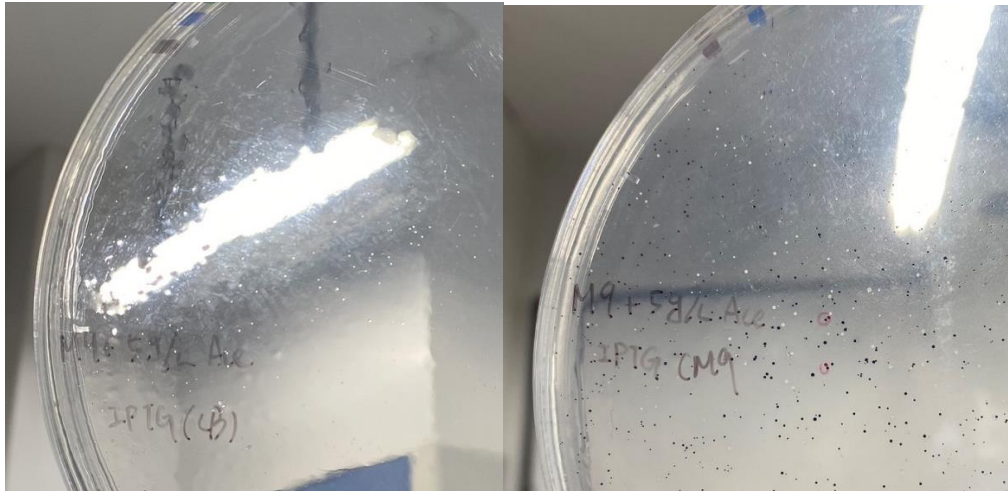
我們將建立好的 RBS Library 植入大腸桿菌並將菌液塗在添加乙酸與 YE 的 M9 agar 培養盤上，如圖二十，我們測試了有無添加誘導劑的區別，圖二十一。可以看到菌落間有明顯的呈色差異同時彼此之間呈色的速度也不同，在挑選是我們選擇顏色深同時呈色早的菌落，而添加了誘導劑培養盤上的菌落比較大更利於呈色法的挑選，此外我們也嘗試移除培養盤中的 YE，讓菌株以乙酸作為單一碳源，提高篩選的門檻，如圖二十二。如同我們預期，在缺少 YE 的培養盤，菌落得生長確實變得較慢，第一天時僅能依稀看到微小的菌落，第二天時菌落便逐漸開始呈色。



圖二十 菌落在乙酸與 YE 培養盤上的呈色
(右方照片為左方照片之局部放大)



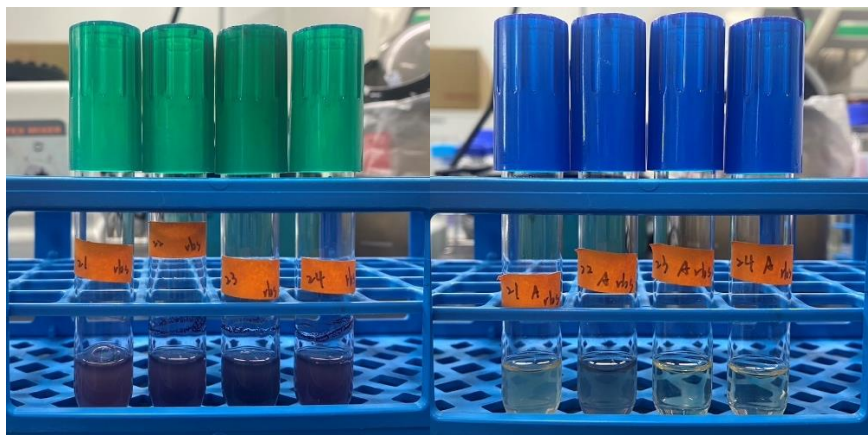
圖二十一 有無添加誘導劑時菌落在培養盤上的呈色
(照片均為局部放大，左為添加 0.1mM IPTG 作為誘導劑、右為無添加誘導劑)



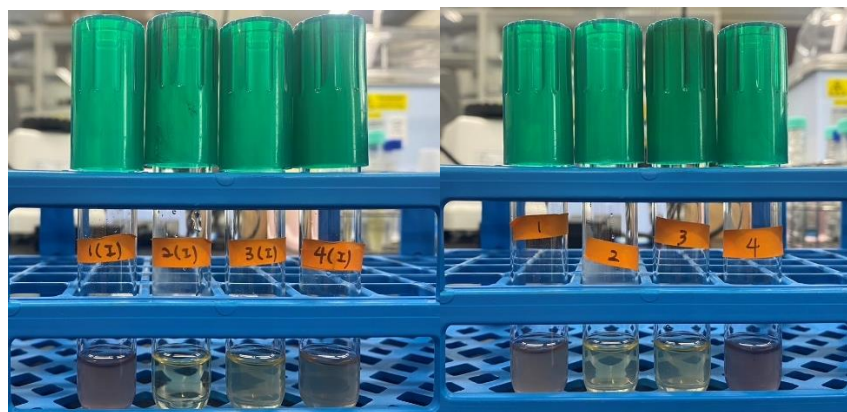
圖二十二 菌落在無添加 YE 培養盤上的呈色
(照片均為局部放大，左為塗盤後第一天，右為塗盤第二天)

篩選過程中第一次 overnight 的優化

我們將菌落轉植到添加乙酸的 LB broth 中進行第一次的 overnight 篩選，篩選過程中我們一樣嘗試了幾種變數。首先我們在 LB broth 中加入 5g/L 乙酸並以無添加乙酸的 LB medium 作為控制組，結果如圖二十三，控制組的試管在 16 小時後呈色均為深紫色而實驗組的試管可以明顯看到菌落間的差異，說明了乙酸會抑制菌株生長，藉此我們去做到菌株的篩選。同時我們也針對有無添加誘導劑進行測試，我們在實驗組中添加了 0.1mM IPTG，結果如圖二十四，可以發現添加誘導劑的試管呈色較深同時個體間顏色的差異較明顯，與無添加誘導劑相比更容易進行肉眼的篩選，綜合以上測試與優化，在之後第一次 overnight 時，我們會使用添加乙酸與 0.1mM IPTG 的 LB broth 作為培養基。



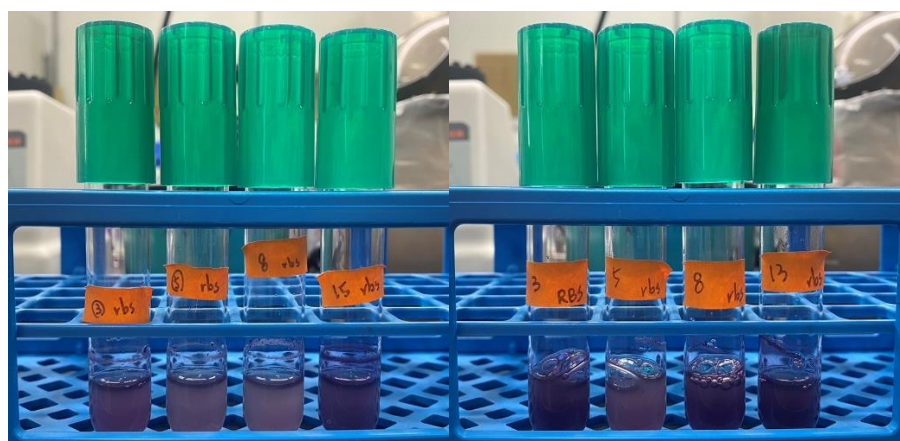
圖二十三 菌落在有無添加乙酸的 LB medium 中試管的呈色
(左為控制組 LB broth，右為實驗組添加乙酸的 LB)



圖二十四 菌落在有無誘導劑 medium 中試管的呈色
(左為添加 0.1mM IPTG 作為誘導劑，右為無添加誘導劑)

篩選過程中第二次 overnight 的優化

經過第一次 overnight 篩選試管中呈色較深的菌落後，我們將菌液轉植至添加 0.1mM IPTG 以及 5g/L 乙酸與 YE 的 M9 medium 中，在這個篩選階段我們測試了培養溫度的差異，細胞生長最佳溫度約為 37°C，然而最佳的蛋白表現與摺疊溫度則為 30°C，結果如圖二十五，可以發現在 37°C incubator 培養的試管顏色比在 30°C 環境下培養的試管較深，更容易用肉眼進行篩選，我們推測較利於細胞生長的 37 度能讓菌體較快的繁殖並達到 exponential phase，在一天的培養時間內利用較多乙酸產出較高的 deoxyvolacein 導致呈色較深，而本階段篩選的用途便是在短時間之內選出具有優勢的菌株，因次我們選擇將試管培養在 37°C 的環境，一天後利用顏色進行篩選，並將優勢菌落利用凍菌法保存在 -80°C 冰箱中。透過以上的測試與優化我們成功的建立了有效且完善的 RBS Library 篩選方法，後續則會把保存在 -80°C 的菌株進行生產測試並與控制組 regular RBS (Ac3) 進行產量的比較。



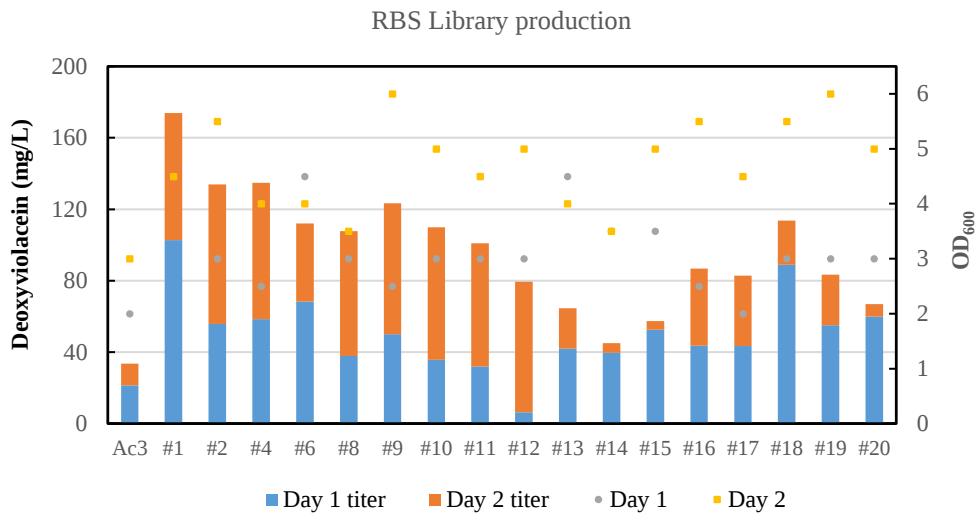
圖二十五 菌落在添加 0.1mM IPTG M9-YE-Ace 試管的呈色
(左為 30°C，右為 37°C)

以呈色法篩選具有生產潛力之菌株

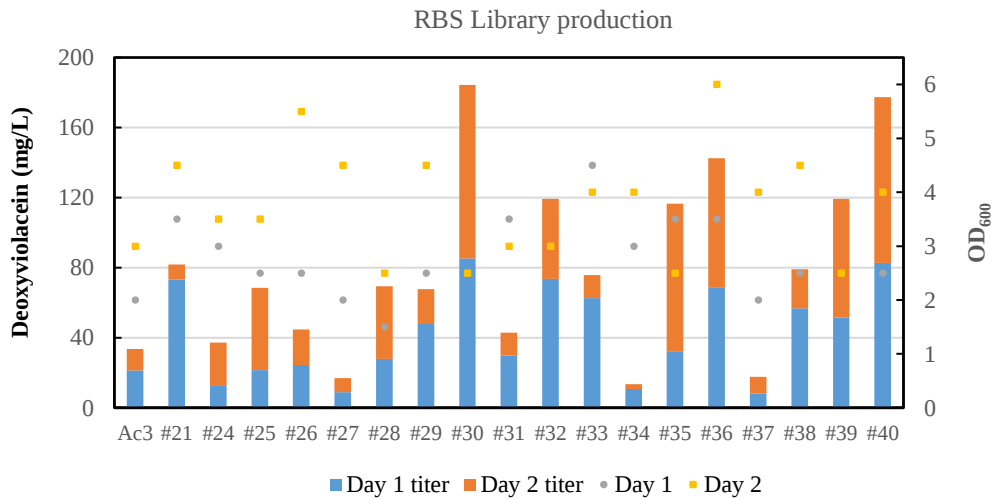
利用已建立好的 RBS Library 篩選方法，我們不斷地挑選出呈色較深的優勢菌株，進行生產測試。我們將這些菌株培養在 LB medium 中，第二天將其轉移到 M9-YE-Ace medium 中，進行為期兩天的生產實驗。在這兩天的過程中，我們在 24 小時補充一次乙酸。根據圖三十至圖三十二，我們觀察到不同菌株的產物產量以及乙酸消耗量。

將這些篩選出的菌株與控制組(Ac3)進行必較，發現產量有明顯的浮動，有少部分的菌株產量低於控制組，但大多數都比控制組產出較多的 deoxyvolacein。如#1、#2、#4、#9 等，其中#1、

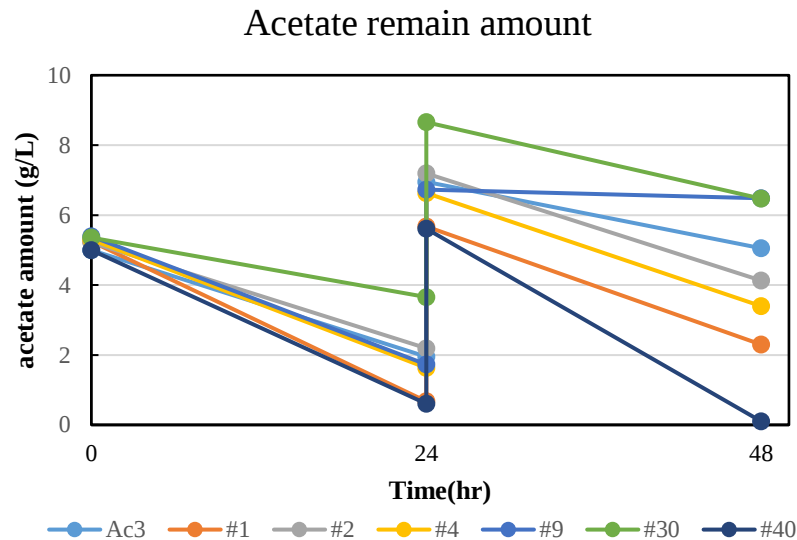
#30 以及 #40 產量提升至控制組的 5 倍。針對產量前十高的菌株，我們將其乙酸消耗量與控制組進行比對，如圖三十二，我們發現第一天的乙酸消耗量，實驗組與對照組呈現相似的情況。然而，第二天的一些實驗組（如 #1、#35、#36、#40）的乙酸消耗量明顯多於對照組，兩天的生產中乙酸消耗量提升了約 70%。我們認為這可能與 RBS Library 調整基因轉譯強度的效果有關。一些菌株在 RBS Library 的調控下，表現出較高的乙酸整體使用率亦或是更高的產物轉化率進而影響 deoxyviolacein 的產量。後續我們會使用 RBS calculator 針對 ribosome binding site 進行更深入的討論。



圖二十六 RBS library #1~#20 生產測試 deoxyviolacein 產量
(長條圖表示產量，主垂直座標軸；點座標圖為 OD₆₀₀ 值，副垂直座標軸)



圖二十七 RBS library #21~#40 生產測試 deoxyviolacein 產量
(長條圖表示產量，主垂直座標軸；點座標圖為 OD₆₀₀ 值，副垂直座標軸)



圖二十八 生產優勢株乙酸殘留濃度
(Ac3 為 regular RBS)

結論

起初我們希望透過菌株自體演化去篩選出乙酸環境優勢株，但篩選出的優勢株並不穩定，於是我們轉向利用邏輯途徑設計(Rational Design)。目前我們成功建構出能有效利用乙酸合成出 deoxyviolacein 的質體並進行初步的生產測試。接著我們利用 RBS Library 去隨機變異七個基因，改變不同基因的轉譯速率。同時為了使呈色法能夠更精確且容易判斷，我們透過優化篩選方法來改善顏色深度易達飽和之問題。利用呈色法我們對 RBS Library 進行篩選以及生產測試去觀察產量與乙酸使用效率，我們成功篩選出產量高於控制組五倍的優勢菌株，同時整體乙酸使用率提升了 70%，利用 RBS calculator 我們對生產優勢株進行分析，發現其中兩個基因需要較強的表現才能使產量提高，之後將以得到之 RBS 強弱來分析及進一步優化產能。

肆、參考資料

- Oh, M.-K., et al., *Global expression profiling of acetate-grown Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(15): p. 13175-13183.
- Kiefer, D., et al., *From acetate to bio-based products: underexploited potential for industrial biotechnology*. Trends in biotechnology, 2021. **39**(4): p. 397-411.
- Song, H.S., et al., *Enhanced isobutanol production from acetate by combinatorial overexpression of acetyl-CoA synthetase and anaplerotic enzymes in engineered Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. **115**(8): p. 1971-1978.
- Noh, M.H., et al., *Production of itaconic acid from acetate by engineering acid-tolerant Escherichia coli*. W. Biotechnology and bioengineering, 2018. **115**(3): p. 729-738.
- Xu, X., et al., *Microbial production of mevalonate by recombinant Escherichia coli using acetic acid as a carbon source*. Bioengineered, 2018. **9**(1): p. 116-123.
- Gimenez, R., et al., *The gene yjcG, cotranscribed with the gene acs, encodes an acetate permease in Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 2003. **185**(21): p. 6448-6455.
- Sá-Pessoa, J., et al., *SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in Escherichia coli*. Biochemical journal, 2013. **454**(3): p. 585-595.
- Jolkver, E., et al., *Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bacteriology, 2009. **191**(3): p. 940-948.
- Erb, T.J., et al., *Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(25): p. 10631-10636.

10. Khomyakova, M., et al., *A methylaspartate cycle in haloarchaea*. Science, 2011. **331**(6015): p. 334-337.
11. Kornberg, H. and H.A. Krebs, *Synthesis of cell constituents from C 2-units by a modified tricarboxylic acid cycle*. Nature, 1957. **179**: p. 988-991.
12. Baronofsky, J.J., W.J. Schreurs, and E.R. Kashket, *Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by Clostridium thermoaceticum*. Applied and environmental microbiology, 1984. **48**(6): p. 1134-1139.
13. Axe, D.D. and J.E. Bailey, *Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of Escherichia coli*. Biotechnology and bioengineering, 1995. **47**(1): p. 8-19.
14. Roe, A.J., et al., *Perturbation of anion balance during inhibition of growth of Escherichia coli by weak acids*. Journal of bacteriology, 1998. **180**(4): p. 767-772.
15. Roe, A.J., et al., *Inhibition of Escherichia coli growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity*. Microbiology, 2002. **148**(7): p. 2215-2222.
16. Arnold, C.N., et al., *Global analysis of Escherichia coli gene expression during the acetate-induced acid tolerance response*. Journal of bacteriology, 2001. **183**(7): p. 2178-2186.
17. Kirkpatrick, C., et al., *Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 2001. **183**(21): p. 6466-6477.
18. Trček, J., N.P. Mira, and L.R. Jarboe, *Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid*. Applied microbiology and biotechnology, 2015. **99**: p. 6215-6229.
19. Yoon, S.H., et al., *Enhanced vanillin production from recombinant E. coli using NTG mutagenesis and adsorbent resin*. Biotechnology progress, 2007. **23**(5): p. 1143-1148.
20. Rajaraman, E., *Transcriptional analysis and adaptive evolution of Escherichia coli growing on acetate*. 2012, University of Georgia.
21. Cheol Kim, S., et al., *Pathway optimization by re-design of untranslated regions for L-tyrosine production in Escherichia coli*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 13853.
22. Jo, M., et al., *Precise tuning of the glyoxylate cycle in Escherichia coli for efficient tyrosine production from acetate*. Microbial Cell Factories, 2019. **18**: p. 1-9.
23. Konzen, M., et al., *Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2006. **14**(24): p. 8307-8313.
24. Durán, M., et al., *Potential applications of violacein: a microbial pigment*. Medicinal Chemistry Research, 2012. **21**(7): p. 1524-1532.
25. Durán, N., et al., *Violacein: properties and biological activities*. Biotechnology and applied biochemistry, 2007. **48**(3): p. 127-133.
26. SHIRATA, A., et al., *Production of bluish-purple pigments by Janthinobacterium lividum isolated from the raw silk and dyeing with them*. The Journal of Sericultural Science of Japan, 1997. **66**(6): p. 377-385.
27. Shirata, A., et al., *Blue purple pigment manufacture with microorganism and applications of the pigment*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP, 1998. **10113169**.
28. Lee, M.E., et al., *Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay*. Nucleic acids research, 2013. **41**(22): p. 10668-10678.
29. Balibar, C.J. and C.T. Walsh, *In vitro biosynthesis of violacein from l-tryptophan by the enzymes VioA– E from Chromobacterium violaceum*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15444-15457.
30. Fang, M.-Y., et al., *High crude violacein production from glucose by Escherichia coli engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway*. Microbial cell factories, 2015. **14**(1): p. 8.
31. Rodrigues, A.L., et al., *Systems metabolic engineering of Escherichia coli for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein*. Metabolic engineering, 2013. **20**: p. 29-41.
32. Wu, G., et al., *Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications*. Trends in biotechnology, 2016. **34**(8): p. 652-664.
33. Jones, J.A., et al., *ePathOptimize: a combinatorial approach for transcriptional balancing of metabolic pathways*. Scientific reports, 2015. **5**: p. 11301.