

· 微生物细胞合成 ·

刘立明 江南大学教授，博士生导师，教育部高层次人才，中组部首批青年拔尖人才人选，科技部中青年科技创新领军人才人选，江苏省333工程第二层次人选，第15届江苏省青年科技奖获得者，江苏省杰出青年基金获得者，教育部新世纪优秀人才支持计划人选。主要从事微生物制造工程的研究工作。先后负责国家重点研发计划等国家或省部级科研项目20余项；发表SCI论文160余篇；授权中国发明专利130余项；近10项产品应用于工业化生产，获国家技术发明二等奖、国家科技进步二等奖、教育部科技进步一等奖等国家或省部级奖励8项。



代谢工程改造大肠杆菌合成己二酸

刘洁^{1,2}，高聪^{1,2}，陈修来^{1,2}，郭亮^{1,2}，宋伟³，吴静³，魏婉清^{1,2}，刘佳^{1,2}，刘立明^{1,2*}

- 1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室，江苏 无锡 214122
- 2 江南大学 食品安全国际合作联合实验室，江苏 无锡 214122
- 3 江南大学生命科学与健康工程学院，江苏 无锡 214122

刘洁，高聪，陈修来，郭亮，宋伟，吴静，魏婉清，刘佳，刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌合成己二酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2375-2389.

LIU Jie, GAO Cong, CHEN Xiulai, GUO Liang, SONG Wei, WU Jing, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Liming. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for adipic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2375-2389.

摘要：己二酸是一种具有重要应用价值的二元羧酸，是合成尼龙-66的关键前体。目前，生物法生产己二酸存在生产周期长、生产效率低的问题。本研究选择一株野生型高产琥珀酸菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) FMME N-2为底盘细胞，首先通过引入逆己二酸降解途径的关键酶，成功构建了可合成0.34 g/L己二酸的*E. coli* JL00菌株；接着，对合成路径限速酶进行表达优化，使*E. coli* JL01菌株在摇瓶发酵条件下产量达到0.87 g/L；随后，通过敲除*sucD*基因、过表达*acs*基因和突变*lpd*基因的组合策略平衡己二酸合成前体的供应，优化菌株*E. coli* JL12己二酸产量进一步提升至1.51 g/L；最后，在5 L发酵罐上对己二酸发酵工艺进行优化。工程菌株经72 h分批补料发酵，己二酸的产量达到22.3 g/L，转化率为0.25 g/g，生产强度为0.31 g/(L·h)，具备了一定的应用潜力。本研究可为包括己二酸在内的多种二元羧酸细胞工厂的构建提供理论依据和技术基础。

关键词：大肠杆菌；代谢工程；己二酸；发酵优化

资助项目：国家重点研发计划(2021YFC2100700)；江苏省杰出青年基金(BK20211529)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100700) and the Outstanding Youth Foundation of Jiangsu Province (BK20211529).

*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-12-12; Accepted: 2023-02-20

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for adipic acid production

LIU Jie^{1,2}, GAO Cong^{1,2}, CHEN Xiulai^{1,2}, GUO Liang^{1,2}, SONG Wei³, WU Jing³, WEI Wanqing^{1,2}, LIU Jia^{1,2}, LIU Liming^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Joint Laboratory for International Cooperation in Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Adipic acid is a high-value-added dicarboxylic acid which is primarily used in the production of nylon-66 for manufacturing polyurethane foam and polyester resins. At present, the biosynthesis of adipic acid is hampered by its low production efficiency. By introducing the key enzymes of adipic acid reverse degradation pathway into a succinic acid overproducing strain *Escherichia coli* FMME N-2, an engineered *E. coli* JL00 capable of producing 0.34 g/L adipic acid was constructed. Subsequently, the expression level of the rate-limiting enzyme was optimized and the adipic acid titer in shake-flask fermentation increased to 0.87 g/L. Moreover, the supply of precursors was balanced by a combinatorial strategy consisting of deletion of *sucD*, over-expression of *acs*, and mutation of *lpd*, and the adipic acid titer of the resulting *E. coli* JL12 increased to 1.51 g/L. Finally, the fermentation process was optimized in a 5 L fermenter. After 72 h fed-batch fermentation, adipic acid titer reached 22.3 g/L with a yield of 0.25 g/g and a productivity of 0.31 g/(L·h). This work may serve as a technical reference for the biosynthesis of various dicarboxylic acids.

Keywords: *Escherichia coli*; metabolic engineering; adipic acid; fermentation optimization

己二酸又称为肥酸，是一种具有广阔工业应用价值的二元羧酸^[1]。作为一种重要的大宗化学品，己二酸已被美国能源部列为 12 种最有市场价值的生物基化学品^[2]。目前，其全球年产量约 285 万 t，产值约 47 亿美元，且保持年均 4.1% 的增长^[3]。己二酸是尼龙-66 生产的关键前体之一。此外，其还在医药、化工和材料等领域中有着广泛的应用^[4]。

己二酸的生产方法主要有化学合成法和生物合成法 2 种。化学合成法现阶段的成熟工艺是将环己酮和环己醇混合后经硝酸氧化生成^[2]。然而，基于石化路线生产己二酸是一种非环境友好型的生产方式。在生产过程中释放的 N₂O 等

温室气体不可避免会对环境造成污染^[1]。因此，开发一种绿色、清洁的生产方式对于己二酸的生产至关重要。随着生物技术的快速发展，利用生物法合成己二酸逐渐引起了人们的广泛关注^[5]。目前，己二酸的生物合成法主要有酶转化法和微生物发酵法 2 种。例如，通过体外酶促反应催化合成己二酸^[6]的报道中，以聚酮化合物(polyketides, PKS)为底物体外酶转化可以合成己二酸^[6]。但是极低的产量限制了其在工业化生产中的应用。生物发酵法利用代谢工程等技术手段，改造胞内代谢流量、流速和流向，使微生物以廉价碳源为底物合成己二酸，具有一定工业化生产潜力。

目前, 发酵法合成己二酸的路径主要有以下 3 种: 逆向 β 氧化途径^[7]、碳链衍生途径^[8]和逆己二酸降解 (reverse adipate-degradation pathway, RADP) 途径^[9]。(1) 逆向 β 氧化途径: Yu 等^[8]在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中过量表达逆向 β 氧化途径酶, 最终经过发酵获得 639 $\mu\text{g/L}$ 己二酸, 首次实现了大肠杆菌中己二酸的从头合成; (2) 碳链衍生途径: Li 等^[7]将逆 β -氧化途径与 ω -氧化途径相结合, 并对菌株进行代谢工程改造和发酵优化, 在 168 h 己二酸产量达到 2.96 g/L; (3) RADP 途径: Deng 等^[10]在添加有 5-羧基-2-烯戊-CoA 还原酶(Tfu_1647)的褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)菌株细胞破碎液中检测到少量己二酸的积累。对 *T. fusca* B6 突变株进一步研究后发现: 该菌株中存在一条天然的 RADP。接着通过组学技术对此途径涉及的酶和基因进行挖掘, 成功解析了该合成路径^[11]。对该菌株进行 70 h 分批补料发酵后, 己二酸的产量可达到 2.23 g/L^[10]。随后, Zhao 等^[9]通过将 *T. fusca* 菌株的己二酸合成路径引入 *E. coli* BL21(DE3)菌株中, 并通过代谢工程改造成功获得了大肠杆菌己二酸高产菌株。最终以葡萄糖和甘油为底物, 经 96 h 的分批补料发酵, 己二酸的产量可达 68 g/L。

为了实现己二酸的发酵生产, 本研究首先在一株产琥珀酸野生型大肠杆菌中引入 RADP 途径实现己二酸的合成; 然后, 利用体外代谢路径重构策略, 鉴定 RADP 途径限速酶是 Tfu_1647; 通过引入不同的核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS) 组合对路径进行优化, 提高了己二酸的合成效率; 接着对上游路径中的关键靶点进行改造, 在平衡乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 的供应的基础上进一步提高了己二酸的产量; 随后在 5 L 发酵罐中分别从补糖浓度、通气量和诱导剂浓度 3 个方

面对发酵工艺进行优化。最终在 5 L 发酵罐中, 经 72 h 的分批补料发酵, 己二酸的产量达到 22.3 g/L, 转化率为 0.25 g/g, 生产强度为 0.31 g/(L·h)。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

供试验所用的重组菌株和质粒分别见表 1 和表 2。

1.2 主要试剂

供试验所用的酶制剂均购自宝生物工程(大连)有限公司(大连 TaKaRa 公司), 其中一步同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 供试验所用试剂盒和抗生素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 引物由天霖生物科技(无锡)有限公司合成; 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L。

LBG 培养基: 含 20 g/L 葡萄糖的 LB 培养基。

发酵培养基: 玉米浆 7.5 g/L, K_2HPO_4 1.4 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.3 g/L, 20 g/L 葡萄糖。

葡萄糖在 115 $^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 15 min, 其他成分在 121 $^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 20 min。

1.4 方法

1.4.1 表达载体的构建

采用一步同源重组法来构建重组质粒。采用的 *acs*、*lpd*、*pank*、*sucD* 和 *sdhA* 基因来源于 *E. coli* MG1655, 来自褐色嗜热裂孢菌(*T. fusca*)的 *Tfu_0875*、*Tfu_2399*、*Tfu_0067*、*Tfu_1647*、*Tfu_2576-7* 基因由苏州金唯智生物科技有限公司进行密码子优化和合成。所有 PCR 引物(表 3)和表达载体的 Sanger 测序均由天霖生物科技(无锡)有限公司进行。

表 1 本研究所使用的菌种

Table 1 Strains used in this study

Strains	Features	Sources
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	Wild-type <i>E. coli</i> strain	Storage in laboratory
<i>E. coli</i> MG1655	Wild-type <i>E. coli</i> strain	Storage in laboratory
<i>E. coli</i> DH5 α	Wild-type <i>E. coli</i> strain	Storage in laboratory
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Wild-type <i>E. coli</i> strain	Storage in laboratory
<i>E. coli</i> W3110	Wild-type <i>E. coli</i> strain	Storage in laboratory
<i>E. coli</i> FMME N-2	After ARTP mutagenesis breeding from <i>E. coli</i> FMME-N screened from rumen of camel (CCTCC M2018568 ^[12])	Storage in laboratory
<i>E. coli</i> JL00	<i>E. coli</i> FMME N-2 containing plasmids pTR-0 and pTE-0, Amp ^R , Cm ^R	This study
<i>E. coli</i> JL01	<i>E. coli</i> FMME N-2 containing plasmids pTR-0 and pTE-1, Amp ^R , Cm ^R	This study
<i>E. coli</i> JL02	<i>E. coli</i> FMME N-2 containing plasmids pTR-0 and pTE-2, Amp ^R , Cm ^R	This study
<i>E. coli</i> JL03	<i>E. coli</i> FMME N-2 containing plasmids pTR-0 and pTE-3, Amp ^R , Cm ^R	This study
<i>E. coli</i> JL04	<i>E. coli</i> JL01 with genome <i>acs</i> original promoter replaced by pJ23119	This study
<i>E. coli</i> JL05	<i>E. coli</i> JL01 with genome <i>pank</i> original promoter replaced by pJ23119	This study
<i>E. coli</i> JL06	<i>E. coli</i> JL01 with genome <i>lpd</i> mutation	This study
<i>E. coli</i> JL07	<i>E. coli</i> JL01 Δ <i>sdhA</i>	This study
<i>E. coli</i> JL08	<i>E. coli</i> JL01 Δ <i>sucD</i>	This study
<i>E. coli</i> JL09	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>acs</i> original promoter replaced by pJ23119	This study
<i>E. coli</i> JL10	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>pank</i> original promoter replaced by pJ23119	This study
<i>E. coli</i> JL11	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>lpd</i> mutation	This study
<i>E. coli</i> JL12	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>acs</i> promoter replacement and <i>lpd</i> mutation	This study
<i>E. coli</i> JL13	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>pank</i> promoter replacement and <i>lpd</i> mutation	This study
<i>E. coli</i> JL14	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>acs</i> and <i>pank</i> promoter replacement	This study
<i>E. coli</i> JL15	<i>E. coli</i> JL08 with genome <i>acs</i> , <i>pank</i> promoter replacement and <i>lpd</i> mutation	This study

表 2 本研究所使用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Features	Sources
pTrcHisA	pTrc promoter, Amp ^R , pBR322 ori	Storage in laboratory
pTet	pTet promoter, Cm ^R , p15A ori	Storage in laboratory
pTR-0	pTrcHisA, Amp ^R , pTrcHisA- <i>Tfu_0875-Tfu_2399-Tfu_0067</i> , pBR322 ori	This study
pTE-0	pTet, pTet- <i>Tfu_1647</i> , <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A ori	This study
pTE-1	pTet, pTet- <i>Tfu_1647</i> (H), <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A ori	This study
pTE-2	pTet, pTet- <i>Tfu_1647</i> (M), <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A ori	This study
pTE-3	pTet, pTet- <i>Tfu_1647</i> (L), <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A ori	This study
pET28a-1	pET28a, pET28a- <i>Tfu_0875</i> , Kan ^R , f1 ori	This study
pET28a-2	pET28a, pET28a- <i>Tfu_2399</i> , Kan ^R , f1 ori	This study
pET28a-3	pET28a, pET28a- <i>Tfu_0067</i> , Kan ^R , f1 ori	This study
pET28a-4	pET28a, pET28a- <i>Tfu_1647</i> , Kan ^R , f1 ori	This study
pET28a-5	pET28a, pET28a- <i>Tfu_2576-7</i> , Kan ^R , f1 ori	This study
pETM6R1-RBS _L -GFP	pETM6R1 link to <i>GFP</i> gene with low expression level	This study
pETM6R1-RBS _M -GFP	pETM6R1 link to <i>GFP</i> gene with medium expression level	This study
pETM6R1-RBS _H -GFP	pETM6R1 link to <i>GFP</i> gene with high expression level	This study
pCas9	araBAD promoter, Kan ^R , repA101 ori	Storage in laboratory
pTargetF	sgRNA, Spe ^R	Storage in laboratory

表3 本研究所使用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer names	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>Tfu_0875-F</i>	CAGTGATAGAGAAAAGAATTCAAAGAGGAGAAAATG	36
<i>Tfu_0875-R</i>	AGCTTGCACGGTCCACTGACTCAGACTCGATAGC	34
<i>Tfu_2399-F</i>	TACTTACGATCGTTCCTAACTCGTCATTATGCAT	34
<i>Tfu_2399-R</i>	ATCGCCGAGTTACGATAGTGTACTCTCACAG	32
<i>Tfu_0067-F</i>	GAGCTTCTAGATTACTGCATTCTGTGTACTGTGA	35
<i>Tfu_0067-R</i>	TCACGCCGGCCATCGATGACGAGAATCCATGCTCGTAC	38
<i>Tfu_1647-F</i>	GATGATTAATTGTCAAAGCTTTTCAGGCAATCCGTT	37
<i>Tfu_1647-R</i>	CACACAGGAAACAGACCATGAATCAGCCCCTGAAT	35
<i>Tfu_2576-7-F</i>	ATATTTCGATCACTCATATGCATTTCGCTAACCTGAC	35
<i>Tfu_2576-7-R</i>	ACGTTTGTAAAGGTGTGTATCTTGCTGCAGCTTG	34
RBS-F _L	ATAGCTCTGGTGTATTGCAATCAATTCATTGACCATCTAAGTA	43
RBS-F _M	CGAGATCTATAAATTTGCGAGTGCTGTATTCTCTCTCCCTA	43
RBS-F _H	ATGGCGATTTCTCCACGCCGCTCTTGCTCTCCATTCG	40
RBS-R	TGCCTTAACGGTTCGAAAGAAGTTCGAGACCATCGAGCT	39
<i>acs-F</i>	ATCTGCAGAAAGAACAAGGGCGTTCAACG	29
<i>acs-R</i>	TACATATGAAAATCATTAGCATTAAAGGAGAAA	32
<i>lpd-F</i>	CCGCCATTTTGTGAAAGCTTAGATCTATAC	30
<i>lpd-R</i>	AACCTCTAGGAATGAGCTCGCGTAAGTGCGAGTC	34
<i>pank-F</i>	CTAGGCCTACGCTCGAGTACTTCTTCCATTGCGA	34
<i>pank-R</i>	CGTTGATCGCCAGGTCATCGCGTAGAAGTTGAA	33
<i>sucD-F</i>	TGCAGTAAAAGCCGTTGGTGGTGGTTCTA	29
<i>sucD-R</i>	CGATGTGTGGAATTGTTGGCGGTTTCAGAG	29
<i>sdhA-F</i>	GCTCGAGTACTACTAATTCTGATCCGATC	29
<i>sdhA-R</i>	GACCTCAATGCTTAGAAGTTCTAAGTAG	28

以质粒 pET28a-1-5 为模板, 用引物对 *Tfu_0875-F/R*、*Tfu_2399-F/R* 和 *Tfu_0067-F/R* 分别扩增 *Tfu_0875*、*Tfu_2399* 和 *Tfu_0067* 基因, 采用标准分子克隆操作构建重组质粒 pTR-0。同理, 用引物对 *Tfu_1647-F/R* 和 *Tfu_2576-7-F/R* 分别扩增相应基因, 双酶切载体 pTet 的限制性酶切位点 *Bgl* II/*Hind* III 并用 T4 DNA 连接酶连接产生重组质粒 pTE-0。

以 pET28a-eGFP 为模板, 用引物对 RBS-F_i (i: L, M, H)/RBS-R 扩增 *eGFP* 基因。经过同源重组连接到载体 pETM6R1 的 *Xba* I/*Xho* I 位点, 产生质粒 pETM6R1-RBS_L-GFP、pETM6R1-RBS_M-GFP、pETM6R1-RBS_H-GFP。

采用 CRISPR-Cas9 技术^[13]对出发菌株 *E. coli* FMME N-2 基因组中的基因 *acs*、*lpd* 和 *pank* 分别进行改造。采用融合 PCR 的方法将 *acs* 上下游同源臂和带有 pJ23119 启动子的片段进行连接, 获得 *acs* 整合框, 将其与质粒 pTargetF 和 pCas 共同转入菌株 *E. coli* FMME N-2 中筛选获得阳性克隆, 消除质粒后获得 *acs* 基因整合的菌株 *E. coli* JL04。采用相同的方法构建 *lpd* 和 *pank* 基因改造的菌株 *E. coli* JL05 和 *E. coli* JL06。采用上述方法获得 *sucD* 和 *sdhA* 基因敲除盒, 将其与质粒 pCas 和 pTargetF 共同转入菌株 *E. coli* FMME N-2 中, 筛选获得阳性克隆 *E. coli* JL07 和 *E. coli* JL08。

1.4.2 培养方法

种子培养：平板单菌落接种于液体 LB 培养基，37 °C、200 r/min 培养 10–12 h 后形成一级种子；随后按照 2%接种量转接至 50 mL 液体 LB 培养基中，相同条件培养 8 h 后形成二级种子。

摇瓶培养：取 8 mL 的二级种子培养液，接种于 80 mL 的发酵培养基中，分为两阶段发酵：种子培养条件提供氧气培养 12 h 后转至无菌厌氧瓶中，添加碳酸镁使 pH 维持 6.2 以上；葡萄糖浓度控制在 10–20 g/L，72 h 后发酵结束。

5 L 发酵罐培养：取 10% (体积分数)的二级种子液，接种至 3 L 装液量的发酵罐中，分为两阶段补料分批发酵：有氧阶段初始条件为转速 400 r/min，通气量 3 vvm，温度 37 °C，氨水控制 pH 至 7.0，待初始葡萄糖消耗完全后，调整补料速率和通气量，同时转速调至 200 r/min，添加 2 mol/L 氨水维持 pH 为 6.5，直至 72 h 发酵结束。

1.4.3 分析方法

气相色谱检测己二酸浓度：取发酵液 2 mL，12 000 r/min 离心 10 min，上清液用 2 mL 乙酸乙酯萃取，取 1 mL 有机相用氮气吹干。添加含甲醇、硫酸、三氯甲烷(体积比 30:3:1)的混合液 5 mL，70 °C 反应 1 h，加入 200 μ L N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和三甲基氯硅烷混合液(体积比 99:1)，65 °C 反应 30 min，用氮气吹干后加入 1 mL 正己烷检测。检测参数如下：载气为氮气，流量 1 mL/min，进样量 1 μ L；柱温 50 °C，维持 1 min 后，以 10 °C/min 速度升高至 240 °C，保持 5 min。

2 结果与分析

2.1 己二酸生产菌株的构建

为了实现己二酸的高效合成，本研究通过整合糖酵解途径、三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环和 RADP 途径，设计了以葡萄糖为底

物，利用乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 为前体物质，经路径酶 Tfu_0875、Tfu_2399、Tfu_0067、Tfu_1647、Tfu_2576-7 参与的己二酸合成代谢途径(图 1)。

充足的前体物质供应对于己二酸高效合成至关重要。分别选取了菌株 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* MG1655、*E. coli* FMME N-2、*E. coli* W3110，利用 LBG 液体培养基进行胞内乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 浓度检测。结果表明，在培养过程中所有菌株的胞内乙酰辅酶 A 含量基本相近，而菌株 *E. coli* FMME N-2 胞内琥珀酰辅酶 A 含量明显高于其他菌株。因此，选择 *E. coli* FMME N-2 菌株作为底盘菌株(图 2)。

为降低单质粒表达多基因的负荷，如图 1 所示，将己二酸合成路径上游 3 个基因和下游 3 个基因分别插入表达载体 pTrcHisA 和 pTet-1 中，获得重组质粒 pTrcHisA-0875-2399-0067 和 pTet-1647-2576-7，同时转化至底盘菌株 *E. coli* FMME N-2 中，获得工程菌株 *E. coli* JL00。经 72 h 的摇瓶发酵实验，菌株 *E. coli* JL00 己二酸产量为 0.34 g/L，得率为 0.08 g/g 葡萄糖，而对照菌株 *E. coli* FMME N-2 无己二酸积累。上述结果表明，工程菌株可以利用葡萄糖合成己二酸，但是合成效率较低，可能是因为合成路径存在限速酶。

2.2 己二酸的合成路径的优化

为提高己二酸合成效率，利用体外代谢重构策略鉴定己二酸合成路径限速瓶颈。本研究选择 3-氧代己二酰辅酶 A 作为代谢分节点，将己二酸合成路径划分为反应体系 I 和 II，其中每个反应体系的终点均涉及游离辅酶 A 的释放，可方便反应速率检测(图 3A)。对 5 种路径酶分别进行表达纯化后，依次对反应体系 I 和 II 进行测试。首先，控制 2 个反应体系中每种

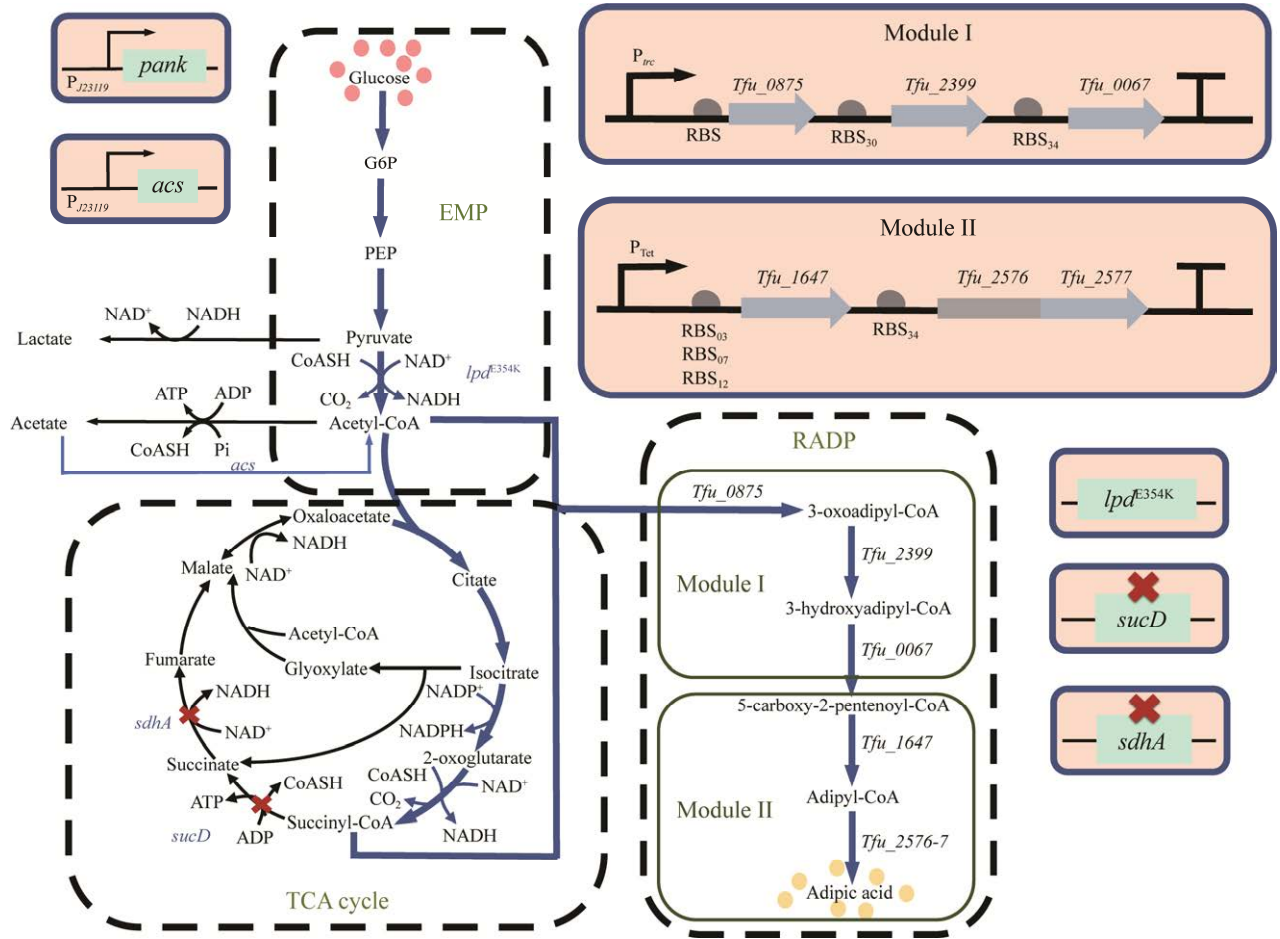
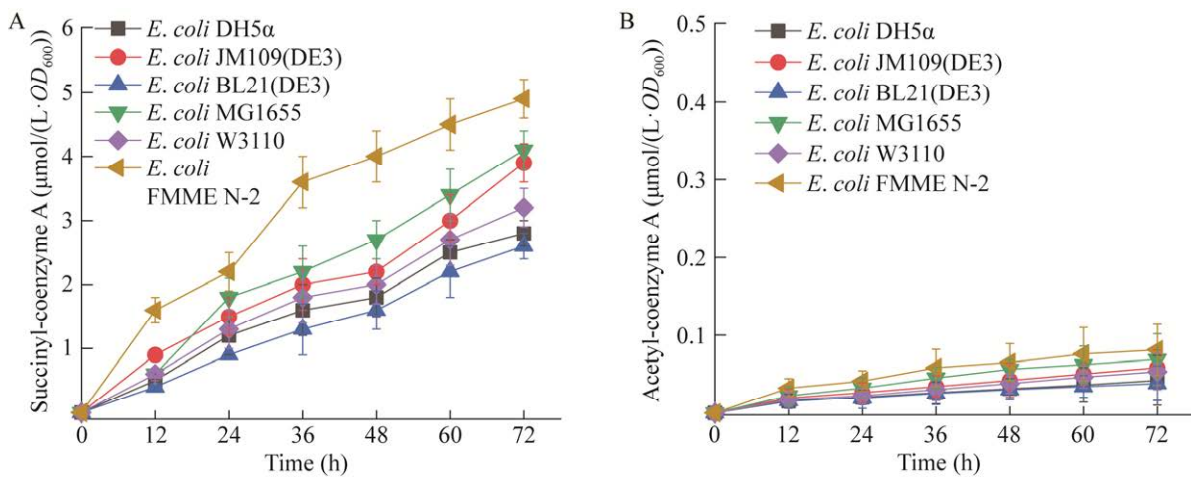


图1 己二酸合成途径设计

Figure 1 Design of adipic acid biosynthesis pathway.

图2 不同 *Escherichia coli* 菌株胞内前体物质浓度测定Figure 2 Determination of intracellular precursor concentrations in different *Escherichia coli* strains. A: Succinyl-coenzyme A. B: Acetyl-coenzyme A.

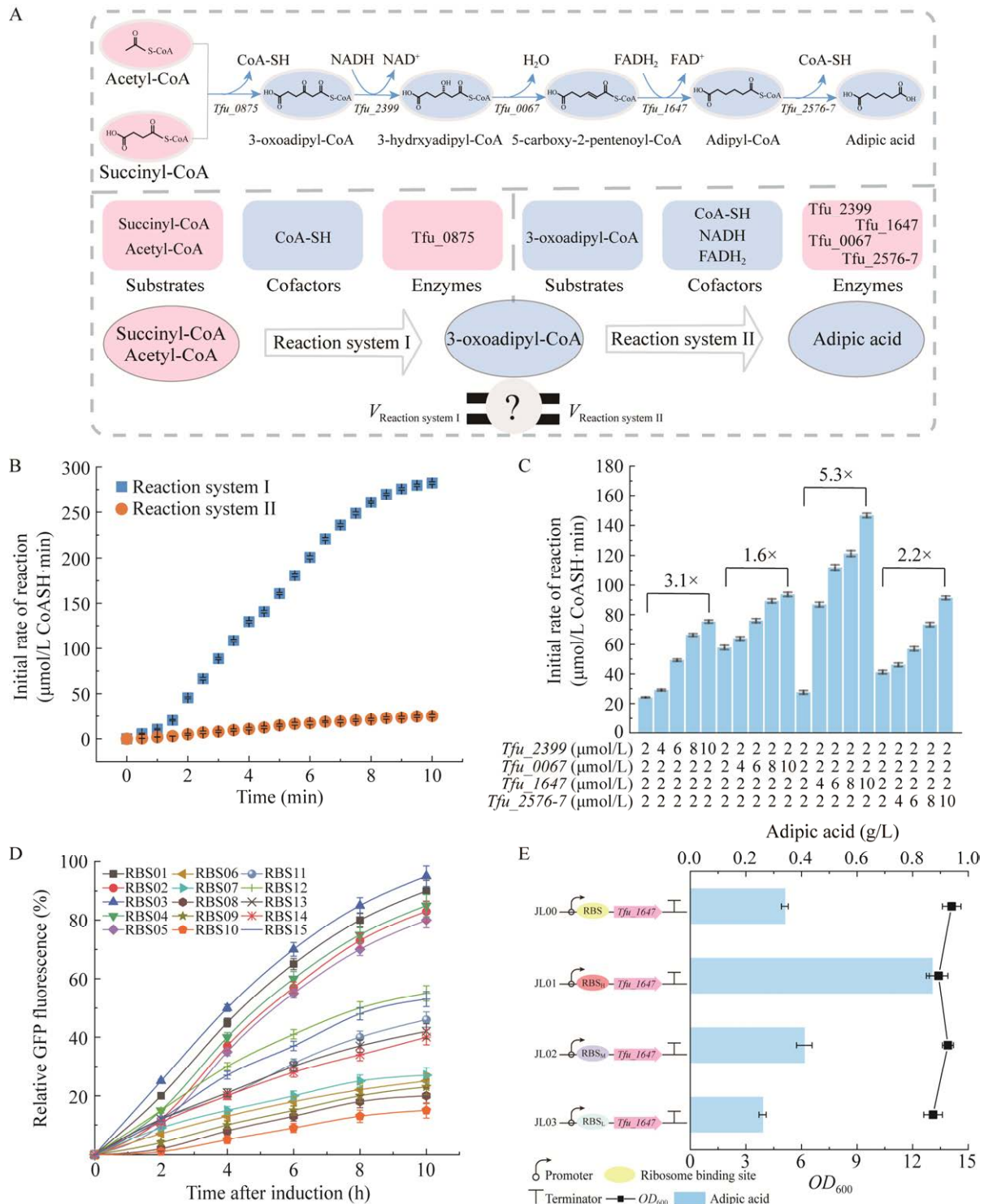


图3 己二酸合成路径限速瓶颈的鉴定与解除

Figure 3 Identification and removal of rate-limiting bottlenecks in the biosynthesis pathway of adipic acid. A: Modular design of *in vitro* reaction system. B: Determination of initial reaction rate of reaction system I. C: Determination of initial reaction rate of reaction system II. D: Assessment of the strength of different RBS. E: Evaluation of shaking flask fermentation of different strains.

路径酶为 2 $\mu\text{mol/L}$, 反应体系 II 的初始反应速率仅为反应体系 I 的 8.9% (图 3B), 表明反应体系 II 是己二酸合成的限速瓶颈; 其次, 为明确反应体系 II 中具体的限速酶, 在固定其他条件不变的情况下, 依次调整 Tfu_2399、Tfu_0067、Tfu_1647 和 Tfu_2576-7 的添加浓度, 测定初始反应速率。当 Tfu_2399、Tfu_0067、Tfu_1647 和 Tfu_2576-7 的酶浓度提高至 5 倍时, 反应体系 II 初始反应速率分别提高 3.1、1.6、5.3 和 2.2 倍, 表明 Tfu_1647 是关键限速酶(图 3C)。

为了解除己二酸合成路径限速瓶颈, 引入不同强度 RBS 调节限速酶 Tfu_1647 的表达量。首先, 通过在线 RBS Calculator v 2.0 选择了 15 个不同的 RBS 序列, 并利用增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 荧光密度评估每种 RBS 序列的强度。结果如图 3D 所示, 其中, RBS03 为高强度, RBS12 为中强度, RBS07 为低强度。将上述 3 种 RBSs 分别替换 Tfu_1647 中的 RBS 序列, 获得不同强度 Tfu_1647 的工程菌株, 依次命名为 *E. coli* JL01、*E. coli* JL02、*E. coli* JL03。经 72 h 摇瓶发酵后, 最优菌株 *E. coli* JL01 己二酸的产量和得率分别达到 0.87 g/L 和 0.12 g/g 葡萄糖, 较对照菌株 *E. coli* JL00 分别提高至 2.56 倍和 1.50 倍(图 3E)。然而, 虽然解除了合成路径中存在的代谢瓶颈, 己二酸得率仍然远低于理论得率(0.52 g/g 葡萄糖)。因此, 需要对上游前体供应路径进行强化, 以提高己二酸的合成效率。

2.3 改造中心代谢途径以平衡前体供应

RADP 途径涉及 2 种前体物质, 分别是乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A。首先, 为了增加胞内乙酰辅酶 A 的浓度, 采用 3 种代谢工程策略: (1) 在基因组水平上, 将编码乙酰辅酶 A 合成酶的 *acs* 基因本源启动子替换为强启动子 PJ23119, 促使副产物乙酸直接转化为乙酰辅酶

A, 新菌株命名为 *E. coli* JL04; (2) 在基因组水平上, 将编码的泛酸激酶的 *pank* 基因本源启动子替换为强启动子 PJ23119, 以促进胞内辅酶 A 的直接合成, 新菌株命名为 *E. coli* JL05; (3) 将编码二氢硫辛酸脱氢酶的 *lpd* 基因第 354 位谷氨酸突变为赖氨酸, 以促进丙酮酸向乙酰辅酶 A 的转化, 新菌株命名为 *E. coli* JL06。

为了验证经过代谢改造后菌株的胞内乙酰辅酶 A 浓度是否增加, 从产量、细胞生长和胞内乙酰辅酶 A 含量 3 个方面进行了比较分析。

(1) 在己二酸产量方面, 强化乙酰辅酶 A 供应的 3 种策略均有利于己二酸的合成, 其中最优秀菌株是 *E. coli* JL04, 己二酸产量和得率分别达到 1.23 g/L 和 0.13 g/g 葡萄糖, 较对照菌株 *E. coli* JL01 分别提高至 1.41 倍和 1.08 倍; (2) 在细胞生长方面, 强化乙酰辅酶 A 供应的工程菌株最大 OD_{600} 均出现轻微减弱, 其中己二酸产量最优菌株 *E. coli* JL04 的最大 OD_{600} 为 10.6, 较对照菌株 *E. coli* JL01 下降了 31%; (3) 在胞内乙酰辅酶 A 浓度方面, 3 种强化策略均有效提升了胞内乙酰辅酶 A 浓度, 其中最优秀菌株 *E. coli* JL04 胞内乙酰辅酶 A 含量达到 0.058 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot OD_{600})$, 较对照菌株 *E. coli* JL01 提高至 4.14 倍。

琥珀酰辅酶 A 是 TCA 循环的中间代谢产物。为了增加胞内琥珀酰辅酶 A 的浓度, 采用了 2 种代谢工程策略: (1) 敲除编码琥珀酸脱氢酶黄蛋白亚基的 *sdhA* 基因, 以阻断琥珀酸向富马酸的转化, 新菌株命名为 *E. coli* JL07; (2) 敲除编码琥珀酰辅酶 A 连接酶 β 亚基的 *sucD* 基因, 以阻断琥珀酰辅酶 A 向琥珀酸的转化, 新菌株命名为 *E. coli* JL08。摇瓶发酵结果表明, 工程菌株 *E. coli* JL07 和 *E. coli* JL08 的最大 OD_{600} 均出现较大减弱, 较对照菌株分别下降了 51% 和 58%。其中敲除 *sucD*, 使得工程菌株 *E. coli* JL08 的己二酸的产量和得率分别为 1.34 g/L 和 0.15 g/g 葡萄糖

糖, 较对照菌株 *E. coli* JL01 分别提高至 1.54 倍和 1.25 倍, 同时, 菌株 *E. coli* JL07 和 *E. coli* JL08 的琥珀酰辅酶 A 浓度分别是 $8.9 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{600})$ 和 $10.3 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{600})$, 较对照菌株 *E. coli* JL01 分别提高 1.75 倍和 2.02 倍, 证明强化琥珀酰辅酶 A 供应的策略有利于己二酸的积累。

在对照菌株 *E. coli* JL01 中, 乙酰辅酶 A 含量 [$0.014 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{600})$] 远低于琥珀酰辅酶 A 含量 [$5.1 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{600})$], 2 种前体物质浓度相差约 360 倍。为了平衡双前体的供应, 需要增加乙酰辅酶 A 的供应。本研究在菌株 *E. coli* JL08 的基础上, 采用单独和组合强化乙酰辅酶 A 策略, 共构建了 7 种工程大肠杆菌 *E. coli* JL09-15 (表 1)。经摇瓶发酵测试, 最优菌株 *E. coli* JL12 的己二酸产量和得率分别达到了 1.51 g/L 和 0.18 g/g 葡萄糖, 较对照菌株 *E. coli* JL01 分别提高至 1.74 倍和 1.50 倍。菌株 *E. coli* JL12 的最大 OD_{600} 较对照菌株 *E. coli* JL01 下降约 28%。对 2 种前体物质浓度进行测定后发现, 菌株 *E. coli* JL12 的琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 分别为 $10.1 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{600})$ 和 $0.11 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD}_{600})$, 两者比值下降至约 90 倍(图 4)。上述研究结果表明, 通过组合优化策略平衡了双前体的供应, 有效提高了己二酸的产量和得率。

2.4 己二酸的发酵工艺优化

为研究工程菌株发酵罐水平生产己二酸的最优条件, 本研究分别从补糖浓度、通气量和诱导剂浓度 3 个方面对发酵工艺进行优化, 以提高己二酸产量。

首先, 在补料阶段, 比较了控制葡萄糖浓度在 4 个水平(0–2.5、2.5–5.0、5.0–7.5、7.5–10.0 g/L) 对己二酸产量和得率的影响。结果如图 5A、5B 所示, 在细胞生长方面, 随着葡萄糖浓度的升高, 细胞最大 OD_{600} 逐渐增加, 分别为 32.2、35.6、38.2 和 42.6; 在己二酸合成方面, 当葡

萄糖浓度控制为 2.5–5.0 g/L 时, 己二酸的产量最高为 15.8 g/L, 得率为 0.22 g/g 葡萄糖, 较优化前分别提高至 1.46 倍和 2.2 倍。

其次, 在补料阶段, 评估了设置不同通气量(0、0.5、1.0、1.5 vvm)对己二酸生产的影响。如图 5C 和 5D 所示, 在细胞生长方面, 随着通气量的升高, 细胞最大 OD_{600} 逐渐增加, 分别为 35.7、36.6、37.6 和 43.4; 在己二酸合成方面, 当通气量 0.5 vvm 时, 己二酸产量达到 17.3 g/L, 相比于优化前提高了 8.9%。然而, 当通气量继续上升至 1.5 vvm 时, 己二酸的产量下降至 13.7 g/L, 较优化前降低了 15.3%。因此, 本研究选择 0.5 vvm 作为己二酸发酵生产时的通气量。

最后, 研究了诱导剂异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)的不同浓度(1、3 和 5 mmol/L)对己二酸发酵生产的影响。如图 5E 和 5F 所示, 在细胞生长方面, 随着诱导剂浓度的升高, 细胞最大 OD_{600} 逐渐下降, 分别为 36.6、32.6 和 31.0; 在己二酸合成方面, 当诱导剂浓度为 3 mmol/L 时, 己二酸的产量达到 22.3 g/L, 进一步提升诱导剂浓度到 5 mmol/L 时, 己二酸的产量下降至 19.9 g/L。

3 讨论与展望

本研究以实验室保藏的 *E. coli* FMME N-2 作为底盘菌株, 通过生产菌株的构建、合成路径的优化以及前体供应的平衡, 成功构建了一株己二酸工程菌株 *E. coli* JL12。该菌株摇瓶发酵后己二酸的产量可达到 1.51 g/L。同时, 为了测试菌株的实际生产能力, 本研究在 5 L 发酵罐水平分别从补糖浓度、通气量和诱导剂浓度 3 个方面对己二酸发酵工艺进行优化。最终, 经分批补料发酵, 工程菌株己二酸的产量达到 22.3 g/L, 转化率为 0.25 g/g, 生产强度为 0.31 g/(L·h), 具备了一定的应用潜力。

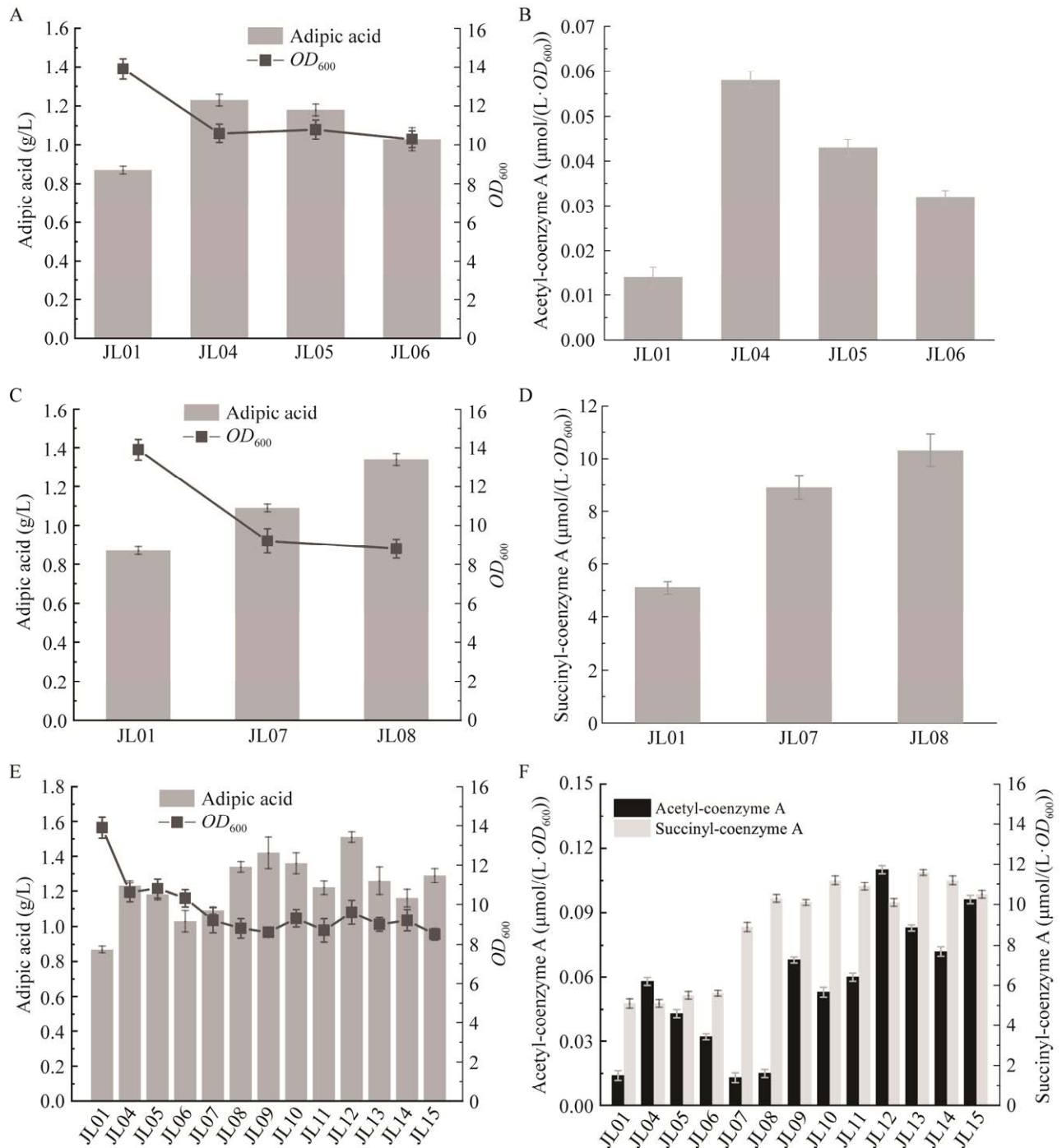


图 4 平衡前体供应促进己二酸合成

Figure 4 Adipic acid synthesis promoted by balancing precursor supply. A: Effect of acetyl-CoA enhancement strategy on titer and growth. B: Effect of acetyl-CoA enhancement strategy on intracellular acetyl-CoA. C: Effect of succinyl-CoA enhancement strategy on titer and growth. D: Effect of succinyl-CoA enhancement strategy on intracellular succinyl-CoA. E: Effects of combinatorial strategies on titer and growth. F: Effects of combination strategies on the synthesis of two intracellular precursors.

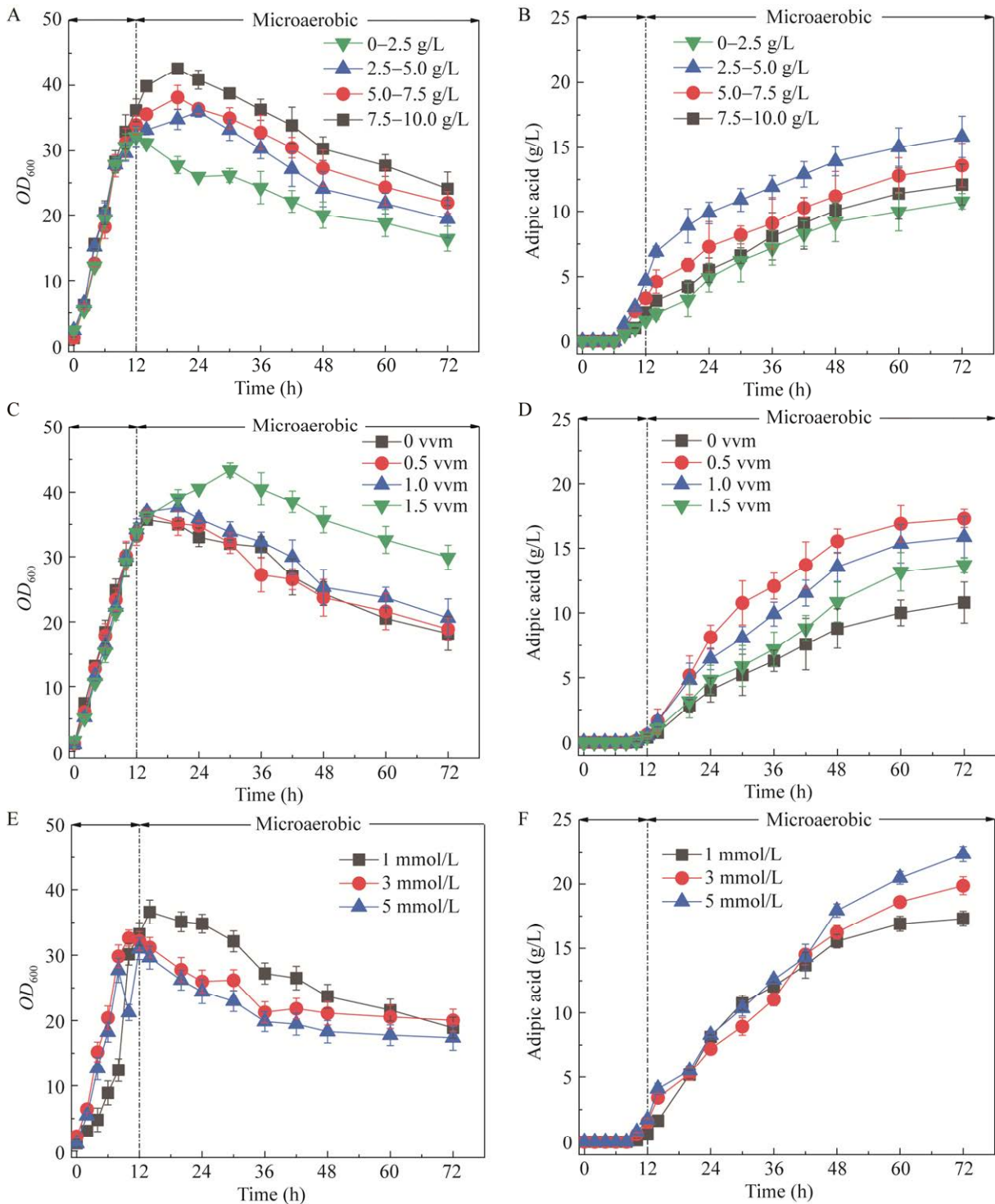


图5 己二酸的罐上发酵工艺优化

Figure 5 Fermentation optimization for adipic acid production. A: Effect of glucose concentration on cell growth. B: Effect of glucose concentration on adipic acid production. C: Effect of aeration on cell growth. D: Effect of aeration on adipic acid production. E: Effect of inducer concentrations on cell growth. F: Effect of inducer concentrations on adipic acid production.

区别于以往研究^[9], 本研究在己二酸工程菌株的构建过程中发现己二酸合成路径存在限速瓶颈。为了保证己二酸的高效合成, 本研究首次在路径中引入不同强度的 RBS, 通过调节限速酶的表达量来提高己二酸的产量。经 72 h 摇瓶发酵后, 最优菌株 *E. coli* JL01 己二酸的产量和得率分别较对照菌株 *E. coli* JL00 提高了 2.56 倍和 1.50 倍。此外, 前体供应失衡也是影响己二酸产量的重要因素。为此, 本研究首次运用组合优化策略平衡前体的供应, 采用过表达 *acs* 基因、突变 *lpd* 基因和敲除 *sucD* 基因的方式提高了胞内乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 的含量, 满足了己二酸合成的需要。最终, 最优菌株 *E. coli* JL12 的己二酸产量和得率分别较对照菌株 *E. coli* JL01 提高了 1.74 倍和 1.50 倍。

目前人工构建的己二酸生物合成路径有 3 种, 分别为逆向 β 氧化途径^[14]、碳链衍生途径^[15-16]和逆己二酸降解(RADP)途径^[17-20](表 4)。(1) 逆向 β 氧化途径是最早用于己二酸生物合成研究的代谢途径^[8], 该途径合成己二酸的最大理论得率为 0.52 g/g 甘油, 目前基于该途径对大肠杆菌进行代谢工程改造, 己二酸的产量可达 2.5 g/L, 得率为 0.35 g/g 甘油^[21]; (2) 碳链衍生途径是在逆向 β 氧化途径的基础上, 结合 ω -氧化途径用于己二酸的生物合成。碳链衍生途径通过将长

链脂肪酸不断缩短的方式生成己二酸, 同时释放乙酰辅酶 A 用于细胞生长。该路径可实现碳原子的有效利用, 合成己二酸的最大理论得率为 0.81 g/g 葡萄糖。目前基于该途径, 改造热带假丝酵母可以获得 12.1 g/L 己二酸, 得率为 0.16 g/g 葡萄糖^[22]; (3) 基于中心代谢途径的 RADP 途径合成己二酸的最大理论得率为 0.52 g/g 甘油, 虽然该途径在理论转化率上并不是最优的, 却是目前文献报道合成己二酸最成功的途径。基于该途径改造大肠杆菌, 可获得 68 g/L 己二酸, 得率为 0.43 g/g 甘油^[9]。

虽然本研究基于 RADP 途径对大肠杆菌进行代谢工程改造以及发酵工艺优化, 但是现阶段己二酸产量和转化率依然与已报道的文献和理论值存在差距。导致这一结果可能的原因有 4 个: (1) 路径酶的表达量不足。已报道最高产量的工程菌株采用 *E. coli* BL21(DE3)为底盘菌株, 通过 T₇ 启动子强化表达己二酸生物合成的路径酶。与之相比, 本研究仅通过 RBS 筛选调节了关键限速酶的表达量, 而对路径酶采用表达强度较弱的启动子 pTet 和 pTrc, 致使合成路径的表达未得到强化; (2) 关键限速酶的催化活性不足。本研究目前仅鉴定了路径中的关键限速酶, 尚未对限速酶进行酶工程改造; (3) 发酵工艺不同。已报道工程菌株采用甘油和葡萄糖

表 4 不同己二酸合成路径产量与产率对比

Table 4 Comparison of titer and yield of different adipic acid synthesis pathways

Pathways	Strains	Substrates	Cultivation	Titer (g/L)	Yield (g/g)	References
Reverse beta oxidation pathway	<i>E. coli</i>	Glucose	Shake flask batch	0.04	0.002	[22]
	<i>E. coli</i>	Glycerol	Shake flask batch	2.50	0.350	[20]
Carbon chain derivation pathway	<i>Candida tropicalis</i>	Glucose	5 L bioreactor Fed-batch	12.10	0.160	[21]
Reverse adipic acid degradation pathway	<i>T. fusca</i>	Glucose	Shake flask batch	2.23	0.005	[23]
	<i>E. coli</i>	Glycerol	5 L bioreactor Fed-batch	68.00	0.425	[9]
	<i>E. coli</i>	Glucose	5 L bioreactor Fed-batch	22.30	0.250	This study

双底物发酵工艺,同时所使用的培养基富含大量蛋白胨和酵母粉,可能更有利于己二酸的合成;(4)菌株上游路径的改造靶点不同。已报道最高产量的工程菌株已完成了对上游路径的改造,阻断了副产物乳酸和丁酸合成代谢途径,减少了碳代谢流的损失。

为了进一步提高己二酸的产量,在后续的研究中可以从以下4个方面进行探索:(1)提高限速酶的活力:通过酶工程的手段对关键限速酶进行蛋白质改造从而提高酶的催化活性将有利于己二酸的生物合成;(2)强化己二酸的合成路径:为了进一步提高路径的合成效率,通过启动子工程强化路径酶的表达可使己二酸的产量得以提高;(3)强化己二酸的外运能力:己二酸外运能力不足是抑制产物高效合成的重要因素之一。通过基因组挖掘技术筛选己二酸的外运蛋白将有助于提高己二酸的产量;(4)新靶点的挖掘和改造:随着系统生物学在代谢工程领域的广泛应用,通过组学技术对己二酸生产菌株进行分析,从上游路径中筛选出新的改造靶点将有助于提升菌株的整体生产性能。

REFERENCES

- [1] PUGH S, McKENNA R, HALLOUM I, NIELSEN DR. Engineering *Escherichia coli* for renewable benzyl alcohol production[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2015, 2: 39-45.
- [2] WANG F, ZHAO J, LI Q, YANG J, LI RJ, MIN J, YU XJ, ZHENG GW, YU HL, ZHAI C, ACEVEDO-ROCHA CG, MA LX, LI AT. One-pot biocatalytic route from cycloalkanes to α,ω -dicarboxylic acids by designed *Escherichia coli* consortia[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5035.
- [3] POLEN T, SPELBERG M, BOTT M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 167(2): 75-84.
- [4] LEE SY, KIM HU, CHAE TU, CHO JS, KIM JW, SHIN JH, KIM DI, KO YS, DAE JANG W, JANG YS. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(1): 18-33.
- [5] NIU W, DRATHS KM, FROST JW. Benzene-free synthesis of adipic acid[J]. *Biotechnology Progress*, 2002, 18(2): 201-211.
- [6] HAGEN A, POUST S, de ROND T, FORTMAN JL, KATZ L, PETZOLD CJ, KEASLING JD. Engineering a polyketide synthase for *in vitro* production of adipic acid[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(1): 21-27.
- [7] LI Y, CHENG ZZ, ZHAO CL, GAO C, SONG W, LIU LM, CHEN XL. Reprogramming *Escherichia coli* metabolism for bioplastics synthesis from waste cooking oil[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(8): 1966-1979.
- [8] YU JL, XIA XX, ZHONG JJ, QIAN ZG. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(12): 2580-2586.
- [9] ZHAO M, HUANG DX, ZHANG XJ, KOFFAS MAG, ZHOU JW, DENG Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for producing adipic acid through the reverse adipate-degradation pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 254-262.
- [10] DENG Y, MA LZ, MAO Y. Biological production of adipic acid from renewable substrates: current and future methods[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 105: 16-26.
- [11] ZHAO M, LI GH, DENG Y. Engineering *Escherichia coli* for glutarate production as the C₅ platform backbone[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(16): e00814-18.
- [12] KALLSCHEUER N, GÄTGENS J, LÜBCKE M, PIETRUSZKA J, BOTT M, POLEN T. Improved production of adipate with *Escherichia coli* by reversal of β -oxidation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(6): 2371-2382.
- [13] JIANG Y, CHEN B, DUAN CL, SUN BB, YANG JJ, YANG S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [14] BURGARD AP, PHARKYA P, OSTERHOUT RE. Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds: US8216814[P]. 2012-07-10.
- [15] 刘立明, 丁强, 陈修来, 高聪, 郭亮, 胡贵鹏, 刘佳. 一种生产己二酸的重组菌, 构建方法和应用: CN114107153A[P]. 2022-03-01.
- LIU LM, DING Q, CHEN XL, GAO C, GUO L, HU GP, LIU J. Recombinant bacterium for producing

- adipic acid, construction method and application: CN114107153A[P]. 2022-03-01 (in Chinese).
- [16] 陈修来, 李洋, 刘立明, 赵春雷, 张永艺, 高聪, 刘佳, 郭亮. 一株产己二酸的重组大肠杆菌的构建及应用: CN113293120A[P]. 2021-08-24.
CHEN XL, LI Y, LIU LM, ZHAO CL, ZHANG YY, GAO C, LIU J, GUO L. Construction and application of recombinant *Escherichia coli* for producing adipic acid: CN113293120A[P]. 2021-08-24 (in Chinese).
- [17] BURGARD AP, PHARKYA P, OSTERHOUT RE. Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds[P]. Canada, CA2995870. 2022-11-01.
- [18] BURGARD AP, PHARKYA P, OSTERHOUT RE. Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds: US9382556[P]. 2016-07-05.
- [19] BURGARD AP, PHARKYA P, OSTERHOUT RE. Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds: US2020248189[P]. 2020-08-06.
- [20] BURGARD AP, PHARKYA P, OSTERHOUT RE. Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds: US11293026[P]. 2022-04-05.
- [21] CHEONG S, CLOMBURG JM, GONZALEZ R. Energy- and carbon-efficient synthesis of functionalized small molecules in bacteria using non-decarboxylative Claisen condensation reactions[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(5): 556-561.
- [22] JU JH, OH BR, HEO SY, LEE YU, SHON JH, KIM CH, KIM YM, SEO JW, HONG WK. Production of adipic acid by short- and long-chain fatty acid acyl-CoA oxidase engineered in yeast *Candida tropicalis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(1): 33-43.
- [23] DENG Y, MAO Y. Production of adipic acid by the native-occurring pathway in *Thermobifida fusca* B6[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(4): 1057-1063.

(本文责编 郝丽芳)