

• 工业生物技术 •

# 调控大肠杆菌胞内 ATP 和 NADH 水平促进琥珀酸生产

王学明<sup>1,2</sup>, 潘静宇<sup>1,2</sup>, 吴静<sup>3</sup>, 陈修来<sup>1,2</sup>, 高聪<sup>1,2</sup>, 宋伟<sup>3</sup>, 魏婉清<sup>3</sup>, 刘佳<sup>1,2</sup>, 刘立明<sup>1,2\*</sup>

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

王学明, 潘静宇, 吴静, 陈修来, 高聪, 宋伟, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 调控大肠杆菌胞内 ATP 和 NADH 水平促进琥珀酸生产[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3236-3252.

WANG Xueming, PAN Jingyu, WU Jing, CHEN Xiulai, GAO Cong, SONG Wei, WEI Wanqing, LIU Jia, LIU Liming. Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3236-3252.

**摘要:** 琥珀酸作为一种重要的 C4 平台化合物, 广泛应用于食品、化学、医药等领域。利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)发酵生产琥珀酸受胞内辅因子不平衡的影响, 存在产率低、生产强度低、副产物多等问题。为此, 对不同氧气条件下琥珀酸产量和化学计量学分析发现, 微厌氧条件下 *E. coli* FMME-N-26 高效积累琥珀酸需要借助三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)为还原性三羧酸途径(reductive tricarboxylic acid pathway, r-TCA)提供足够的 ATP 和 NADH。通过减少 ATP 消耗、强化 ATP 合成、阻断 NADH 竞争途径和构建 NADH 回补路径等代谢工程策略, 组合调控胞内 ATP 与 NADH 含量, 获得工程菌株 *E. coli* FW-17。通过发酵条件优化, 菌株 *E. coli* FW-17 在 5 L 发酵罐能积累 139.52 g/L 琥珀酸, 比出发菌株提高了 17.81%, 乙酸浓度为 1.40 g/L, 降低了 67.59%。进一步在 1 000 L 发酵罐中进行放大实验, 琥珀酸产量和乙酸浓度分别为 140.2 g/L 和 1.38 g/L。

**关键词:** 琥珀酸; 大肠杆菌; 代谢工程; 辅因子平衡

资助项目: 国家自然科学基金(22208124, 32000037); 江苏省自然科学基金(BK20211529, BK20200614)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22208124, 32000037) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20211529, BK20200614).

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

Received: 2022-12-21; Accepted: 2023-02-20; Published online: 2023-03-08

# Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production

WANG Xueming<sup>1,2</sup>, PAN Jingyu<sup>1,2</sup>, WU Jing<sup>3</sup>, CHEN Xiulai<sup>1,2</sup>, GAO Cong<sup>1,2</sup>, SONG Wei<sup>3</sup>, WEI Wanqing<sup>3</sup>, LIU Jia<sup>1,2</sup>, LIU Liming<sup>1,2\*</sup>

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

2 International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

**Abstract:** Succinic acid is an important C4 platform chemical that is widely used in food, chemical, medicine sectors. The bottleneck of fermentative production of succinic acid by engineered *Escherichia coli* is the imbalance of intracellular cofactors, which often leads to accumulation of by-products, lower yield and low productivity. Stoichiometric analysis indicated that an efficient production of succinic acid by *E. coli* FMME-N-26 under micro-aeration conditions might be achieved when the TCA cycle provides enough ATP and NADH for the r-TCA pathway. In order to promote succinic acid production, a serial of metabolic engineering strategies include reducing ATP consumption, strengthening ATP synthesis, blocking NADH competitive pathway and constructing NADH complementary pathway were developed. As result, an engineered *E. coli* FW-17 capable of producing 139.52 g/L succinic acid and 1.40 g/L acetic acid in 5 L fermenter, which were 17.81% higher and 67.59% lower than that of the control strain, was developed. Further scale-up experiments were carried out in a 1 000 L fermenter, and the titer of succinic acid and acetic acid were 140.2 g/L and 1.38 g/L, respectively.

**Keywords:** succinic acid; *Escherichia coli*; metabolic engineering; cofactor balance

作为一种重要的 C4 平台化合物,琥珀酸广泛应用于食品、化学、医药等工业领域<sup>[1]</sup>,被美国能源部列为 12 种最有潜力的大宗生物基化学品首位<sup>[2]</sup>。利用可再生资源为原料,通过微生物发酵生产琥珀酸,成为最受关注的方法。能发酵生产琥珀酸的菌种包括产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)<sup>[3]</sup>、产琥珀酸曼氏杆菌(*Mannheimia succiniciproducens*)<sup>[4]</sup>、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[5]</sup>和大肠杆菌(*Escherichia coli*)等。其中大肠杆菌因为遗传背景清晰、代谢网络明确、易操作等优点<sup>[6]</sup>,成为生产琥珀酸的重要菌种。大肠杆菌琥珀酸的合成路径包括还原性三羧酸途径(reductive

tricarboxylic acid pathway, r-TCA)、乙醛酸途径和三羧酸途径(tricarboxylic acid pathway, TCA)。其中 r-TCA 因受到胞内辅因子含量的限制,琥珀酸对葡萄糖的产率为 1.00 mol/mol 葡萄糖<sup>[7]</sup>;乙醛酸循环中琥珀酸产率为 1.25 mol/mol 葡萄糖<sup>[8]</sup>,但在厌氧条件下,乙醛酸途径与 r-TCA 途径结合,可将理论产率提高到 1.71 mol/mol 葡萄糖<sup>[9]</sup>;有氧条件 TCA 途径的理论产率为 1.00 mol/mol 葡萄糖<sup>[10]</sup>。

影响琥珀酸合成的关键因素是胞内辅因子平衡,目前主要策略包括:(1)增加 NADH 供给。在大肠杆菌中过表达磷酸核糖转移酶(phosphoribosyltransferase, NAPRTase)和来自

乳酸菌的丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, PYC),将 NAD(H)含量比出发菌提高了 9.8 倍,琥珀酸产率达到了 1.60 mol/mol 葡萄糖<sup>[11]</sup>; (2) 提高 ATP 供给。异源表达琥珀酸放线菌磷酸烯醇丙酮酸羧激酶,将磷酸烯醇式丙酮酸羧(phosphoenolpyruvate carboxylic, PEP)转化为草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA),促进 ATP 生成,使琥珀酸产量和菌体浓度分别提高了 5.5 倍和 0.76 倍<sup>[12]</sup>; (3) 平衡 NADH/NAD<sup>+</sup>比值和 ATP 水平。通过表达酿酒酵母可溶性富马酸还原酶、NADH 还原酶,并引入 ATP 无效循环,使 NADH/NAD<sup>+</sup>比值和 ATP 水平分别达到 0.3 和 1.0 mmol/g DCW,琥珀酸产量比出发菌株提高了 39%<sup>[13]</sup>。然而,上述策略研究工作仅通过单独提高辅因子(NADH、ATP)供应或调节辅因子平衡的问题,没有将两种策略进行组合考虑,导致琥珀酸发酵过程中仍存在乙酸、乳酸和丙酮酸等副产物,显著降低了琥珀酸产率,增加了琥珀酸的生产与下游提取成本<sup>[14-15]</sup>。在之前的研究中,在复合诱变所筛选的菌株中通过组合敲除 *pfIB-focA*、*ldhA*、*pta*、*tdcD* 和 *tdcE* 后,为了增强 ATP 和 NADH 的供给,在基因组上组合表达产琥珀酸放线杆菌的 PEP 羧激酶(*Actinobacillus succinogenes* PEP carboxylkinase, AsPCK)和博伊丁假丝酵母(*Candida boydii*)的甲酸脱氢酶(*Candida boydii* formate dehydrogenase, CbFDH),最终构建了菌株 *E. coli* FMME-N-26,琥珀酸产量提高了 42.7%<sup>[16]</sup>,但与 ATP 和 NADH 供给相关的基因涉及较少,供给能力不强,在发酵后期生产强度变弱。为了进一步提高 ATP 和 NADH 供给,促进琥珀酸生产,本研究进行琥珀酸生产化学计量学分析,在菌株 *E. coli* FMME-N-26 基础上,借助代谢工程策略组合调控 ATP 与 NADH 含量,构建了菌株 *E. coli* FW-17,最终,将厌氧阶段残糖浓度进行优化并控制在 1 g/L 时,在

1 000 L 发酵罐中琥珀酸产量和生产强度分别达到 140.2 g/L 和 1.95 g/(L·h),为工业化生产奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究使用的大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 *E. coli* FMME-N-26 分别用于表达载体的构建和生产菌株。其中本研究所使用的基因工程菌、重组质粒和引物分别如表 1-3 所示。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪、全自动凝胶成像系统、电转仪、核酸电泳仪, Bio-Rad 公司产品;恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂产品;紫外可见分光光度计,岛津公司产品;SBA 生物传感器,山东科学院生物研究所产品;精密 pH 计, METTLER 公司产品;UltiMate 3000 液相色谱仪,赛默飞世尔科技有限公司产品;高速离心机, Eppendorf 公司产品;5 L 全自动搅拌式发酵罐,上海保兴生物工程设备有限公司;1 000 L 迪必尔全自动搅拌式发酵罐,迪必尔生物工程(上海)有限公司。

限制性内切酶、Prime Star 高保真酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Hind* III、*Sal* I、*Eco*R I、*Bgl* II、*Kpn* I、*Xho* I、DNA marker 等,购自 TaKaRa (大连)有限公司;一步同源重组酶,购自南京巨匠生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒;氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、大观霉素、阿拉伯糖、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌基因组提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;琥珀酸、乳酸、乙酸、甲酸, Sigma 公司;PCR 引物由亦欣生物科技(上海)

有限公司合成；其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基：10 g/L NaCl, 5 g/L 酵母提取

物, 10 g/L 蛋白胨。

发酵培养基：40 g/L 葡萄糖, 5 g/L 玉米浆, 3.3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.6 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

表 1 本研究所使用的菌种

Table 1 Strains used in this study

| Strains              | Description  | Source      |
|----------------------|--|-------------|
| <i>E. coli</i> JM109 | General cloning host   | TaKaRa Bio. |
| FMME-N               | Wild type screened from rumen of camel (preservation number, CCTCCM2018568)  | Lab stock   |
| FMME-N-1             | After ARTP mutagenesis breeding from FMME-N  | Lab stock   |
| FMME-N-2             | After $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ irradiation mutagenesis breeding from FMME-N-1   | Lab stock   |
| FMME-N-26            | FMME-N-2 $\Delta pflB$ - $focA$ $\Delta dhA$ $\Delta pta$ $\Delta tdcD$ $\Delta tdcE$  | Lab stock   |
| FW-1                 | FMME-N-26-PJ01- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-2                 | FMME-N-26-PJ01- <i>pgm</i>   | This study  |
| FW-3                 | FMME-N-26-PJ01- <i>Aspck</i>   | This study  |
| FW-4                 | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i>  | This study  |
| FW-5                 | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-6                 | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-7                 | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-8                 | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-M- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-9                 | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-M- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-10                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-M- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-11                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-L- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-12                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-L- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-13                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-L- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>   | This study  |
| FW-14                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$                                       | This study  |
| FW-15                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> -pCDD- <i>gapA</i>                                    | This study  |
| FW-16                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> -pCDD- <i>pncB</i>                                    | This study  |
| FW-17                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-H- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-18                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-H- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-19                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD- H- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i> | This study  |
| FW-20                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-M- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-21                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-M- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-22                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-M- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-23                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-L- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-24                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-L- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>  | This study  |
| FW-25                | FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDD-L- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>  | This study  |

表 2 本研究所使用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

| Plasmids  | Characteristics  | References |
|---|--|------------|
| pCas  | pMB1 ori, Kan, P <sub>cas</sub> -cas9, P <sub>araB</sub> -Red, P <sub>trc</sub> -sgRNA             | Lab stock  |
| pTargetF  | pMB1 ori, Spe <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> promoter  | Lab stock  |
| pJ01  | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> promoter  | [17]       |
| pQE- <i>Aspck</i>                                     | pMB1 ori, Kan <sup>R</sup> , T5 promoter   | [18]       |
| pJ01-119-Glf-k-AroG- <i>tkta</i>                      | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> promoter  | Lab stock  |
| pCDR-A  | pBR322 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>trc</sub> promoter   | Lab stock  |
| pJ01- <i>Zmglf</i>                                    | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>Zmglf</i>                                    | This study |
| pJ01- <i>pgm</i>                                      | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i>                                      | This study |
| pJ01- <i>Aspck</i>                                    | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>Aspck</i>                                    | This study |
| pJ01-RBS0034(H)- <i>pgm</i> -RBS0034(H)- <i>Zmglf</i> | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0034, RBS0034    | This study |
| pJ01-RBS0034(H)- <i>pgm</i> -RBS0031(M)- <i>Zmglf</i> | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0034, RBS0031    | This study |
| pJ01-RBS0034(H)- <i>pgm</i> -RBS0011(L)- <i>Zmglf</i> | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0034, RBS0011    | This study |
| pJ01-M- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>                   | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0031, RBS0034    | This study |
| pJ01-M- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>                   | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0031, RBS0031    | This study |
| pJ01-M- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>                   | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0031, RBS0011    | This study |
| pJ01-L- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>                   | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0011, RBS0034    | This study |
| pJ01-L- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>                   | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0011, RBS0031    | This study |
| pJ01-L- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>                   | pMB1 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0011, RBS0011    | This study |
| pCDR-A- <i>gapA</i>                                   | CloDF13 ori, Spe <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i>                                  | This study |
| pCDR-A- <i>pncB</i>                                   | CloDF13 ori, Spe <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>pncB</i>                                  | This study |
| pCDR-A-H- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0034, RBS0034 | This study |
| pCDR-A-H- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0034, RBS0031 | This study |
| pCDR-A-H- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0034, RBS0011 | This study |
| pCDR-A-M- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0031, RBS0034 | This study |
| pCDR-A-M- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0031, RBS0031 | This study |
| pCDR-A-M- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0031, RBS0011 | This study |
| pCDR-A-L- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0011, RBS0034 | This study |
| pCDR-A-L- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0011, RBS0031 | This study |
| pCDR-A-L- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>                 | CloDF13 ori, Amp <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0011, RBS0011 | This study |
| pTargetF- <i>poxB</i>                                 | pMB1 ori, Spe <sup>R</sup> , P <sub>J23119</sub> , <i>poxB</i> -N20                                | This study |

表 3 本研究所使用的引物

Table 3 Primer used in this study

| Primer name             | Primer sequence (5'→3')  | Size (bp) |
|-------------------------|--|-----------|
| <i>poxB</i> -500-up-F   | GCGGCCCGGCTCCGTATATG   | 20        |
| <i>poxB</i> -500-up-R   | CCTCTTTACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAGGTTCTCCATCTCCTGAATG<br>TG | 64        |
| <i>Aspck</i> -Mid-F     | CTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGACTGACTTAAACAAAC<br>TCG | 64        |
| <i>Aspck</i> -Mid-R     | GACGGGAAATGCCACCCTTTTATGCTTTTGGACCGGCGC                              | 40        |
| <i>poxB</i> -500-down-F | GCGCCGGTCCAAAAGCATAAAAAGGGTGGCATTTCCTGTC                             | 40        |
| <i>poxB</i> -500-down-R | AATTCCCATGCTTCTTTTCAGGTATT   | 25        |
| <i>poxB</i> -JP-check-F | ACAATATTGCGTGATCTCTTTTCAGT   | 25        |

(待续)

(续表 3)

| Primer name                | Primer sequence (5'→3')                                    | Size (bp) |
|----------------------------|--|-----------|
| <i>poxB</i> -JP-check-R    | GTGGCAGAAAATAACGTTACCGAAG                                  | 25        |
| <i>poxB</i> -N20-F         | TGTCGTGTACCAGGCGACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT               | 45        |
| <i>poxB</i> -N20-R         | CGTCGCCTGGTAACACGACAAGTAGTATTATACCTAGGACTGAGC              | 45        |
| YZ-S-Ptraget               | ACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTT                             | 30        |
| <i>adhE</i> -500-up-F      | TGCAGGCCGTGCCAGTCATCCTTCA                                  | 25        |
| <i>adhE</i> -500-up-R      | AGTTTAACATTATCAGGAGAGCATTTCAGTAGCGCTGTCTGGCAACATAA         | 50        |
| <i>adhE</i> -500-down-F    | TTATGTTGCCAGACAGCGCTACTGAAATGCTCTCCTGATAATGTTAAACT         | 50        |
| <i>adhE</i> -500-down-R    | AAAATCAAAAAAGGTCTGAATCACG                                  | 25        |
| <i>adhE</i> -JP-check-F    | GGCGTTCTGCCGCTTAGTGG                                       | 20        |
| <i>adhE</i> -JP-check-R    | CTGCCGCTGTCTGATAACTG                                       | 20        |
| <i>adhE</i> -N20-F         | GGACGCCGCGAAGATCATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT              | 45        |
| <i>adhE</i> -N20-R         | ACATGATCTTCGCGGCGTCCACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC              | 45        |
| <i>AspckA</i> -dao-F       | GTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGACTGACTTAAACAAACTCGTTAAAGAA         | 50        |
| <i>AspckA</i> -dao-R       | AATGATGATGATGATGATGGTCGACTTATGCTTTTTGGACCGGCGC             | 45        |
| <i>pgm</i> -dao-F          | GTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGGCAATCCACAATCGTGC                   | 40        |
| <i>pgm</i> -dao-R          | AATGATGATGATGATGATGGTCGACTTACGCGTTTTTCAGAACTTCGCTA         | 50        |
| <i>ZmgIf</i> -dao-F        | GTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGAGTCTGAAAGTAGTCAGGGTC               | 45        |
| <i>ZmgIf</i> -dao-R        | AATGATGATGATGATGATGGTCGACCTACTTCTGGGAGCGCCACA              | 45        |
| YZ-PJ01-F                  | AAAATAGGCGTATCACGAGGCA                                     | 22        |
| YZ-PJ01-R                  | AGGCCACCCGAAGGT  | 16        |
| <i>gapA</i> -dao-F         | GTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGACTATCAAAGTAGGTATCAACGGTTTT         | 50        |
| <i>gapA</i> -dao-R         | TGATGATGATGATGGTCGACTTATTTGGAGATGTGAGCGATCAGG              | 45        |
| <i>pncB</i> -dao-F         | GTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGACACAATTCGCTTCTCCTGTTC              | 45        |
| <i>pncB</i> -dao-R         | TGATGATGATGATGGTCGACTTAACTGGCTTTTTAATATGCGGAAGGTC          | 50        |
| YZ-pCDR-F                  | TCATGAGCCCCGAAGTGCGA                                       | 20        |
| YZ-pCDR-R                  | CCAAGGTAGTCGGCAAATAA                                       | 20        |
| <i>pgm</i> -dao-F-0031     | GTTACACAGGAAACCAAGCTTATGGCAATCCACAATCGTGC                  | 42        |
| <i>pgm</i> -dao-F-0011     | AGTAGGGACAGGATAAGCTTATGGCAATCCACAATCGTGC                   | 40        |
| <i>pgm</i> -glf-fp-R       | TTTTTCTCCTCTTTACTAGTTTACGCGTTTTTCAGAACTTCGCTA              | 40        |
| <i>pgm</i> -glf-fp-F       | CGCTCCCAGAAGTAGGTCGACCATCATCATCATCAT                       | 40        |
| <i>pgm</i> -glf-dao-F-0034 | AACTAGTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGAGTCTGAAAGTAGTCAGGGTC          | 50        |
| <i>pgm</i> -glf-dao-F-0031 | CTAGTTCACACAGGAAACCAAGCTTATGAGTCTGAAAGTAGTCAGGGTC          | 50        |
| <i>pgm</i> -glf-dao-F-0011 | AACTAGTAGGGACAGGATAAGCTTATGAGTCTGAAAGTAGTCAGGGTC           | 50        |
| <i>pgm</i> -glf-dao-R-0034 | TGATGATGATGATGGTCGACCTACTTCTGGGAGCGCCACA                   | 40        |
| <i>pgm</i> -glf-dao-R-0031 | GGTTTCTGTGTGAACTAGTTTACGCGTTTTTCAGAACTTCGCTA               | 45        |
| <i>pgm</i> -glf-dao-R-0011 | CTTATCCTGTCCCTACTAGTTTACGCGTTTTTCAGAACTTCGCTA              | 45        |
| pCDR- <i>pncB</i> -F-0034  | CCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCAAAGAGGAGAAACACGCGATGACAC         | 50        |
| pCDR- <i>pncB</i> -F-0031  | CCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCTCACACAGGAAACCCACGCGATGAC         | 50        |
| pCDR- <i>pncB</i> -F-0011  | CCACGCGATCGCTGACGTCGGTACCAGGACAGGATCACGCGATGACACA          | 50        |
| pCDR- <i>pncB</i> -xhoI-R  | CGCAGCAGCGGTTTTCTTTACCAGACTCGAGTAACTGGCTTTTTTAATATGCGGAA   | 56        |
| pCDR- <i>gapA</i> -F-0034  | CCAATTAAGCTTAAAGAGGAGAAAGAATTCATGACTATCAAAGTAGGTATCAACGGTT | 58        |
| pCDR- <i>gapA</i> -F-0031  | CCAATTAAGCTTTCACACAGGAAACCGAATTCATGACTATCAAAGTAGGT         | 50        |
| pCDR- <i>gapA</i> -F-0011  | CCAATTAAGCTTAGGGACAGGATGAATTCATGACTATCAAAGTAGGTATC         | 50        |
| <i>gapA</i> -bglii-R       | GCGTGGCCGCGCATATCCAATTGAGATCTTTATTTGGAGATGTGAGCGATCAGG     | 55        |

## 1.2 方法

### 1.2.1 基于 CRISPR-Cas9 系统的基因编辑

基因组整合基因采用 CRISPR-Cas9 系统<sup>[19]</sup>。

### 1.2.2 功能质粒的构建

单独或组合表达 *pgm* 基因、来自运动假单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的 *Zmgf* 基因,来自 *A. succinogenes* 的 *Aspck* 基因的表达载体 PJ01、单独或组合表达 *pncB*、*gapA* 基因的表达载体 pCDR-A、含有 *Zmgf* 基因的表达载体 pJ01-119-Glf-k-AroG-tktA、含有 *Aspck* 基因的表达载体 pQE-*Aspck* 为本实验室保存,且表达载体 PJ01、pCDR-A 为组成型表达载体。

通过设计的上下游引物利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)从 pJ01-119-Glf-k-AroG-tktA 表达载体上扩增 *Zmgf* 基因片段,从 pQE-*Aspck* 表达载体上扩增 *Aspck* 基因片段,从大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655 基因组上扩增 *pgm* 基因片段,将其同源重组至载体 PJ01 的 *Hind* III 和 *Sal* I 位点之间,分别构建表达载体 pJ01-*Zmgf*、pJ01-*Aspck*、pJ01-*pgm*。同样,通过上游引物将 RBS0034、RBS0031、RBS0011 引入 *pgm* 基因上游并将其同源重组至载体 PJ01 的 *Hind* III 和 *Sal* I 位点之间,随后对构建好的载体进行反向 PCR 得到相应的线性载体,通过上游引物将 RBS0034、RBS0031、RBS0011 引入 *Zmgf* 基因上游,并分别同源重组于 3 种线性载体上构建出不同 RBS 强度的 *pgm*、*Zmgf* 基因组合表达载体。

通过设计的上下游引物利用 PCR 从大肠杆菌 MG1655 基因组上扩增 *pncB*、*gapA* 基因片段,将其同源重组至载体 pCDR-A 的 *Kpn* I 和 *Xho* I 位点之间,构建表达载体 pCDR-A-*gapA*、pCDR-A-*pncB*。同样,通过上游引物将 RBS0034、RBS0031、RBS0011 引入 *pncB* 基因上游并将其同源重组至载体 pCDR-A 的 *Kpn* I 和 *Xho* I 位点

之间,随后通过上游引物将 RBS0034、RBS0031、RBS0011 引入 *gapA* 基因上游,并分别同源重组于 3 种载体的 *EcoR* I、*Bgl* II 之间构建出不同 RBS 强度的 *gapA*、*pncB* 基因组合表达载体。

### 1.2.3 培养条件

平板培养:取保存于-80 °C 装有菌液的甘油管,三区划线于 LB 固体培养基中,在培养箱中 37 °C 倒置培养 16 h,得到大小均匀的单菌落。

种子培养方法:一级种子培养,挑取平板上大小均匀的单菌落,接种于装有 25 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中,37 °C、220 r/min 培养 9 h;二级种子培养,将一级种子液转接 100  $\mu$ L 至装有 50 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中,37 °C、220 r/min 培养 8 h。

两阶段摇瓶发酵:按照 1% (体积分数)的接种量将二级种子培养液接种于装有 80 mL 发酵培养基的 500 mL 锥形瓶中,发酵条件为 38 °C、220 r/min,培养 12 h,迅速倒入 100 mL 无菌厌氧瓶中,同时加入 4 g  $MgCO_3$  用于控制 pH,发酵条件为 38 °C、200 r/min,培养 60 h。在厌氧阶段发酵过程中,每隔 12 h 添加 800 g/L 的葡萄糖维持发酵液的葡萄糖浓度在 5 g/L,同时添加碳酸镁维持发酵液的 pH 在 6.2 以上。

有氧发酵罐发酵:采用 5 L 发酵罐进行有氧分批发酵。发酵罐初始装液量为 3 L。将二级种子液按总体积 10% (体积分数)的接种量接种至发酵培养基中,开始有氧发酵,发酵温度为 38 °C,初始转速为 500 r/min,通入 100% 无菌过滤空气进行有氧发酵,通气量为 0.7 vvm (vvm 表示每分钟通气量与罐体实际料液体积的比值),先通过调整转速将溶氧(dissolved oxygen, DO)维持在 20% 以上,待转速升至 800 r/min 后通过调整通气量维持 DO。通过流加纯氨水将 pH 维持为 7.0,培养 8 h 左右,溶氧 DO 上升,

40 g/L 的初始葡萄糖消耗完全, 随后通过流加 800 g/L 葡萄糖, 通过自动控制不同时间段的补糖速率维持葡萄糖浓度为 1 g/L, 通过加入  $\text{MgCO}_3$  控制 pH, 发酵至 72 h 结束。

**厌氧发酵罐发酵:** 采用 5 L 发酵罐进行厌氧分批发酵。发酵罐初始装液量为 3 L。将二级种子液按总体积 10% (体积分数) 的接种量接种至发酵培养基中, 发酵温度为 38 °C, 转速为 200 r/min, 通入 100% 无菌过滤  $\text{CO}_2$  进行厌氧发酵, 通气量为 0.1 vvm, 通过流加纯氨水将 pH 维持为 7.0, 培养 8 h 左右, pH 上升, 40 g/L 的初始葡萄糖消耗完全, 随后通过流加 800 g/L 葡萄糖, 通过自动控制不同时间段的补糖速率维持葡萄糖浓度为 1 g/L, 通过加入  $\text{MgCO}_3$  控制 pH, 发酵至 72 h 结束。

**两阶段发酵罐发酵:** 采用 5 L 发酵罐进行两阶段补料分批发酵。发酵罐初始装液量为 3 L。将二级种子液按总体积 10% (体积分数) 的接种量接种至发酵培养基中, 开始发酵。有氧阶段: 发酵温度 38 °C, 初始转速为 500 r/min, 通入 100% 无菌过滤空气, 通气量为 0.7 vvm, 发酵过程中通过流加纯氨水将 pH 维持为 7.0; 培养 8 h 左右, 溶氧 DO 上升, 40 g/L 的初始葡萄糖消耗完全, 随后通过补加 800 g/L 葡萄糖维持葡萄糖浓度为 1 g/L, 约 8.5 h, 停止通气, 降低转速至 200 r/min, 发酵温度 38 °C, 转速 200 r/min, 随后流加 800 g/L 葡萄糖, 通过自动控制不同时间段的补糖速率维持葡萄糖浓度为 5 g/L, 通过加入  $\text{MgCO}_3$  用于控制 pH, 发酵至 72 h 结束。

#### 1.2.4 分析检测方法

**细胞浓度测定:** 取发酵液进行适当稀释, 使用紫外分光光度计在波长 600 nm 的条件下测定  $OD_{600}$ 。大肠杆菌细胞干重(dry cell weight, DCW)= $0.41 \times \text{吸光值} \times n$  ( $n$  为样品的稀释倍数), 最后计算细胞的生物量。

**葡萄糖浓度测定:** 取发酵液 12 000 r/min 离心 8 min, 收集上清液进行适当稀释, 使用 M-100 生物传感器测定葡萄糖浓度(准确测量范围 0–2 g/L)。

**辅因子(ATP、 $\text{NAD}^+$ 和 NADH 总量)测定:** 取不同时间的发酵液, 用 pH 为 7.4 的 0.01 mol/L PBS 溶液洗涤 3 次, 并稀释至  $OD_{600}=1.0$ , 使用 ATP 检测试剂盒 S0027 以及 NADH 检测试剂盒 (WST-8 法) 进行测定(上海碧云天生物科技有限公司)。

**有机酸浓度测定:** 取发酵液 12 000 r/min 离心 8 min, 收集上清液, 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定琥珀酸、乳酸、甲酸和乙酸的含量。HPLC 检测条件为, 色谱分离柱为 Aminex HPX-87H (300 mm $\times$ 7.8 mm), 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸, 柱温 52 °C, 紫外检测波长为 210 nm, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ , 流速 0.6 mL/min。

## 2 结果与分析

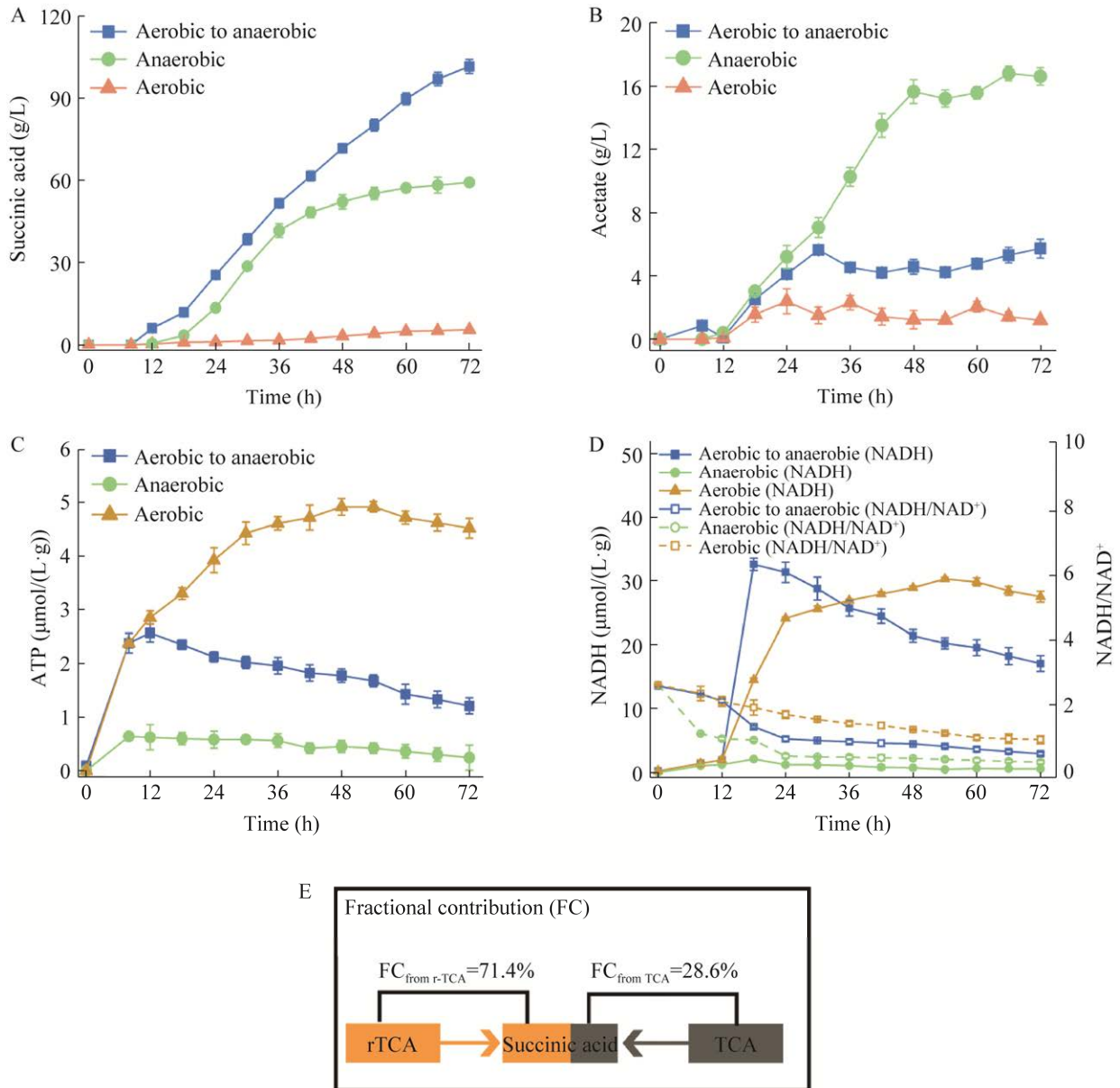
### 2.1 大肠杆菌发酵生产琥珀酸的化学计量学分析

在 5 L 发酵上研究了不同氧气条件下 *E. coli* FMME-N-26 生产琥珀酸的情况, 结果如图 1 所示。有氧发酵罐发酵条件下, 胞内 ATP 与 NADH 含量分别为 4.52  $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g DCW})$  和 27.53  $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g DCW})$ , 乙酸浓度为 1.19 g/L, 琥珀酸几乎不积累。厌氧发酵罐发酵条件下, ATP 与 NADH 含量分别为 0.24  $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g DCW})$  和 0.58  $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g DCW})$ ,  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  比值为 0.22, 琥珀酸产量为 59.25 g/L, 副产物乙酸浓度为 16.62 g/L, 比有氧条件提高了 129.66%, 可能与胞内 ATP 含量不足有关<sup>[20]</sup>。在两阶段发酵罐发酵条件下, 胞内 ATP 与 NADH 含量分别为 1.21  $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g DCW})$  和 17.08  $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{g DCW})$ ,



NADH/NAD<sup>+</sup>比值为 0.48, 分别比厌氧条件提高了 404.17%、2 844.83%、118.18%, 此时琥珀酸产量为 101.70 g/L, 而乙酸浓度降为 5.74 g/L。上述结

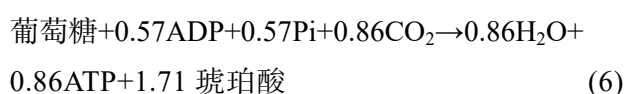
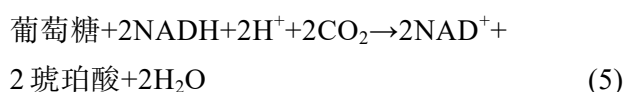
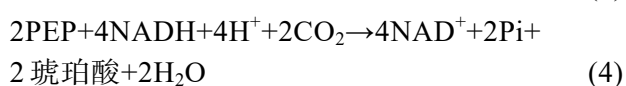
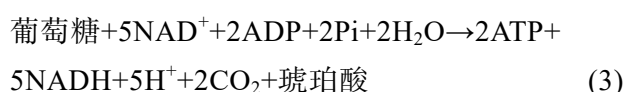
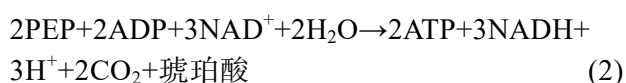
果表明, 菌株 *E. coli* FMME-N-26 高效生产琥珀酸的条件是微厌氧, 且在生产过程中需要借助 TCA 循环为 r-TCA 途径提供一定量的 NADH 和 ATP。



**图 1** 不同氧气条件下产酸情况与辅因子水平 在有氧发酵、厌氧发酵和两阶段发酵 3 种不同条件下琥珀酸浓度(A)、乙酸浓度(B)、ATP 浓度(C)和 NADH 浓度(D)变化曲线. E: 大肠杆菌利用葡萄糖生产琥珀酸达到理想最大产率条件下的碳通量示意图

**Figure 1** Acid production and cofactor levels under different oxygen conditions. Profile of succinic acid (A), acetate (B), ATP (C), and NADH (D) concentrations under three different conditions: Aerobic fermentation, anaerobic fermentation and two-stage fermentation. E: Carbon flux diagram of *E. coli* showing the ideal maximum yield of succinic acid on glucose.

为了研究胞内 NADH 和 ATP 含量如何影响菌株 *E. coli* FMME-N-26 生产琥珀酸, 由式(1)计算得到大肠杆菌中葡萄糖经过糖酵解途径生成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的过程可生成 2 mol NADH。结合公式(1)+(2)得公式(3), 发现有氧条件下 1 mol 葡萄糖可生成 1 mol 琥珀酸, 产生 5 mol NADH 和 2 mol ATP; 结合公式(1)+(4)得公式(5), 发现厌氧条件下, 大肠杆菌中 PEP 可直接经 r-TCA 循环生成琥珀酸, 也即 1 mol 葡萄糖可生成 2 mol 琥珀酸, 但需要补充 2 mol NADH, 且无 ATP 生成。通过调节大肠杆菌的 PP 途径与糖酵解途径的碳通量比和激活乙醛酸循环使得 71.4%的碳流向 r-TCA 途径, 28.6%碳流向 TCA 循环, 从而获得最大产率 1.714 mol/mol<sup>[9,21-22]</sup> (图 1E)。通过(3)×0.286+(5)×0.714 得公式(6), 从而得到葡萄糖转化为琥珀酸不需要额外的 NADH, 并有额外 ATP 生成来维持细胞代谢, 避免生产琥珀酸过程中 NADH 与 ATP 不足的问题。表明部分碳流向 TCA 循环以生成能量与辅因子, 从而缓解因能量与辅因子不足而导致 r-TCA 合成琥珀酸能力下降的瓶颈。



## 2.2 提高胞内 ATP 水平促进琥珀酸的高效合成

提高胞内 ATP 含量的代谢工程策略包括减

少 ATP 消耗和强化 ATP 合成。为了减少 ATP 消耗, 在 *E. coli* FMME-N-26 菌株中异源表达来源于运动假单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的葡萄糖扩散蛋白基因(*Zmglf*), 该基因表达的葡萄糖扩散蛋白(glucose facilitated diffusion protein, GLF)能更好地与大肠杆菌的葡萄糖激酶(glucokinase, Glk)配合, 在提高葡萄糖利用效率的同时提高琥珀酸的得率, 减少了生产琥珀酸过程中 ATP 的消耗<sup>[23-24]</sup>, 另外通过表达 *Zmglf*, 也有利于莽草酸<sup>[17,25]</sup>生产, 在 *E. coli* FMME-N-26 中导入带有 *Zmglf* 基因的组成型质粒 pJ01, 得到突变株 *E. coli* FW-1, 在两阶段摇瓶发酵中, ATP 含量、琥珀酸产量分别为 0.92 μmol/(L·g DCW)、69.43 g/L, 比出发菌株 *E. coli* FMME-N-26 分别提高了 17.9%、9.3%, 同时, 乙酸浓度降低了 23.4% (图 2A、2B)。为了强化 ATP 合成, 在菌株 *E. coli* FMME-N-26 中通过组成型质粒 PJ01 过表达磷酸甘油酸变位酶基因 *pgm* 和产琥珀酸放线杆菌的磷酸烯醇式丙酮酸激酶基因 *Aspck*。磷酸甘油酸变位酶(PGM)是磷酸甘油酸激酶下游的一种关键糖酵解酶<sup>[26]</sup>, 过表达 PGM 提高 3-磷酸甘油醛到 1,3-二磷酸甘油酸的碳通量, 从而提高 ATP 的合成; *A. succinogenes* 的磷酸烯醇式丙酮酸激酶(phosphoenolpyruvate kinase, PCK)可以在催化磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸的同时吸收 1 mol CO<sub>2</sub> 和 1 mol ATP<sup>[18]</sup>, 在大肠杆菌中异源表达编码该酶的 *Aspck* 基因可以促进琥珀酸生产<sup>[12]</sup>。在两阶段摇瓶发酵中, 与出发菌株比较, 过表达 *pgm* 的突变菌株 *E. coli* FW-2 胞内 ATP 含量提高了 100% [1.56 μmol/(L·g DCW)], 琥珀酸产量无明显差别, 但乙酸浓度降低了 16.7% (8.22 g/L)。而过表达 *Aspck* 的突变菌株 *E. coli* FW-3 胞内 ATP 含量和琥珀酸产量分别为 1.15 μmol/(L·g DCW)、67.71 g/L, 比出发菌株分别提高了 47.4%和 6.5%, 同时, 乙酸浓度

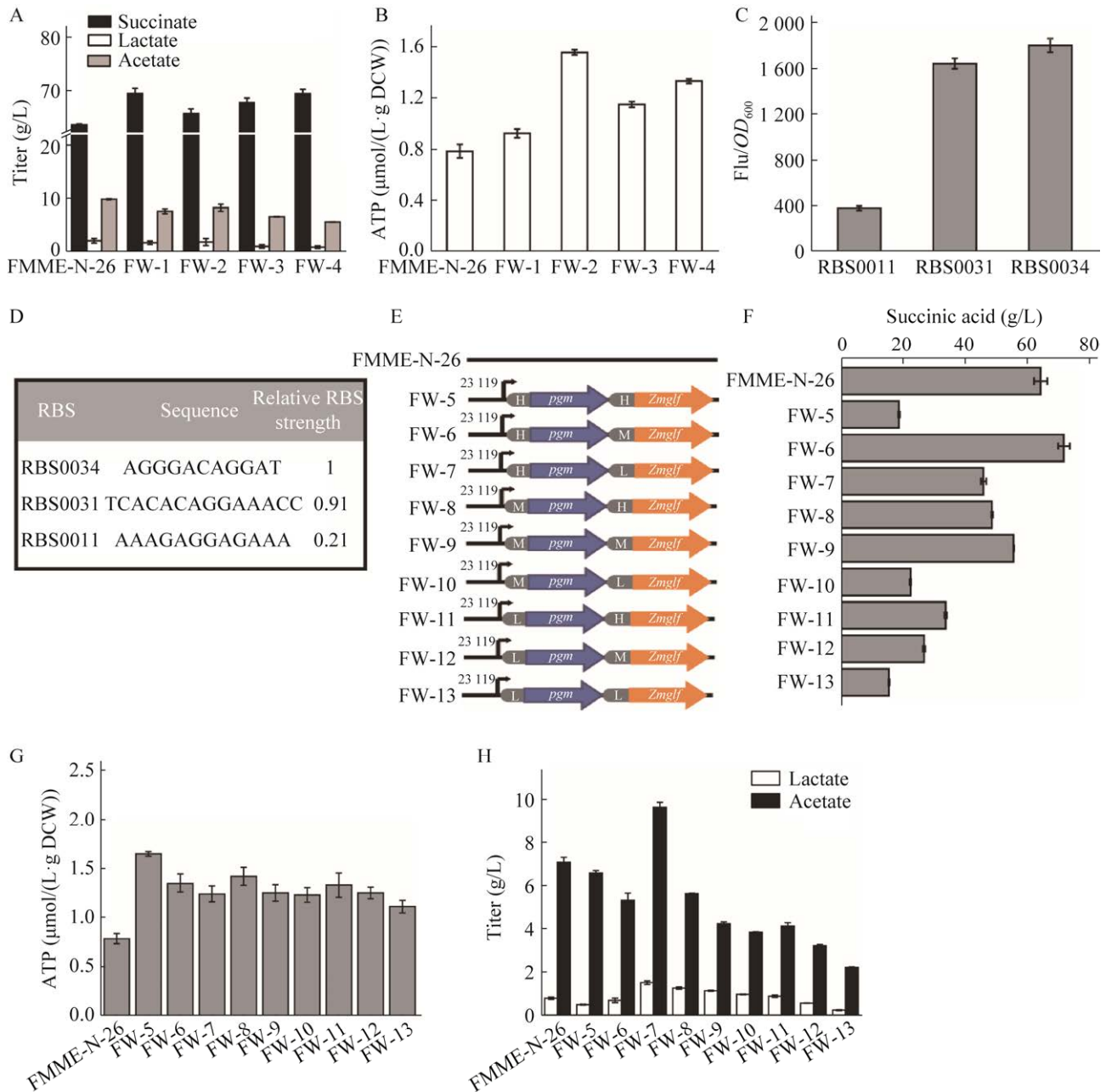


图2 调节ATP平衡的菌株构建与评估

菌株 *E. coli* FMME-N-26、FW-1、FW-2、FW-3、FW-4 发酵产酸情况(A)和 ATP 含量(B)。C: 3 种不同 RBS 的强度。D: 3 种不同 RBS 的序列情况与相对强度。E: 不同表达水平的 *pgm* 和 *Zmgf* 表达组合。*pgm* 和 *Zmgf* 不同表达组合的琥珀酸产量(F)、ATP 含量(G)、乙酸和乳酸浓度(H)

Figure 2 Construction and evaluation of strains regulating ATP balance. Acid production (A) and ATP content (B) of *E. coli* FMME-N-26, FW-1, FW-2, FW-3, FW-4. C: The strength of three different RBS. D: Sequence and relative strength of three different RBS. E: A series of expression combinations of *pgm* and *Zmgf* with different expression levels. The titer of succinate (F), ATP (G), acetate and lactate (H) in different expression combinations of *pgm* and *Zmgf*.

降低了 33.7% (6.54 g/L)。进一步将 *Aspck* 基因整合到菌株 *E. coli* FMME-N-26 基因组编码丙酮酸脱氢酶 *poxB* 处, 构建突变菌株 *E. coli* FW-4, 在两阶段摇瓶发酵中, ATP 含量和琥珀酸产量分别为 1.33  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ 、69.40 g/L, 与出发菌株相比, 分别提高了 57.0%和 9.2%。为了进一步提高琥珀酸产量, 在突变菌株 *E. coli* FW-4 的基础上, 借助 RBS0034、RBS0031、RBS0011, 通过 PJ01 质粒将 *pgm* 和 *Zmgf* 基因表达水平控制在高(H)、中(M)、低(L) 3 个层级(图 2C、2D), 获得了 9 株突变菌株(图 2E), 其中当 *pgm* 和 *Zmgf* 基因分别处于高水平和中水平表达时, 突变菌株 *E. coli* FW-6 在两阶段摇瓶发酵中 ATP 含量和琥珀酸产量分别为 1.35  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ 、71.66 g/L, 比出发菌株 *E. coli* FMME-N-26 分别提高了 73.1%和 11.6%, 此外乙酸浓度降低至 5.3 g/L (图 2F–2H)。上述结果表明, 提高胞内 ATP 含量能有效地降低副产物乙酸浓度, 进一步提高琥珀酸产量。

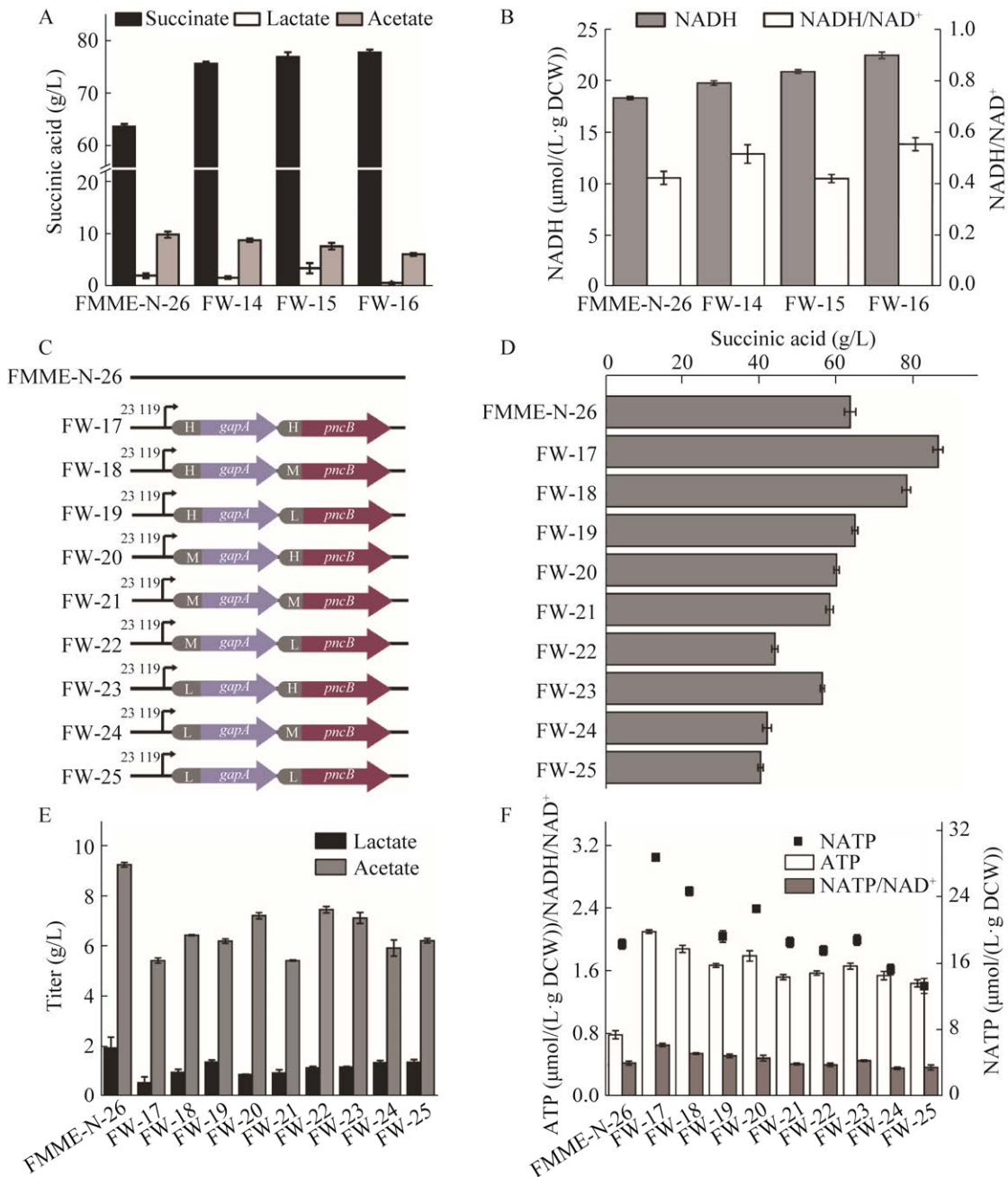
### 2.3 调节 NADH 水平促进琥珀酸的高效合成

提高胞内 NADH 含量的代谢策略包括阻断 NADH 竞争途径和构建 NADH 回补路径。乙醇脱氢酶(ADHE)催化乙酰辅酶 A 消耗 NADH 还原为乙醛, 在菌株 *E. coli* FW-6 中敲除编码乙醇脱氢酶的基因 *adhE*, 得到突变菌株 *E. coli* FW-14 (图 3A、3B), 其琥珀酸产量、NADH 浓度和 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值分别比菌株 *E. coli* FMME-N-26 提高了 18.91% (75.57 g/L)、8.0% [19.76  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ ]和 21.4% (0.51), 但菌体量降低了 10.5% (附图 1)。*gapA* 基因编码的磷酸甘油醛脱氢酶是糖酵解中生成 NADH 的主要来源, 表达此基因在增加了胞内 NADH 含量的同时也提高了葡萄糖利用率<sup>[27-28]</sup>, 在菌株 *E. coli* FW-6 中过表达 *gapA* 基因, 得到菌株 *E. coli* FW-15, 其琥珀酸产量和 NADH 浓度分别提高了

21.0% (76.87 g/L)、14.0% [20.12  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ ], 但 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值不发生变化(0.42)。*pncB* 基因编码的烟酸磷酸核糖基转移酶(niacin phosphoribosyltransferase, NAPRTase) 是一种 NAD(H)合成途径中的限制酶, 过表达 *pncB* 基因可以提高 NAD(H)浓度, 使得菌体量和琥珀酸产量在厌氧条件下显著增加<sup>[11]</sup>, 在菌株 *E. coli* FW-6 中过表达 *pncB* 基因, 得到突变菌株 *E. coli* FW-16, 其琥珀酸产量、NADH 浓度和 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值分别提高了 22.35% (77.75 g/L)、22.7% [22.46  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ ]、13.0% (0.55)。为进一步提高琥珀酸产量, 在菌株 *E. coli* FW-6 中借用 RBS0034、RBS0031、RBS0011 将 *gapA* 和 *pncB* 表达水平控制在高(H)、中(M)、低(L) 3 个水平, 构建了 9 株基因工程菌(图 3C)。其中当 *gapA*、*pncB* 基因都高水平表达时, 突变菌株 *E. coli* FW-17 琥珀酸产量、胞内 ATP 浓度、NADH 浓度、NADH/NAD<sup>+</sup> 比值分别为 85.67 g/L、2.10  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$ 、28.75  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{g DCW})$  和 0.65, 比对照菌株 *E. coli* FMME-N-26 分别提高了 34.8%、169.23%、28.75%和 54.76%, 同时乙酸和乳酸分别下降了 72.92%和 41.47% (图 3D–3F)。

### 2.4 发酵条件优化提高琥珀酸的产量

最优突变菌株 *E. coli* FW-17 在 5 L 发酵罐中, 两阶段发酵罐发酵生产琥珀酸的过程曲线如图 4A 所示。发酵 72 h 后, 琥珀酸产量和生产强度为 118.52 g/L、1.73 g/(L·h), 比出发菌株 *E. coli* FMME-N-26 分别提高了 16.88%和 9.49%, 副产物乙酸浓度降低为 4.32 g/L (图 4A, 表 4)。但从图 4B 发现在发酵后期(48 h 后)斜率下降了 13.3%, 这一结果表明菌株代谢能力下降, 这也是为何发酵后期残糖升高和乙酸积累的原因。为此, 将发酵过程中残糖浓度分别控制在 0.0、1.0、5.0 g/L, 结果表明将残糖控制在 1.0 g/L



**图3** 调节 NADH 平衡的菌株构建与评估 菌株 *E. coli* FMME-N-26、FW-14、FW-15、FW-16 发酵产酸情况(A)、NADH 含量与 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值(B). C: 构建了一系列不同表达水平的 *gapA* 和 *pncB* 表达组合. *gapA* 和 *pncB* 不同表达组合的琥珀酸产量(D)、乙酸和乳酸浓度(E)、ATP 含量、NADH 含量和 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值(F)

**Figure 3** Construction and evaluation of strains in which the NADH balance is regulated. Acid production (A), NADH content and NADH/NAD<sup>+</sup> ratio (B) of *E. coli* FMME-N-26, FW-14, FW-15 and FW-16. C: A series of expression combinations of *gapA* and *pncB* with different expression levels were constructed. The titer of succinic acid (D), concentrations of acetate and lactate (E), ATP content, NADH content and NADH/NAD<sup>+</sup> ratio (F) in different expression combinations of *gapA* and *pncB*.



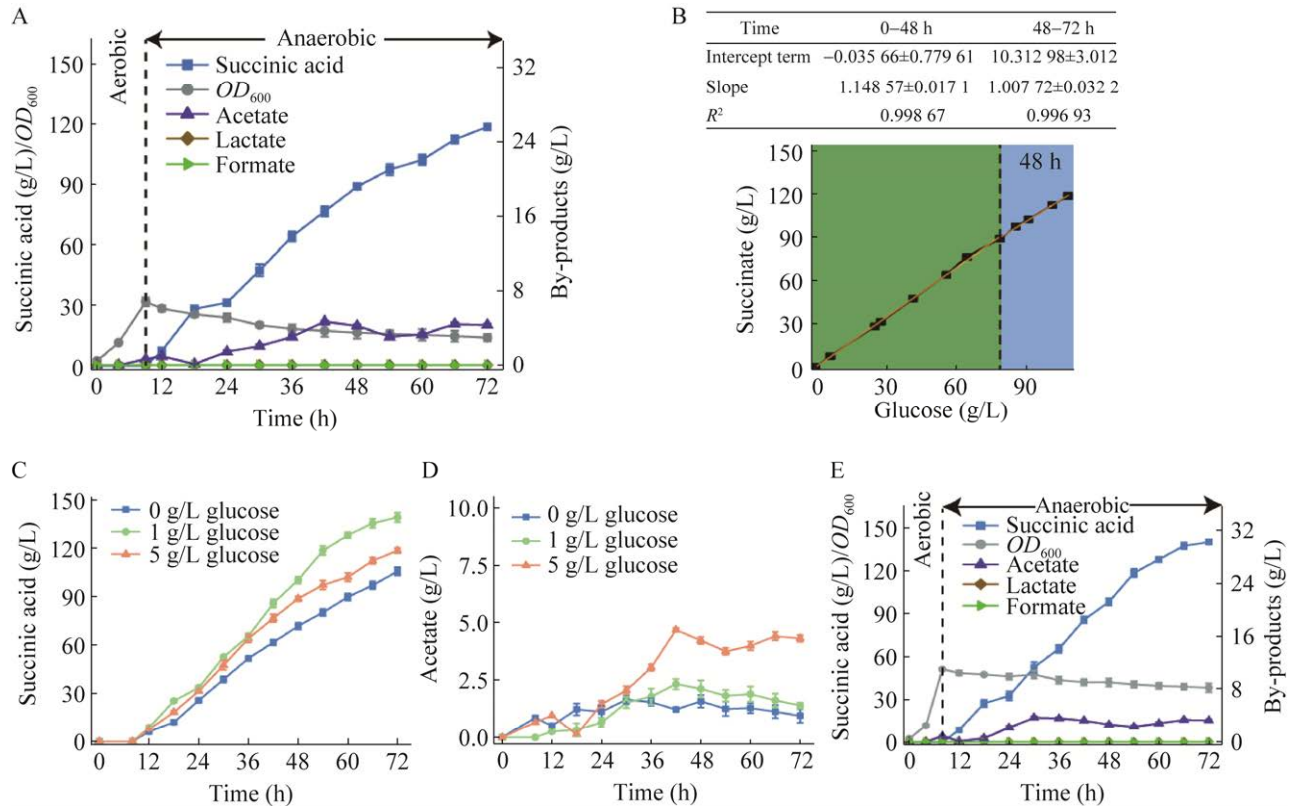


图 4 菌株 *Escherichia coli* FW-17 发酵结果 A: *E. coli* FW-17 的产酸、 $OD_{600}$  与葡萄糖浓度变化曲线. B: 菌株 *E. coli* FW-17 在发酵过程中琥珀酸与葡萄糖关系图. C: 不同糖浓度条件下琥珀酸的生产情况. D: 乙酸积累情况. E: 菌株 *E. coli* FW-17 在 1 000 L 罐的产酸、 $OD_{600}$  与葡萄糖浓度变化曲线

Figure 4 Fermentation profile of *Escherichia coli* FW-17. A: Time-course of acid production,  $OD_{600}$  and glucose of *E. coli* FW-17. B: Relationship between succinate and glucose in the fermentation process of *E. coli* FW-17. C: Production of succinate under different sugar concentrations. D: Acetate accumulation under different sugar concentrations. E: Curves of acid production and  $OD_{600}$  and glucose of *E. coli* FW-17 in 1 000 L fermenter.

表 4 不同条件下发酵参数总结

Table 4 Summary of fermentation parameters under different conditions

| Condition                | Organic acid concentration (g/L) |         |         |         | Productivity (g/(L·h)) |
|--------------------------|----------------------------------|---------|---------|---------|------------------------|
|                          | Succinate                        | Acetate | Lactate | Formate |                        |
| <i>E. coli</i> FMME-N-26 | 101.40                           | 5.50    | –       | –       | 1.58                   |
| <i>E. coli</i> FW-17     | 118.52                           | 4.32    | –       | –       | 1.73                   |
| 0 g/L glucose            | 105.70                           | 1.44    | –       | –       | 1.47                   |
| 1 g/L glucose            | 139.52                           | 1.40    | –       | –       | 1.94                   |
| 5 g/L glucose            | 118.53                           | 4.32    | –       | –       | 1.65                   |
| 1 000 L scale-up         | 140.20                           | 1.38    | –       | –       | 1.95                   |

– means undetected.

时琥珀酸浓度提高到 139.63 g/L, 比优化前提高了 17.81%, 副产物乙酸浓度降低了 67.59% (1.40 g/L), 同时发现, 副产物乙酸的浓度会随着残糖浓度的升高而逐渐升高(图 4C、4D); 发酵液中糖分不足时, pH 上升。综上所述, 通过调整补糖速率, 可以在提高 *E. coli* FW-17 琥珀酸生产能力的同时, 降低发酵液中的乙酸积累。

进一步将菌株 *E. coli* FW-17 于 1 000 L 发酵罐中进行放大实验, 结果如图 4E 所示。在最优发酵条件下(残糖控制在 1.0 g/L 的两阶段发酵罐发酵), 在发酵 72 h 后琥珀酸的产量为 140.2 g/L, 生产强度为 1.95 g/(L·h), 见图 4E、表 1, 相比于原始菌株 *E. coli* FMME-N-26 分别提高了 38.26% 和 23.42%, 乙酸浓度为 1.38 g/L, 降低了 74.91%。这与 5 L 罐发酵水平相当, 说明了该菌株与发酵工艺具有工业生产潜力。

### 3 讨论与结论

通过化学计量学分析, 有助于从机理角度去分析琥珀酸生产瓶颈, 找到提高琥珀酸产量的方法。在发酵生产过程中难免会出现产量提升困难的情况, 需要从菌株改造、培养基优化等方面进行综合考虑, 找到瓶颈问题。例如, Lin<sup>[29]</sup>开发了好氧琥珀酸生产系统能够在好氧条件下实现 1.0 mol/mol 葡萄糖的最大理论琥珀酸产量; Li 等<sup>[30]</sup>采用正交试验设计, 以玉米浸膏和酵母浸膏为葡萄糖和氮源, 确定最佳浓度, 获得维生素 B<sub>12</sub> 的产率为 530.29 μg/g DCW。其中基于化学计量学分析进行有机酸合成路径改造达到较好的效果<sup>[18,22,31]</sup>, 但只考虑了单一条件下的情况, 往往与实际脱离。在本研究中, 为了探究菌株 *E. coli* FMME-N-26 琥珀酸能力下降的瓶颈, 基于 3 种不同发酵条件下的产酸情况进行化学计量学分析, 得出了一种调节胞内 NADH 与 ATP 水平以进一步提高琥珀酸产量

的代谢工程策略。

胞内辅因子不足会影响琥珀酸合成, 降低琥珀酸产量。在琥珀酸生产中涉及的辅因子主要为 ATP 与 NADH, 提高胞内 ATP 与 NADH 含量的方法主要为表达生成 ATP 与 NADH 相关基因或降低 ATP 与 NADH 消耗相关的基因, 马江峰等<sup>[11]</sup>通过表达了烟碱酸磷酸核糖基转移酶(NAPRTase, *pncB*)和源自乳酸链球菌(*Lactococcus lactis*)的 *pyc* 基因, 使 NADH 的浓度提高了 9.8 倍, 琥珀酸产量提高了 8.0 倍, 达到 14.1 g/L, Kim 等<sup>[12]</sup>在 PPC 突变的菌株中表达产琥珀酸放线杆菌的 PCK 后, 将 PEP 羧化与 ATP 生成相结合, 琥珀酸的产量较出发菌株提高了 6.5 倍。但是过表达基因后, 容易使胞内氧化还原失衡, 缺失了 *ldhA* 和 *pflB* 基因的大肠杆菌, 由于无法再生 NAD<sup>+</sup>, 造成氧化还原失衡, 无法在厌氧条件下利用葡萄糖<sup>[11,32]</sup>。为了解决这一问题, 需要调整胞内氧化还原平衡。在本研究中, 为了解决菌株 *E. coli* FMME-N-26 胞内 ATP 与 NADH 含量不足, 使得发酵后期生产强度降低这一问题, 进一步提高琥珀酸浓度, 本研究先表达 *Aspck*、*pgm* 和 *Zmglf* 基因提高胞内 ATP 含量, 表达 *gapA* 和 *pncB* 基因并敲除 NADH 消耗的 *adhE* 基因提高胞内 NADH 含量; 随后通过组合协调 *pgm*、*Zmglf*、*gapA* 和 *pncB* 的表达, 在提高 ATP 与 NADH 含量的同时, 维持胞内氧化还原平衡, 将琥珀酸产量提高至 118.52 g/L。

通过发酵条件的优化, 琥珀酸产量进一步提高。经 1 000 L 发酵罐的生产, 最优菌株 FW-17 生产琥珀酸浓度为 140.2 g/L, 生产强度为 1.95 g/(L·h)。本研究证明了大肠杆菌生产琥珀酸的工业化潜力。此外, 本文还为以大肠杆菌为工业平台的生物基化学品生产的未来发展提供了指导方针。

## REFERENCES

- [1] CHENG KK, ZHAO XB, ZENG J, ZHANG JN. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(3): 302-318.
- [2] BOZELL JJ, PETERSEN GR. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited[J]. *Green Chemistry*, 2010, 12(4): 539.
- [3] YANG Q, WU M, DAI ZX, XIN FX, ZHOU J, DONG WL, MA JF, JIANG M, ZHANG WM. Comprehensive investigation of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*: a promising native succinic acid producer[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2020, 14(5): 950-964.
- [4] CHOI S, SONG H, LIM SW, KIM TY, AHN JH, LEE JW, LEE MH, LEE SY. Highly selective production of succinic acid by metabolically engineered *Mannheimia succinici* producers and its efficient purification[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(10): 2168-2177.
- [5] RAAB AM, GEBHARDT G, BOLOTINA N, WEUSTER-BOTZ D, LANG C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(6): 518-525.
- [6] WENDISCH VF, BOTT M, EIKMANNS BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(3): 268-274.
- [7] ZHU LW, TANG YJ. Current advances of succinate biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(8): 1040-1048.
- [8] SÁNCHEZ AM, BENNETT GN, SAN KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(3): 229-239.
- [9] VEMURI GN, EITEMAN MA, ALTMAN E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1715-1727.
- [10] LIN H, BENNETT GN, SAN KY. Genetic reconstruction of the aerobic central metabolism in *Escherichia coli* for the absolute aerobic production of succinate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89(2): 148-156.
- [11] MA JF, GOU DM, LIANG LY, LIU RM, CHEN X, ZHANG CQ, ZHANG JH, CHEN KQ, JIANG M. Enhancement of succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* with co-expression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase and pyruvate carboxylase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(15): 6739-6747.
- [12] KIM P, LAIVENIEKS M, VIEILLE C, ZEIKUS JG. Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1238-1241.
- [13] LI JJ, LI YK, CUI ZY, LIANG QF, QI QS. Enhancement of succinate yield by manipulating NADH/NAD<sup>+</sup> ratio and ATP generation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3153-3161.
- [14] FERONE M, RAGANATI F, OLIVIERI G, MARZOCHELLA A. Bioreactors for succinic acid production processes[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(4): 571-586.
- [15] DAI ZX, GUO F, ZHANG SJ, ZHANG WM, YANG Q, DONG WL, JIANG M, MA JF, XIN FX. Bio-based succinic acid: an overview of strain development, substrate utilization, and downstream purification[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2020, 14(5): 965-985.
- [16] 唐文秀, 王学明, 郭亮, 季立豪, 高聪, 陈修来, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌生产琥珀酸[J]. *化工进展*, 2022, 41(2): 938-950.
- TANG WX, WANG XM, GUO L, JI LH, GAO C, CHEN XL, LIU LM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce succinic acid[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2022, 41(2): 938-950 (in Chinese).
- [17] GAO C, HOU JS, XU P, GUO L, CHEN XL, HU GP, YE C, EDWARDS H, CHEN J, CHEN W, LIU LM. Programmable biomolecular switches for rewiring flux in *Escherichia coli*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3751.
- [18] HU GP, ZHOU J, CHEN XL, QIAN YY, GAO C, GUO L, XU P, CHEN W, CHEN J, LI Y, LIU LM. Engineering synergetic CO<sub>2</sub>-fixing pathways for malate production[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 496-504.



- [19] LI YF, LIN ZQ, HUANG C, ZHANG Y, WANG ZW, TANG YJ, CHEN T, ZHAO XM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 13-21.
- [20] ZHANG XY, ZHANG YJ, LI ZM, XIA YL, YE Q. Continuous culture and proteomic analysis of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and its acetate-tolerant mutant DA19 under conditions of nitrogen source limitation[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(2): 179-187.
- [21] SKOROKHODOVA AY, MORZHAKOVA AA, GULEVICH AY, DEBABOV VG. Manipulating pyruvate to acetyl-CoA conversion in *Escherichia coli* for anaerobic succinate biosynthesis from glucose with the yield close to the stoichiometric maximum[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 214: 33-42.
- [22] MENG J, WANG BY, LIU DY, CHEN T, WANG ZW, ZHAO XM. High-yield anaerobic succinate production by strategically regulating multiple metabolic pathways based on stoichiometric maximum in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 141.
- [23] TANG JL, ZHU XN, LU J, LIU PP, XU HT, TAN ZG, ZHANG XL. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2513-2520.
- [24] ALVA A, SABIDO-RAMOS A, ESCALANTE A, BOLÍVAR F. New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1463-1479.
- [25] CHANDRAN SS, YI J, DRATHS KM, von DAENIKEN R, WEBER W, FROST JW. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(3): 808-814.
- [26] JABLONSKY J, HAGEMANN M, SCHWARZ D, WOLKENHAUER O. Phosphoglycerate mutases function as reverse regulated isoenzymes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58281.
- [27] JOJIMA T, FUJII M, MORI EJ, INUI M, YUKAWA H. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(1): 159-165.
- [28] LITSANOV B, BROCKER M, BOTT M. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [29] LIN H, BENNETT GN, SAN KY. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(2): 116-127.
- [30] Li D, Fang H, Gai YM, Zhao J, Jiang PT, Wang L, Wei Q, Yu DY, Zhang DW. Metabolic engineering and optimization of the fermentation medium for vitamin B<sub>12</sub> production in *Escherichia coli*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(10): 1735-1745.
- [31] HU GP, LI ZH, MA DL, YE C, ZHANG LP, GAO C, LIU LM, CHEN XL. Light-driven CO<sub>2</sub> sequestration in *Escherichia coli* to achieve theoretical yield of chemicals[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(5): 395-406.
- [32] CHEN XZ, ZHOU L, TIAN KM, KUMAR A, SINGH S, PRIOR BA, WANG ZX. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1200-1223.

(本文责编 郝丽芳)