

· 合成生物技术 ·

代谢工程改造大肠杆菌合成丙二酸

付雯宣^{1,2}, 李诗韵^{1,2}, 赵运英^{1,2,3}, 邓禹^{1,2,3}

1 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 江苏省生物活性产品加工工程研究中心, 江苏 无锡 214122

付雯宣, 李诗韵, 赵运英, 邓禹. 代谢工程改造大肠杆菌合成丙二酸. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2566-2580.

FU WX, LI SY, ZHAO YY, DENG Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of malonic acid. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2566-2580.

摘要: 丙二酸是一种重要的有机二元羧酸, 其应用价值遍及化工、医药、食品等领域。本文以大肠杆菌为底盘细胞, 过表达了 *ppc*、*aspC*、*panD*、*pa0132*、*yneI* 和 *pyc* 基因, 成功构建了丙二酸合成重组菌株大肠杆菌 BL21(TPP)。该菌株在摇瓶发酵条件下, 丙二酸产量达到 0.61 g/L。在 5 L 发酵罐水平, 采用间歇补料的方式丙二酸的积累量达 3.32 g/L。本研究应用了融合蛋白技术, 将 *ppc* 和 *aspC*、*pa0132* 和 *yneI* 分别进行融合表达, 构建了工程菌 BL21(SCR)。在摇瓶发酵水平, 该菌株丙二酸的积累量达到了 0.83 g/L, 较出发菌株 BL21(TPP) 提高了 36%。在 5 L 发酵罐中, 工程菌 BL21(SCR) 的丙二酸产量最高达 5.61 g/L, 较出发菌株 BL21(TPP) 提高了 69%。本研究实现了丙二酸在大肠杆菌中的生物合成, 为构建丙二酸合成的细胞工厂提供了理论依据和技术基础, 同时也对其他二元羧酸的生物合成具有启发和指导意义。

关键词: 大肠杆菌; 代谢改造; 丙二酸; 融合表达

Received: December 29, 2021; **Accepted:** March 15, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905502); National Natural Science Foundation of China (21877053); Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20181345)

Corresponding authors: ZHAO Yunying. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918312; E-mail: yunyingzhao@jiangnan.edu.cn
DENG Yu. Tel: +86-510-85329031; Fax: +86-510-85918312; E-mail: dengyu@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905502); 国家自然科学基金 (21877053); 江苏省自然科学基金 (BK20181345)

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of malonic acid

FU Wenxuan^{1,2}, LI Shiyun^{1,2}, ZHAO Yunying^{1,2,3}, DENG Yu^{1,2,3}

1 National Engineering for Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Malonic acid is an important dicarboxylic acid, which can be widely used in the fields of chemical industry, medicine and food. In this study, a recombinant *Escherichia coli* strain BL21(TPP) was constructed to synthesize malonate through overexpressing six genes of *ppc*, *aspC*, *panD*, *pa0132*, *yneI* and *pyc*. Under shake flask fermentation conditions, strain BL21(TPP) produced 0.61 g/L malonic acid. In a 5 L fermentor, the production of malonic acid reached 3.32 g/L by using an intermittent feeding strategy. Next, a recombinant strain BL21(SCR) was constructed by fusional expression of *ppc* and *aspC*, as well as *pa0132* and *yneI*, respectively. As a result, the production of malonic acid increased to 0.83 g/L at the shake flask level, which was a 36% increase over the starting strain BL21(TPP). Finally, the highest malonate production reached 5.61 g/L in a 5 L fermentor, which was a 69% increase over the starting strain BL21(TPP). Production of malonic acid by metabolically engineered *E. coli* provides a basis for further optimization, and may also serve as a reference for the biosynthesis of other dicarboxylic acids.

Keywords: *Escherichia coli*; metabolic engineering; malonic acid; fusional expression

丙二酸是一种二元羧酸，又称缩苹果酸，在自然界中以钙盐的形式存在于甜菜根中。丙二酸在世界范围内需求量巨大，被美国能源部列为可由生物质生产的前 30 种化学品之一^[1]，是非常重要的有机合成中间体。丙二酸及其酯可用于合成巴比妥、维生素 B₁、维生素 B₂，是重要的医药中间体^[2]，亦是吲哚酯等植物生长调节剂的中间体，因此在农业中常用于合成植物生长调节剂^[3]；在化工领域，丙二酸是一种具有竞争力的铝表面处理剂，加热分解生成乙酸和水。生成的乙酸能够和铝发生反应生成醋酸铝、氢气和氢气，不会造成环境污染，与甲酸等酸性处理剂相比具有很大的优势^[4]；在食品

加工领域，丙二酸及其酯是重要的食品添加剂，能提高产品的风味^[5]。目前，工业上生产丙二酸主要采用水解丙二酸二乙酯的方法^[6]，以及在氢氧化钙水溶液中水解氟乙酸钙得到丙二酸钙，再通过酸性水解获得丙二酸^[7]。然而这些合成方法具有反应过程复杂、生产成本高等缺点，因此，开发一种可行、高效、生产成本低的生产替代途径迫在眉睫。

近年来，生物法合成丙二酸逐渐走入人们的视野^[8]，研究者开始探索丙二酸生物合成途径，但由于缺乏对合适酶和代谢途径的认识，生物法合成丙二酸的研究进展缓慢。目前并未发现生产丙二酸的天然代谢途径^[9]， β -丙氨酸途

径是生物法合成丙二酸较为理想的代谢通路,该途径以 β -丙氨酸作为丙二酸的合成前体合成丙二酸^[10],为代谢合成丙二酸奠定了基础。有研究者通过 β -丙氨酸途径实现了丙二酸在大肠杆菌中的生物合成,最终通过发酵优化使重组菌株在 5 L 发酵罐的产量达到 3.6 g/L^[8],证明了生物合成丙二酸具有可行性。但目前关于丙二酸生物合成的研究还处于初级阶段,丙二酸的产量有待进一步的提高。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是公认的已经被充分研究的模式生物,其含有的大部分蛋白酶也都被深入地研究^[11]。由于其清晰的遗传背景、繁殖速度快以及成熟的基因改造技术,大肠杆菌是备受研究者青睐的基因工程菌。随着分子酶工程学的不断发展,酶融合技术已经被广泛用于代谢工程实验中,是近年来的研究热点之一^[12]。在合成生物学方面,该技术可通过减少底物的损失和中间体的积累提高终产物的产量;还可以利用抗原抗体特异性结合的原理,在宿主菌株中表达支架蛋白以实现酶的共定位。Tippmann 等的研究中运用了该方法,使大肠杆菌中聚羟基丁酸酯的产量提高了 7 倍^[13]。Dueber 等运用融合蛋白技术优化合成酶的比例,减少了细胞的代谢负担,从而使产物的滴度提高了 77 倍^[14],这说明酶融合技术应用前景广阔,在代谢合成领域极具应用价值。

本研究为了降低生产成本,提高研究的商业价值,所有质粒选用的均是组成型表达载体。本研究首先过表达大肠杆菌 BL21(DE3) 来源的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (*ppc*)、天冬氨酸转氨酶 (*aspC*)、天冬氨酸- α -脱羧酶 (*panD*) 基因,同时引入铜绿假单胞菌来源的 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶 (*pa0132*) 基因、大肠杆菌 K12 来源的琥珀酸半醛脱氢酶 (*yneI*) 基因,获得重组菌 BL21(TP)。为了进一步提高丙二酸产量,本

研究设计了两种实验方案:(1) 用 CRISPR/Cas9 技术敲除竞争途径的 *pykA* 基因,阻碍碳源进入 TCA 循环,重组菌命名为 BL21 Δ *pykA*(TP);(2) 过表达谷氨酸棒杆菌来源的丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 基因,通过增强草酰乙酸的供给提高丙二酸产量,获得的重组菌命名为 BL21(TPP),并通过 SDS-PAGE 验证途径中 6 个酶是否表达。在摇瓶水平和 5 L 发酵罐水平对 BL21(TPP) 菌株进行发酵优化,最后将 *yneI*、*pa0132* 和 *ppc*、*aspC* 分别进行融合表达。最终,本研究实现了大肠杆菌中丙二酸的生物合成,为后续生物合成丙二酸的研究提供了技术基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

表 1 为菌株及相关介绍;表 2 为质粒及相关介绍。

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10; SOB 培养基 (g/L): 蛋白胨 20, 酵母粉 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.47, NaCl 0.5, KCl 0.186; 固体培养基需添加 2.5% 的琼脂粉,添加的抗菌素终浓度为 1 mmol/L。

1.1.2 引物

本研究所有引物均由天霖生物公司合成,如表 3 所示。

1.1.3 主要试剂

DNA 聚合酶及 Marker 购自 TaKaRa 公司; MultiF Seamless Assembly Mix 重组酶购自 ABclonal 公司; DNA 纯化及质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 重组质粒的构建

为了在大肠杆菌中构建丙二酸生物合成途径,本研究过表达了大肠杆菌 BL21(DE3) 来源的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (*ppc*)、天冬氨酸

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

<i>E. coli</i> strains	Characteristics	Sources
JM109	For plasmid construction	Lab store
BL21(DE3)	For expressing genes	Lab store
MG1655(K12)	For expressing genes	Lab store
DH5 α	For expressing genes	Lab store
BL21(TPP)	BL21(DE3) carrying pCDF-ppc-aspC, pTrc99A- <i>pyc</i> -panD and pRSF- <i>yneI</i> -pa0132	This study
BL21(SCR)	BL21(DE3) carrying pCDF-ppc-linker-aspC, pRSF- <i>yneI</i> -linker-pa0132 and pTrc99A- <i>pyc</i> -panD	This study
BL21(TP)	BL21(DE3) carrying pCDF-ppc-aspC, pTrc99A-panD and pRSF- <i>yneI</i> -pa0132	This study
BL21 Δ pykA	BL21(DE3) knocking out <i>pykA</i> gene	This study
BL21 Δ pykA(TP)	BL21(DE3) knocking out <i>pykA</i> gene carrying pCDF-ppc-aspC, pTrc99A-panD and pRSF- <i>yneI</i> -pa0132	This study

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
pTrc99A-panD	pTrc99A harboring the optimized gene <i>panD</i> , AmpR	This study
pTrc99A- <i>pyc</i> -panD	pTrc99A harboring the optimized genes <i>pyc</i> and <i>panD</i> , AmpR	This study
pCDF-ppc-aspC	pCDF harboring the optimized genes <i>ppc</i> and <i>aspC</i> , StrepR	This study
pRSF- <i>yneI</i> -pa0132	pRSF harboring the optimized genes <i>yneI</i> and <i>pa0132</i> , KanR	This study
pCDF-ppc-linker-aspC	pCDF-ppc-aspC harboring the antibody sequence linker, StrepR	This study
pRSF- <i>yneI</i> -linker-pa0132	pRSF- <i>yneI</i> -linker-pa0132 harboring the antibody sequence linker, KanR	This study
pCas	pCas-cas9, KanR	Lab store
pTarget- <i>pykA</i>	sgRNA- <i>pykA</i> , Spe	This study
pTarget	sgRNA, Spe	Lab store

转氨酶 (*aspC*)、天冬氨酸- α -脱羧酶 (*panD*) 基因。同时引入了铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 来源的 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶 (*pa0132*) 基因、大肠杆菌 K12 来源的琥珀酸半醛脱氢酶 (*yneI*) 基因和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 来源的丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 基因。以本实验室保存的 pRSF、pCDF、pTrc99A 质粒以及大肠杆菌的基因组为模板, 通过表 3 中的引物, 分别扩增获得基因片段以及上下游的同源臂序列。再采用同源重组的方法, 构建 pTrc99A-panD、pTrc99A-*pyc*-panD、pCDF-ppc-aspC 和 pRSF-*yneI*-pa0132 表达质粒。具体构建策略如下。

重组质粒 pTrc99A-panD 的构建: 以大肠杆菌 BL21(DE3) 基因组为模板, 用引物 panD-F、panD-R 扩增天冬氨酸- α -脱羧酶 (*panD*) 基因。以实验室保存的 pTrc99A 质粒为模板, 用引物 pTrc99A-F、pTrc99A-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *panD* 片段和 pTrc99A 质粒同源重组, 将重组产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 得到 pTrc99A-panD 重组质粒。

重组质粒 pTrc99A-*pyc*-panD 的构建: 以大肠杆菌 BL21(DE3) 基因组为模板, 用引物 panD-F、panD-R 扩增天冬氨酸- α -脱羧酶 (*panD*) 基因。以谷氨酸棒杆菌基因组为模板, 用引物 *pyc*-F、*pyc*-R 扩增丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 基因。以

表3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
ppc-F	AACAGACCCCATGGGCATGAACGAACAATATTCCGCATT
ppc-R	GCCGGATGATTAATTGTCAAGAATTCTTAGCCGGTATTACGCATACCTG
aspC-F	CACACAGGAAACAGACCATGTTTGAGAACATTACCGCCG
aspC-R	GCCGCAAGCTTGTGACTTACAGCACTGCCACAATCGC
yneI-F	CACACAGGAAACAGACCATGACCATTACTCCGGCAACTC
yneI-R	TTCTTTACCAGACTCGAGTCAGATCCGGTCTTTCCACAC
pa0132-F	CACACAGGAAACAGACCATGAATCAGCCCCTGAATGTC
pa0132-R	GCCGGATGATTAATTGTCAAAAAGCTTTCAGGCAATTCCGTTTCAGAG
pyc-F	CACACAGGAAACAGACCGTGTGACTCACACATCTTCAACG
pyc-R	GCCGGATGATTAATTGTCAAGAATTCCTTAGGAAACGACGACGATCAAGTC
panD-F	GAAACAGACCCCTCGAGCAAGAGGTATATATTAATGTTGCGTACTATCC
panD-R	GCCAAAACAGCCAAGCTTCTAGATCGAGCGACTGGTTAAAAG
pCDF-F	GTCGACAAGCTTGCGGCC
pCDF-R	ATTCCTAATGCAGGAGTCGCAT
pRSF-F	CTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGC
pRSF-R	ATTCCTAATGCAGGAGTCGCAT
pTrc99A-F	AAGCTTGGCTGTTTTGGCG
pTrc99A-R	CAGCTCATTTTCAGAATATTTGCCA
pRSF-linker-F	ATGACCATTACTCCGGCAACTC
pRSF-linker-R	AAGCTTGGCAATTCCGTTCA
pCDF-linker-F	ATGTTTGAGAACATTACCGCCG
pCDF-linker-R	GAATTCGCCGGTATTACGCA
linker-pRSF-F	ACGGAATTGCCAAGCTTTCTTCAAGCTCTGGTAGCTCGTC
linker-pRSF-R	CCGGAGTAATGGTCATTCCGGAGCTCGAACTGCC
linker-pCDF-F	TAATACCGGCGAATTCTCTTCAAGCTCTGGTAGCTCGTC
linker-pCDF-R	CGGCGGTAATGTTCTCAAACATTCCGGAGCTCGAACTGCC
pykA-sgRNA-F	TGCGCGTCAGCTAAACCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
pykA-sgRNA-R	CTCGGTTTAGCTGACGCGCAACTAGTATTATACCTAGGACTGAG
pykA-up-F	CCACAGCCAGGATCCACGCATGAGTTGTATGAATTGT
pykA-up-R	CATCCGGCAACGTACGTAATACTCCGTTGACTGAAACAAC
pykA-down-F	TGTTTCAGTCAACGGAGTATTACGTACGTTGCCGGATGC
pykA-down-R	TGCGGCCGCAAGCTTTACGTCAGGGGTACTGG

同源重组酶将 *panD*、*pyc* 片段和 pTrc99A 质粒同源重组，将重组产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中，得到 pTrc99A-*pyc*-*panD* 重组质粒。

重组质粒 pCDF-*ppc*-*aspC* 的构建：以大肠杆菌 BL21(DE3) 基因组为模板，用引物 *ppc*-F、

ppc-R 扩增磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 (*ppc*)；引物 *aspC*-F、*aspC*-R 扩增天冬氨酸转氨酶基因 (*aspC*)。以 pCDF 质粒为模板，用引物 pCDF-F、pCDF-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *ppc*、*aspC* 片段和 pCDF 质粒同源重组，将重组产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞

中, 筛选获得 pCDF-ppc-aspC 重组质粒。

重组质粒 pRSF-yneI-pa0132 的构建: 琥珀酸半醛脱氢酶基因 (*yneI*) 和 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶基因 (*pa0132*) 由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 用引物 yneI-F、yneI-R 扩增琥珀酸半醛脱氢酶基因 (*yneI*); 用引物 pa0132-F、pa0132-R 扩增 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶基因 (*pa0132*)。以实验室保存的 pRSF 质粒为模板, 用引物 pRSF-F、pRSF-R 线性化质粒模板。再用同源重组酶将 *yneI*、*pa0132* 片段和 pRSF 质粒同源重组, 将重组产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 获得 pRSF-yneI-pa0132 重组质粒。

为了提高丙二酸合成途径的效率, 本研究将丙二酸合成途径的关键酶 *yneI* 和 *pa0132* 以及 *ppc* 和 *aspC* 分别进行融合表达。采用 Stefan 等^[12]的融合蛋白构建方法, 对构建的组成型表达质粒进行改造。具体构建策略如下。

重组质粒 pCDF-ppc-linker-aspC 的构建: linker 基因片段由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 其氨基酸序列为 (SSSSG)₄。用引物 linker-pCDF-F、linker-pCDF-R 扩增 linker 片段。以 pCDF-ppc-aspC 质粒为模板, 用引物 pCDF-linker-F、pCDF-linker-R 线性化 pCDF 质粒, 再用同源重组酶将 linker 片段和 pCDF-ppc-aspC 质粒同源重组, 将重组产物转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 筛选获得 pCDF-ppc-linker-aspC 重组质粒。

重组质粒 pRSF-yneI-linker-pa0132 的构建: linker 基因片段由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物 linker-pRSF-F、linker-pRSF-R 扩增 linker 片段。以 pRSF-yneI-pa0132 质粒为模板, pRSF-linker-F、pRSF-linker-R 线性化 pRSF 质粒, 再用同源重组酶将 linker 片段和 pRSF-yneI-pa0132 质粒同源重组, 将重组产物转入 *E. coli* JM109 感受态, 筛选获得 pRSF-yneI-linker-pa0132

重组质粒。

1.3 CRISPR/Cas9 系统敲除大肠杆菌丙酮酸激酶 (*pykA*) 基因

本研究使用双质粒系统敲除 *pykA* 基因, 构建含有 Cas9 编码基因的 pCas 质粒和含有 sgRNA 的 pTarget 质粒。基因敲除时, 将两个质粒和目标基因上下游 500 bp 的片段一起电转化入待敲除菌株中, 并使用终浓度为 10 mmol/L 的阿拉伯糖诱导重组酶的合成, 实现基因敲除。

验证敲除正确后, 诱导 pCas 质粒定位 pTarget 质粒上的 sgRNA, 从而消除 pTarget 质粒。由于 pCas 质粒是温敏型质粒, 因此选用在 42 °C 培养的方式消除 pCas 质粒。

1.4 重组菌株的构建

将质粒 pRSF-yneI-pa0132、pCDF-ppc-aspC 和 pTrc99A-panD 电转化至 BL21(DE3) 菌株中, 获得重组菌 BL21(TP)。将质粒 pRSF-yneI-pa0132、pCDF-ppc-aspC 和 pTrc99A-panD 电转化至 BL21(DE3) Δ *pykA* 菌株中, 获得重组菌 BL21 Δ *pykA*(TP)。将质粒 pRSF-yneI-pa0132、pCDF-ppc-aspC 和 pTrc99A-pyc-panD 电转化至 BL21(DE3) 菌株中, 获得产丙二酸的工程菌 BL21(TPP)。将 pCDF-ppc-linker-aspC、pRSF-yneI-linker-pa0132 和 pTrc99A-pyc-panD 电转化至 BL21(DE3) 菌株中, 获得产丙二酸的工程菌 BL21(SCR)。

1.5 基因表达的鉴定

挑取单克隆于 25 mL 的 LB 培养基中, 37 °C 培养 12 h。再将上述菌液转接 LB 培养基中过夜培养, 发酵时按 2% 接种量转接 SOB 培养基中, 37 °C 培养 48 h。分别在 4、8、12、24、36、48 h 取样, 10 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 重组菌株的发酵实验

摇瓶发酵: 重组菌株接种至 LB 培养基中

传代两次, 发酵时取传代结束菌液接种至 SOB 培养基中, 37 °C、230 r/min 培养 72 h, 每隔 12 h 取样, 测定 OD_{600} 和丙二酸积累量。

5 L 发酵罐发酵: 重组菌株接种至 LB 培养基中培养 12 h, 再按 2% 接种量分别接种于 6 瓶 LB 培养基中, 37 °C、230 r/min 培养 12 h 后接种发酵罐。

1.7 检测方法

HPLC 检测: 取发酵液 1 mL, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液通过 0.22 μm 的滤膜。丙二酸、乙酸和葡萄糖采用示差检测器进行分析, 检测参数如下: 采用 5 mmol/L H_2SO_4 作为流动相, 0.6 mL/min 流速进样, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL , 检测器温度 30 °C。 β -丙氨酸检测参数参考 Song 等^[15]的研究。

2 结果与分析

2.1 丙酮酸激酶 (*pykA*) 基因敲除菌的构建

用引物 *pykA*-sgRNA-F 和 *pykA*-sgRNA-R 全质粒 PCR 扩增 pTarget 质粒, 引入 20 bp 的 sgRNA 序列, 获得基因敲除质粒 pTarget-*pykA*。用引物 *pykA*-up-F 和 *pykA*-up-R 扩增上游同源臂; 用引物 *pykA*-down-F 和 *pykA*-down-R 扩增下游同源臂, 利用融合 PCR 技术获得 1 000 bp 的上下游同源臂。

将 pCas 质粒、pTarget-*pykA* 质粒和上下游同源臂电转化入 BL21(DE3) 菌株中实现基因敲除, 并进行菌落 PCR 验证, 结果如图 1 所示。若敲除成功, 则条带大小应为 750 bp, 将条带大小正确的扩增片段送至天霖生物公司测序。测序结果与同源臂序列一致, 则 *pykA* 基因敲除成功。将 pTrc99A-*panD*、pCDF-*ppc*-*aspC* 和 pRSF-*yneI*-*pa0132* 质粒转化至基因敲除菌株中, 获得重组菌 BL21 Δ *pykA*(TP)。

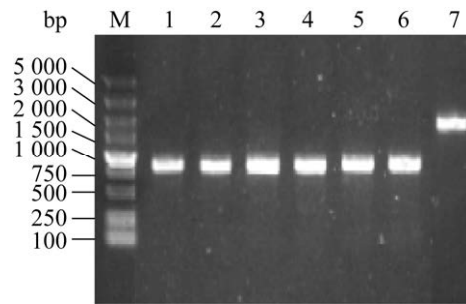


图 1 菌落 PCR 验证琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Colony PCR to verify *pykA* deletion. 1–6: *pykA* gene deletion; 7: no gene deletion.

2.2 BL21(TPP) 重组菌的表达分析

将构建的 3 个表达质粒 pRSF-*yneI*-*pa0132*、pCDF-*ppc*-*aspC* 和 pTrc99A-*pyc*-*panD* 转化至 BL21(DE3) 菌株中, 获得产丙二酸的工程菌 BL21(TPP), 丙二酸合成途径如图 2 所示。本研究构建 BL21(TPP) 菌株后, 通过 SDS-PAGE 验证了 *pa0132*、*yneI*、*pyc*、*ppc*、*aspC*、*panD* 这 6 个关键酶基因的表达情况。挑取 BL21(TPP) 转化子接种到新鲜的 SOB 培养基 37 °C、230 r/min 培养, 取发酵上清液进行 SDS-PAGE 检测, 对照为培养 12 h 的 BL21 菌株发酵上清液, 结果如图 3 所示。

yneI 和 *pa0132* 基因表达的目的蛋白大小分别为 49.7 kDa 和 48.4 kDa, 图 3A 检测结果显示这两个蛋白已经成功表达; *ppc* 和 *aspC* 基因表达的目的蛋白大小分别为 99.0 kDa 和 43.6 kDa, 图 3B 显示 *ppc* 和 *aspC* 基因已表达; 图 3C 的检测结果显示 *pyc* 和 *panD* 基因均已成功表达, 其目的蛋白大小分别为 128.0 kDa 和 14.1 kDa。蛋白胶图中的条带大小与理论一致, 因此磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (*ppc*)、天冬氨酸转氨酶 (*aspC*)、天冬氨酸- α -脱羧酶 (*panD*)、 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶 (*pa0132*)、琥珀酸半醛脱氢酶 (*yneI*) 和丙酮酸羧化酶 (*pyc*) 基因已表达。

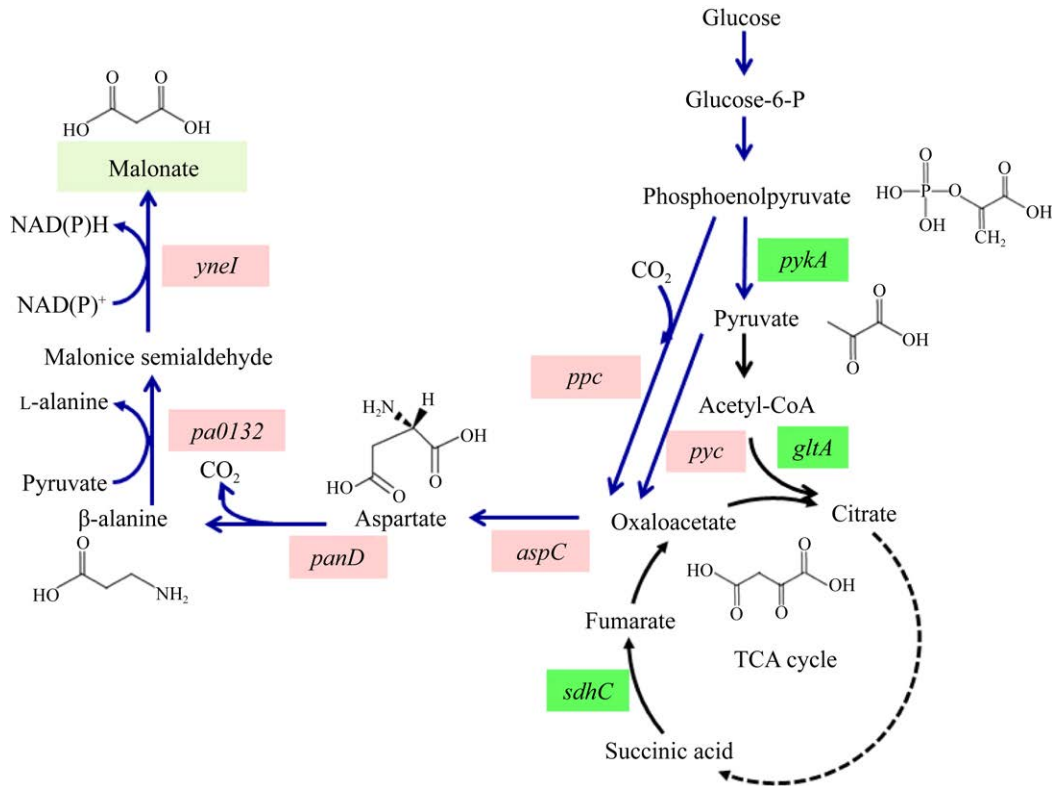


图 2 丙二酸合成途径代谢通路 Glucose: 葡萄糖; Glucose-6-P: 6-磷酸-葡萄糖; Phosphoenolpyruvate: 磷酸烯醇式丙酮酸; Pyruvate: 丙酮酸; Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A; Citrate: 柠檬酸; Succinic acid: 琥珀酸; Fumarate: 富马酸; Oxaloacetate: 草酰乙酸; Aspartate: 天冬氨酸; β -alanine: β -丙氨酸; Malonate semialdehyde: 丙二酸半醛; Malonate: 丙二酸; *pykA*: 丙酮酸激酶; *gltA*: 柠檬酸合酶; *sdhC*: 琥珀酸脱氢酶; *ppc*: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; *pyc*: 丙酮酸羧化酶; *aspC*: 天冬氨酸转氨酶; *panD*: 天冬氨酸- α -脱羧酶; *pa0132*: β -丙氨酸丙酮酸转氨酶; *yneI*: 琥珀酸半醛脱氢酶

Figure 2 Metabolic pathway for the production of malonate acid. Glucose-6-P: 6-phosphate-glucose; *pykA*: pyruvate kinase; *gltA*: citrate synthase; *sdhC*: succinate dehydrogenase; *ppc*: phosphoenolpyruvate carboxylase; *pyc*: pyruvate carboxylase; *aspC*: aspartate aminotransferase; *panD*: aspartate- α -decarboxylase; *pa0132*: β -alanine pyruvate aminotransferase; *yneI*: succinate semialdehyde dehydrogenase.

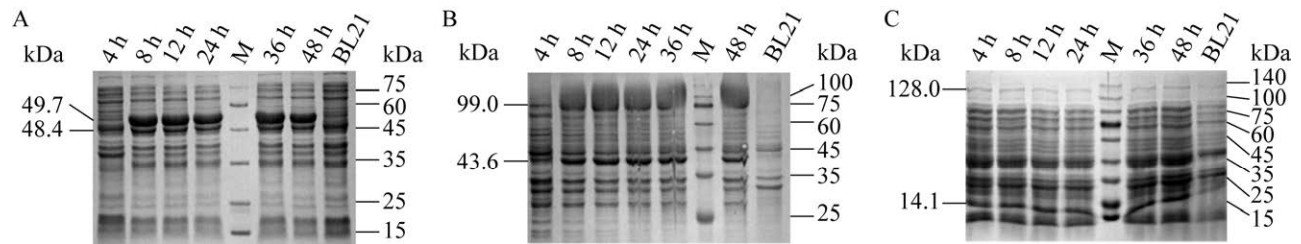


图 3 过表达关键酶基因的 SDS-PAGE 验证

Figure 3 SDS-PAGE verification of overexpression of key genes. (A) pRSF-yneI-pa0132. (B) pCDF-ppc-aspC. (C) pTrc99A-pyc-panD.

2.3 重组菌株的摇瓶发酵

2.3.1 重组菌株摇瓶发酵液液相检测结果

将经过两次活化的重组菌 BL21(TP)、BL21 Δ pykA(TP) 和 BL21(TPP) 种子液接种至 50 mL SOB 培养基中, 37 °C、230 r/min 摇瓶发酵 72 h, 每 12 h 取样进行液相检测。液相检测结果如图 4 所示, 菌株 BL21(TPP) 的丙二酸积累量最高, 丙二酸在 48–60 h 的积累最快, 最高在 60 h 时有 0.47 g/L 的丙二酸积累量。因此以 BL21(TPP) 为本研究的出发菌株。

2.3.2 重组菌 BL21(TPP) 发酵液的液质检测结果

重组菌株 BL21(TPP) 在 SOB 中发酵培养 72 h 后, 将发酵液离心, 取上清液通过 0.22 μ m 的滤膜制备检测样品。采用 LC-MS 对丙二酸进行定性, 检测结果如图 5 所示, 图 5A 为丙二酸标样, 图 5B 为发酵上清液样品, 样品中的特征离子 (m/z 59.0、 m/z 103.0) 与标样相同, 说明发酵液中有丙二酸的积累。

2.4 重组菌 BL21(TPP) 的摇瓶发酵优化

2.4.1 宿主菌株的筛选

不同的宿主菌株, 其丙二酸生产能力也不同。因此对常见的几种大肠杆菌 (*E. coli*) 宿主

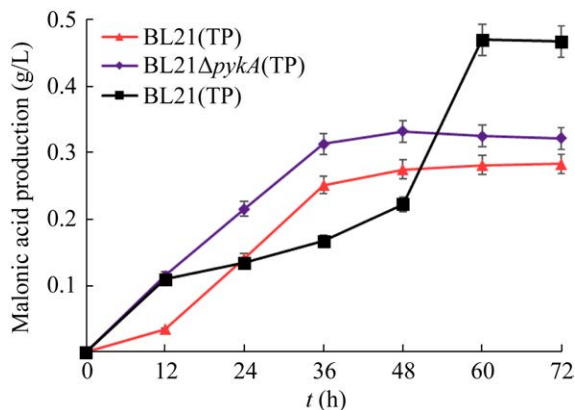


图 4 重组菌株摇瓶发酵上清液中丙二酸产量
Figure 4 Titer of malonic acid in the supernatant of the recombinant strains cultured in shake flasks.

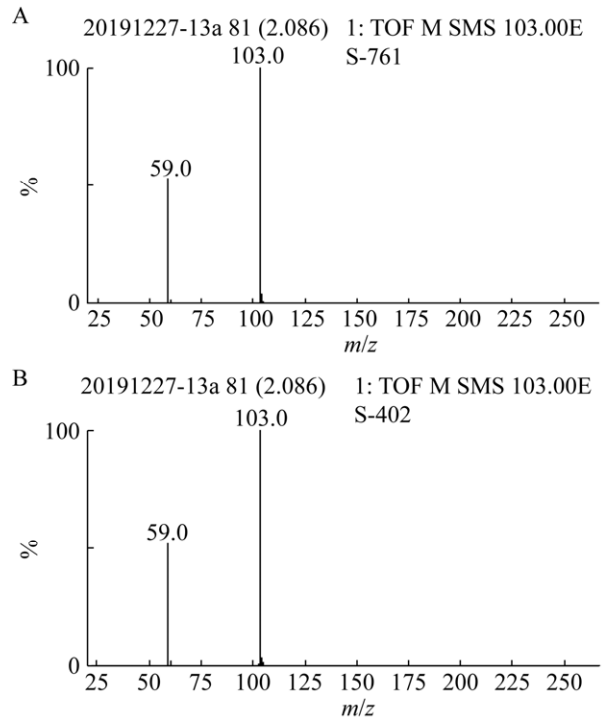


图 5 BL21(TPP) 摇瓶发酵上清液的液质检测结果 A: 丙二酸标样; B: 发酵上清液样品

Figure 5 LC-MS analysis of the supernatant of strain BL21(TPP) cultured in shake flasks. (A) Malonic acid standard. (B) Fermentation supernatant.

进行了发酵筛选, 以便于后续的研究。将 pRSF-yneI-pa0132、pCDF-ppc-aspC 和 pTrc99A-pycpanD 质粒转化入 MG1655(K12)、JM109、BL21(DE3) 和 DH5 α 菌株中, 初始葡萄糖浓度为 4 g/L, 接种量 2% 进行摇瓶发酵。由图 6 可知, BL21(DE3) 菌株合成丙二酸的能力最强, 丙二酸积累量最高, 为 0.51 g/L。因此本研究以 BL21(DE3) 菌株作为宿主菌株以进行进一步的研究。

2.4.2 碳源对重组菌株 BL21(TPP) 产丙二酸的影响

微生物发酵过程中常用的碳源有葡萄糖、淀粉、果糖、甘露糖和甘油等^[16], 不同的碳源种类对发酵过程中菌体的生长代谢影响显著。本

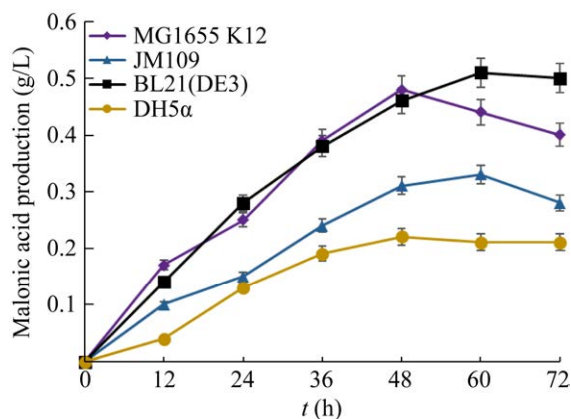


图6 不同宿主菌株对丙二酸产量的影响
Figure 6 Effect of different host strains on the production of malonic acid.

研究选取了大肠杆菌发酵常用的5种碳源,每种碳源的浓度均为4 g/L,其他组分和培养条件均不变,发酵液检测结果如图7所示。从图中可以看出,最有利于丙二酸生产的碳源是葡萄糖,其次是乳糖和蔗糖,半乳糖作为碳源时丙二酸的积累量明显低于葡萄糖。其原因可能是葡萄糖对于菌体而言是快速碳源,容易被菌体所利用。

2.4.3 初始糖浓度对重组菌 BL21(TPP) 产丙二酸的影响

培养基中的糖浓度是大肠杆菌发酵控制中的关键因素,浓度过高时会利于副产物的生成,阻碍目标产物的高效合成^[17]。本研究选取了4、8、12、16 g/L四个初始葡萄糖的浓度梯度,探究最佳的初始糖浓度。使用SOB培养基发酵72 h,每12 h取样测定 OD_{600} 并进行HPLC检测,结果如图8所示。从图中可以看出,4 g/L的初始糖浓度更有利于菌体积累丙二酸。糖浓度过高,对菌体的生长和代谢有抑制作用。

2.4.4 重组菌 BL21(TPP) 的上罐发酵

本研究继续在5 L发酵罐水平探究BL21(TPP)菌株产丙二酸的最优条件,发酵罐的发酵条件

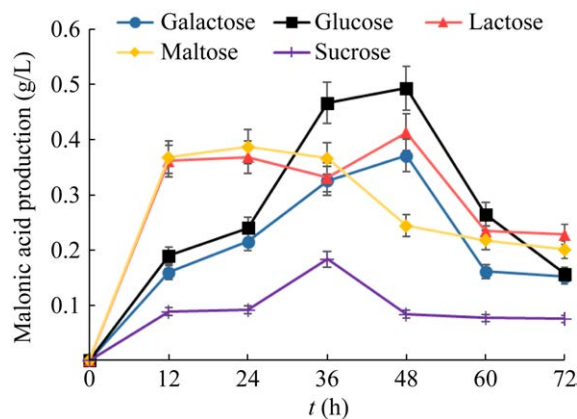


图7 不同碳源种类对丙二酸产量的影响
Figure 7 Effect of different types of carbon sources on the production of malonic acid.

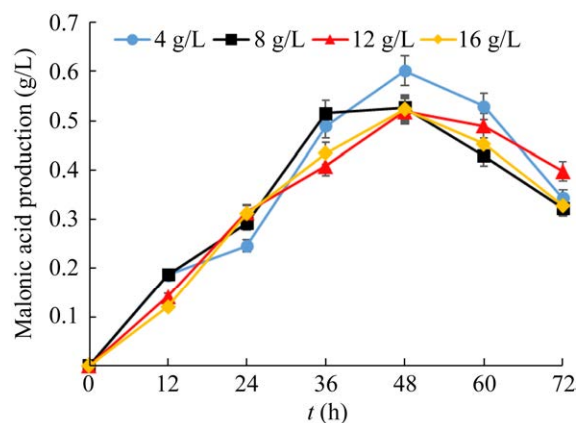


图8 不同初始糖浓度对丙二酸积累量的影响
Figure 8 Effect of different initial sugar concentration on the production of malonic acid.

为通气量1 vvm,转速400 r/min,温度37℃,装液量3 L,接种量10%。补料方式对发酵罐的产量有很大的影响,因为不同的补料方式会导致发酵液中残糖浓度的不同,残糖浓度过高,发酵液中渗透压过大,不利于菌体对营养物质的吸收;而残糖浓度过低时,菌体缺少碳源的供给,必然影响产物的合成^[18]。因此首先比较连续补料和间歇补料对丙二酸积累量的影响,发酵结果如图9所示。从图中可以看出,连续补料在49 h时丙二酸积累量最高,为0.688 g/L。间

歇补料在 42 h 时丙二酸积累量最高, 为 2.16 g/L, 是流加补料的 3 倍多, 并且达到最高产量的时间也更短。分析原因可能是: 少量多次的补料方式能够克服底物的抑制效应, 使菌体的活力更高, 更有利于菌体生长和利用底物^[19], 因此后续的上罐将采用间歇补料的方式。

溶氧浓度是高密度发酵过程中影响菌体生长的重要因素之一, 对菌体生长和代谢的影响很大^[20]。将溶氧控制在最佳的范围, 能够使

菌体的活力更强。本研究在溶氧和搅拌关联的设置下对发酵罐的溶解氧进行了优化, 设置了 25% 和 15% 两个梯度, 其他发酵条件不变, HPLC 结果如图 10 所示。分析图中数据, 溶氧为 15% 时菌体的生长速率比 25% 溶氧时快很多, 并且副产物的积累也更少, 这可能是碳源大部分用于菌体生长的缘故。从丙二酸的积累量来看, 溶氧为 25% 时丙二酸积累量为 3.32 g/L, 而溶氧为 15% 时的丙二酸产量仅为 1.65 g/L, 这可

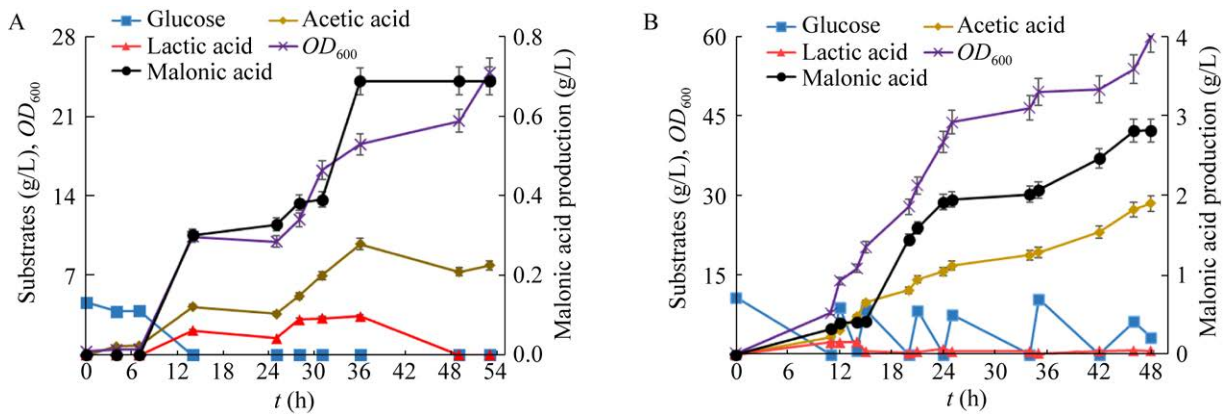


图 9 5 L 发酵罐补料方式对丙二酸积累量的影响

Figure 9 Effect of feeding method on the production of malonic acid in 5 L fermentor. (A) Continuous feeding. (B) Intermittent feeding.

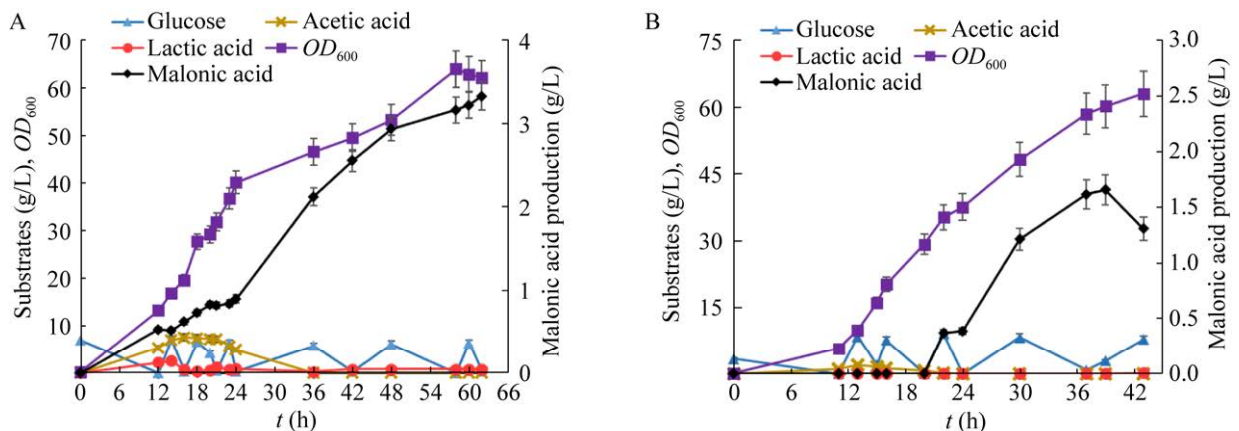


图 10 5 L 发酵罐溶解氧对丙二酸积累量的影响

Figure 10 Effect of dissolved oxygen on the production of malonic acid in 5 L fermentor. (A) 25%. (B) 15%.

能是由于 15% 的溶解氧不足以同时满足菌体的生长及产物的合成, 造成丙二酸积累少, 菌体过早衰老的现象。

2.5 重组菌 BL21(SCR) 发酵合成丙二酸

2.5.1 重组菌 BL21(SCR) 摇瓶发酵合成丙二酸

将 BL21(SCR) 菌株在 4 g/L 初始糖的 SOB 中, 37 °C、230 r/min 培养 72 h, 每 12 h 取样并采用 HPLC 进行定量检测, 发酵结果如图 11 所示。BL21(SCR) 菌株在 48 h 时积累 0.83 g/L 的丙二酸, 比相同条件下的对照组 BL21(TPP) 菌株提高了 36%。该结果说明对蛋白质进行融合表达能够减少中间代谢物的损失, 促进丙二酸的合成。

2.5.2 接种量对 BL21(SCR) 菌株产丙二酸的影响

本文研究了不同接种量对 BL21(SCR) 菌株在 5 L 发酵罐培养条件下产丙二酸的影响, 进一步探究该菌株的丙二酸生产能力。发酵过程中, 设置了 10% 接种量和 15% 接种量两个梯度, 初始糖浓度为 4 g/L, 0–3 h 的转速为 300 r/min,

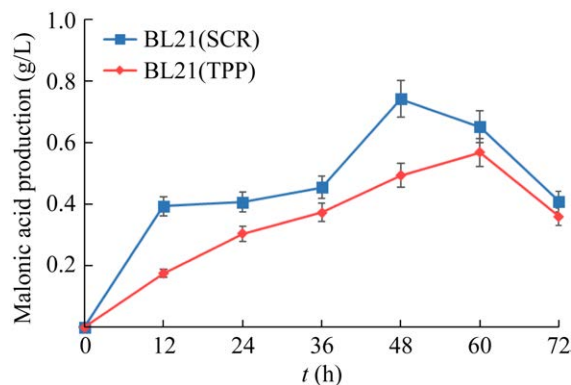


图 11 BL21(SCR) 融合蛋白菌株摇瓶发酵结果
Figure 11 Shake flask fermentation of strain BL21(SCR) with fusion protein.

3 h 后设置为溶氧与转速联动, 以保证溶氧在 25% 左右, 搅拌转速范围为 300–800 r/min, 每当葡萄糖浓度降为 0 g/L 时, 补加终浓度为 8 g/L 的葡萄糖, 发酵结果如图 12 所示。分析图中数据, 当接种量为 15% 时菌株的生长速率更快, 丙二酸的积累也更多, 最高为 4.5 g/L, 这说明提高接种量对丙二酸的积累有促进作用。

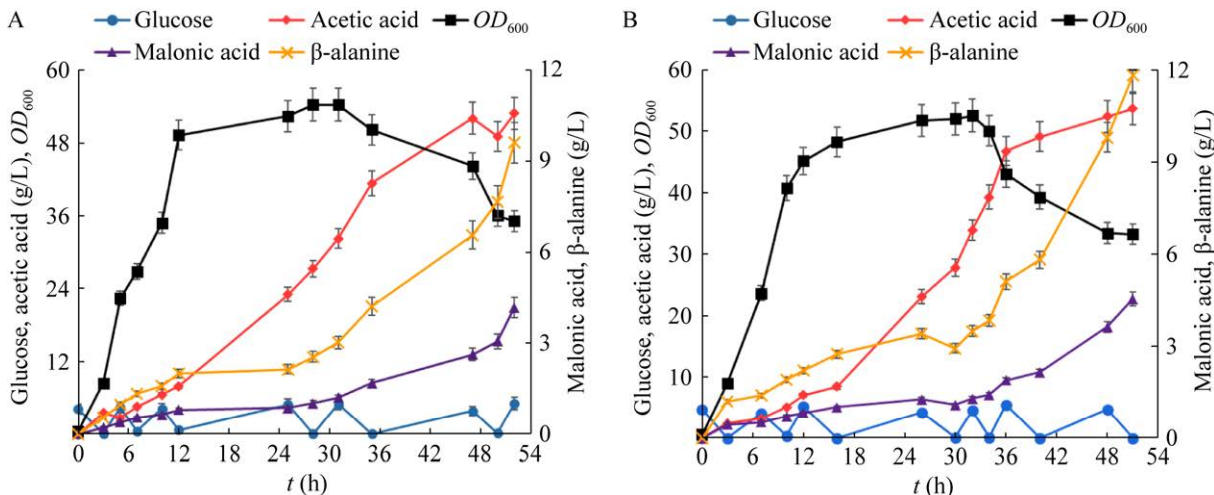


图 12 BL21(SCR) 菌株不同接种量 5 L 发酵罐发酵结果

Figure 12 Fermentation profile of strain BL21(SCR) in 5 L fermentor with different inoculum size. (A) 10%. (B) 15%.

2.5.3 BL21(SCR) 菌株梯度降温上罐发酵

BL21(SCR) 菌株上罐结果显示 (图 13), 乙酸在整个发酵过程中的积累非常多, 为了减少乙酸的积累, 进一步提高丙二酸的积累量, 本研究采用了梯度降温的上罐发酵策略。通过在发酵中后期降低发酵罐温度, 达到减慢菌体生长, 提高目标代谢通路碳流量的目的^[21]。发酵过程中, 初始糖浓度为 4 g/L, 0–3 h 的转速为 300 r/min, 3 h 后设置为溶氧与转速联动, 以保证溶氧在 25% 左右, 搅拌转速范围为 300–800 r/min, 每当葡萄糖浓度降为 0 g/L 时, 补加终浓度为 8 g/L 的葡萄糖, 初始发酵温度为 37 °C, 12 h 降温到 34 °C, 24 h 降温到 32 °C, 32 h 降温到 30 °C 直至发酵结束, 发酵结果如图 13 所示。可以看出梯度降温确实可以减缓菌体的生长, 抑制副产物乙酸的合成, 该条件下丙二酸的积累量达到了 5.61 g/L, 这说明发酵中后期降低温度能促进丙二酸的合成。

3 讨论

丙二酸作为一种重要的有机合成中间体, 它

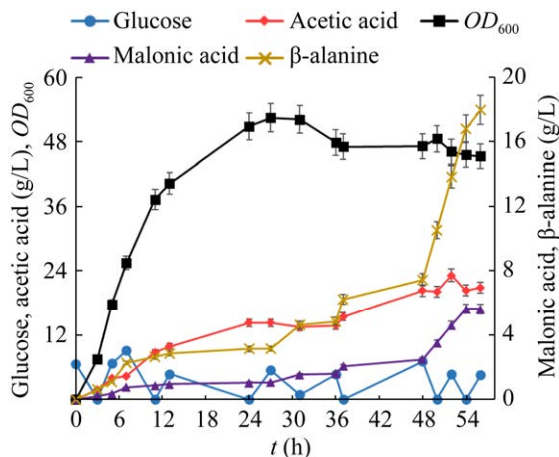


图 13 BL21(SCR) 菌株梯度降温 5 L 发酵罐发酵结果

Figure 13 Fermentation profile of strain BL21(SCR) in 5 L fermentor with gradient cooling.

可用作金属表面处理剂、植物生长调节剂^[22]以及维生素 B₂ 的合成, 因此丙二酸的需求量巨大。但目前广泛使用的化学合成法具有生产成本低、转化率低等缺点^[23], 因此生物法合成丙二酸成为了近年来的研究热点, 构建基因工程菌实现丙二酸的合成具有重要的意义。

本研究以大肠杆菌 BL21(DE3) 作为表达宿主, 通过引入外源 *pa0132*、*yneI* 和 *pyc* 基因, 以及过表达大肠杆菌自身的 *ppc*、*aspC* 和 *panD* 基因, 实现了大肠杆菌中丙二酸的生物合成。通过对重组菌株进行发酵优化, 使菌株在摇瓶的最高产量为 0.61 g/L, 5 L 发酵罐水平对重组菌株进行了补料方式以及溶解氧浓度的优化, 我们发现在间歇补料以及溶氧为 25% 的条件下丙二酸的积累量最高, 在 62 h 时积累了 3.32 g/L 的丙二酸。

为了进一步提高丙二酸产量, 本研究将丙二酸合成途径的关键酶基因 *yneI* 和 *pa0132* 以及 *ppc* 和 *aspC* 分别进行融合表达, 以减少底物的损失和中间代谢物的积累, 提高丙二酸的产量。构建的 BL21(SCR) 菌株在摇瓶中的丙二酸积累量为 0.83 g/L, 在 5 L 发酵罐中最高 54 h 时积累了 5.61 g/L 丙二酸。该实验结果与出发菌株 BL21(TPP) 相比, 产量提高了 69%, 并且菌体的生长和丙二酸的积累速度也更快。通过对最优发酵结果碳平衡的计算, 发现单位体积 (1 L) 消耗的碳原子量为 1.62 mol, 生产丙二酸消耗碳原子 0.16 mol, 生产乙酸消耗 0.67 mol, 生产 β-丙氨酸消耗 0.56 mol, 剩余的 0.23 mol 碳原子用于菌体生长, 总碳平衡。说明乙酸和 β-丙氨酸作为主要的副产物占据了大部分的碳源, 这也是限制丙二酸产量提高的关键因素。本研究最优发酵条件的丙二酸产率为 0.09 g/g 葡萄糖, 该途径的理论产率为 0.88 g/g 葡萄糖。实际产率低于理论产率的原因主要有: 乙酸的积累量

较高, 最高有 21.4 g/L 的积累 (图 13), 与目标途径竞争了大量的碳源; 发酵过程中丙二酸的前体 β -丙氨酸的积累量一直在上升 (图 13), 说明 β -丙氨酸丙酮酸转氨酶 (*pa0132*) 和琥珀酸半醛脱氢酶 (*yneI*) 的催化效率不高, 使得 β -丙氨酸没有被高效地转化为丙二酸。

本研究对重组菌株的研究主要集中在发酵优化, 而对途径中酶的活性以及辅因子没有进行深入的研究。并且目前有研究表明, 琥珀酸半醛脱氢酶是一种 CoA 依赖的脱氢酶, 改变 CoA 的数量可以调节该酶的活性^[24]; 添加 NAD^+ 和 NADH 可以激活该酶的活性^[25]。在后续的研究中, 将对琥珀酸半醛脱氢酶进行纯化和表征, 从而进一步提高丙二酸的产量。

REFERENCES

- [1] Werpy T, Petersen G. Top Value Added Chemicals from Biomass: volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas[R]. OSTI, 2004.
- [2] Davydov VV, Repetskaya AV. Protective effect of malonic acid in hypoxic hypoxia. *Fiziol Zh*, 1991, 37(5): 111-112.
- [3] Manning DT, Cappy JJ, See RM, et al. Use of malonic acid derivative compounds for retarding plant growth: US, 5292937. 1994-03-08.
- [4] 张红梅, 魏文珑, 常宏宏. 阳离子交换树脂催化水解法制备丙二酸工艺的研究. *应用化工*, 2007, 36(7): 653-655.
Zhang HM, Wei WL, Chang HH. Study on the preparation process of malonic acid catalyzing by cation exchange resin. *Appl Chem Ind*, 2007, 36(7): 653-655 (in Chinese).
- [5] Api AM, Belsito D, Botelho D, et al. RIFM fragrance ingredient safety assessment, diethyl malonate, CAS Registry Number 105-53-3. *Food Chem Toxicol*, 2018, 122(Suppl 1): S267-S274.
- [6] Kasumov T, Brunengraber H. An improved procedure for the synthesis of labelled fatty acids utilizing diethyl malonate. *J Label Compd Radiopharm*, 2006, 49(2): 171-176.
- [7] Lei H, Yin YW, Luo BK, et al. Preparation method of malonic acid and its ester: CN, 1410409. 2003-04-16.
- [8] Song CW, Kim JW, Cho IJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 3-hydroxypropionic acid and malonic acid through β -alanine route. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(11): 1256-1263.
- [9] Chae TU, Ahn JH, Ko YS, et al. Metabolic engineering for the production of dicarboxylic acids and diamines. *Metab Eng*, 2020, 58: 2-16.
- [10] Piao XY, Wang L, Lin BX, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of L-aspartate and its derivative β -alanine with high stoichiometric yield. *Metab Eng*, 2019, 54: 244-254.
- [11] Orencio-Trejo M, Utrilla J, Fernández-Sandoval MT, et al. Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2010, 121: 71-107.
- [12] 黄子亮, 张翀, 吴希, 等. 融合酶的设计和应用研究进展. *生物工程学报*, 2012, 28(4): 393-409.
Huang ZL, Zhang C, Wu X, et al. Recent progress in fusion enzyme design and applications. *Chin J Biotech*, 2012, 28(4): 393-409 (in Chinese).
- [13] Tippmann S, Anfelt J, David F, et al. Affibody scaffolds improve sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(1): 19-28.
- [14] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753-759.
- [15] Song CW, Kim DI, Choi S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of fumaric acid. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(7): 2025-2034.
- [16] Zhang Y, Dai XF, Jin HN, et al. The effect of optimized carbon source on the synthesis and composition of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus paracasei*. *J Dairy Sci*, 2021, 104(4): 4023-4032.
- [17] 程立坤, 赵春光, 黄静, 等. 葡萄糖浓度对大肠杆菌发酵 L-色氨酸的影响. *食品与发酵工业*, 2010, 36(3): 5-9.
Cheng LK, Zhao CG, Huang J, et al. Effect of glucose concentration on L-tryptophan fermentation by *Escherichia coli*. *Food Ferment Ind*, 2010, 36(3): 5-9 (in Chinese).
- [18] 刘辉, 赵忠盖. 一种基于滞后检测值的残糖浓度模糊控制. *计算机与应用化学*, 2016, 33(2): 191-196.
Liu H, Zhao ZG. A fuzzy controller for residual sugar concentration based on delayed measurements. *Comput*

- Appl Chem, 2016, 33(2): 191-196 (in Chinese).
- [19] Caldwell TP, Synoground BF, Harcum SW. Method for high-efficiency fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 2021, 659: 189-217.
- [20] Whiffin VS, Cooney MJ, Cord-Ruwisch R. Online detection of feed demand in high cell density cultures of *Escherichia coli* by measurement of changes in dissolved oxygen transients in complex media. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 85(4): 422-433.
- [21] 迟雷. 基于过程控制优化的重组大肠杆菌高密度发酵研究[D]. 西安: 西北大学, 2011.
Chi L. Study on high cell density cultivation in recombinant *Escherichia coli* based on optimization of process control[D]. Xi'an: Northwest University, 2011 (in Chinese).
- [22] Zhang S, Wei ZM, Zhao MY, et al. Influence of malonic acid and manganese dioxide on humic substance formation and inhibition of CO₂ release during composting. *Bioresour Technol*, 2020, 318: 124075.
- [23] 董浩浩, 李静, 杨国忠. 丙二酸合成工艺研究进展. *山东化工*, 2015, 44(20): 49-51.
Dong HH, Li J, Yang GZ. Progress of synthesis of malonic acid. *Shandong Chem Ind*, 2015, 44(20): 49-51 (in Chinese).
- [24] Talfournier F, Stines-Chaumeil C, Branlant G. Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2011, 286(25): 21971-21981.
- [25] Popov KM, Kedishvili NY, Harris RA. Coenzyme A- and NADH-dependent esterase activity of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1119(1): 69-73.

(本文责编 郝丽芳)