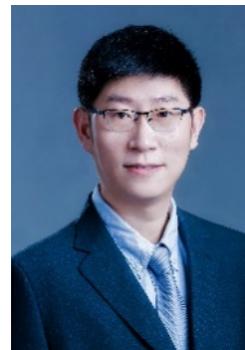


• 有机酸生物合成 •

陈涛 天津大学化工学院教授、博士生导师。从事微生物代谢工程与合成生物学的教学和科研工作，主要研究以系统生物学方法和合成生物技术构建高效合成生物基化学品的细胞工厂。以第一或通讯作者在 *Green Chemistry*、*Metabolic Engineering*、*ACS Synthetic Biology* 等学术刊物发表 SCI 论文 60 余篇，授权国家发明专利 10 余项，主编(译)教材 3 部。担任 *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 副编辑、《生物工程学报》编委及天津市微生物学会理事。



基于工程化盐单胞菌 TDZI-08 一锅法合成衣康酸

张静^{1,2#}, 元跃^{1#}, 王智文¹, 陈涛^{1*}

1 天津大学 化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心与系统生物工程重点实验室, 天津 300072

2 菏泽学院 农业与生物工程学院, 山东 菏泽 274000

张静, 元跃, 王智文, 陈涛. 基于工程化盐单胞菌 TDZI-08 一锅法合成衣康酸[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2666-2677.
ZHANG Jing, YUAN Yue, WANG Zhiwen, CHEN Tao. One-pot synthesis of itaconic acid by engineered *Halomonas bluephagenesis* TDZI-08[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2666-2677.

摘要: 衣康酸(itaconic acid, IA)是 12 种高附加值平台化合物之一, 广泛应用于涂料、黏合剂、塑料、树脂和生物燃料等领域。本研究基于前期构建的工程化盐单胞菌 TDZI-08, 通过排查阻碍因素、优化碳源、氮源、诱导剂添加时间和表面活性剂添加量等, 建立了一锅法催化柠檬酸合成衣康酸工艺。在 5 L 发酵罐中利用 TDZI-08 进行开放式不灭菌一锅法合成, 最高产生了 40.50 g/L 衣康酸, 催化阶段得率为 0.68 g 衣康酸/g 柠檬酸, 总得率为 0.42 g 衣康酸/g (柠檬酸+葡萄糖酸)。本研究探索出的一锅法合成体系工艺简单且无须灭菌和无菌操作, 表明盐单胞菌具有较好的衣康酸工业化生产潜力。

关键词: 盐单胞菌; 衣康酸; 一锅法合成; 工艺优化

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900200).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: chentao@tju.edu.cn

Received: 2024-01-25; Accepted: 2024-03-25; Published online: 2024-03-28

One-pot synthesis of itaconic acid by engineered *Halomonas bluephagenesis* TDZI-08

ZHANG Jing^{1,2#}, YUAN Yue^{1#}, WANG Zhiwen¹, CHEN Tao^{1*}

¹ Frontier Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

² College of Agricultural and Biological Engineering, Heze University, Heze 274000, Shandong, China

Abstract: Itaconic acid (IA) is one of the twelve high value-added platform compounds applied in various fields including coatings, adhesives, plastics, resins, and biofuels. In this study, we established a one-pot catalytic synthesis system for IA from citric acid based on the engineered salt-tolerant bacterial strain *Halomonas bluephagenesis* TDZI-08 after investigating factors that hindered the process and optimizing the carbon source, nitrogen source, inducer addition time, and surfactant dosage. The open, non-sterile, one-pot synthesis with TDZI-08 in a 5 L fermenter achieved the highest IA titer of 40.50 g/L, with a catalytic yield of 0.68 g IA/g citric acid during the catalytic stage and a total yield of 0.42 g IA/g (citric acid+gluconic acid). The one-pot synthesis system established in this study is simple and does not need sterilization or aseptic operations. The findings indicate the potential of *H. bluephagenesis* for industrial production of IA.

Keywords: *Halomonas bluephagenesis*; itaconic acid; one-pot synthesis; process optimization

衣康酸(itaconic acid, IA), 也被称为亚甲基丁二酸, 是美国能源部公布的 12 种高附加值平台化合物之一, 在纤维、树脂和橡胶的生产中起着重要作用^[1-2]。衣康酸可通过化学法和微生物发酵法合成^[2-3], 其中微生物发酵法是工业生产衣康酸的主要方法。生物合成途径是从三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中间产物柠檬酸出发, 经顺乌头酸酶(aconitase, ACN)催化转化为顺乌头酸, 顺乌头酸再由顺乌头酸脱羧酶(*cis*-aconitate decarboxylase, CAD)催化成为衣康酸。目前工业上常用的生产菌株有丝状真菌土曲霉(*Aspergillus terreus*)和玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*), 最高产量分别可达 160 g/L 和 220 g/L 衣康酸^[4-5]。然而, 丝状真菌具有生长速度慢、

生产效率低、需氧量高、发酵重现性差和遗传背景复杂等缺点, 制约了衣康酸产量和得率的进一步提高。近年来, 多种异源宿主如黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[6-7]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[8-9]、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[10-11]和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)^[12-13]等也被改造并利用发酵法合成衣康酸, 但其产量(最高 54.6 g/L^[12])远低于天然生产宿主。

全细胞催化是利用微生物细胞作为催化剂进行底物转化的过程, 相较于微生物发酵法, 具有条件易控、反应高效、产物易于分离和细胞可回收利用等优点^[14]。近年来, 全细胞催化已应用于衣康酸的合成。通过对大肠杆菌^[15-19]、希瓦

氏菌 (*Shewanella livingstonensis*) 和盐单胞菌 (*Halomonas bluephagenesis*) 等进行代谢工程改造, 并利用工程化菌株细胞作为催化剂, 将廉价底物柠檬酸转化为衣康酸(表 1)。盐单胞菌催化系统是本课题组前期构建的, 通过在盐单胞菌 TD1.0 中引入衣康酸生物合成的必需基因(CAD 编码基因 *cadA* 和 *ACN* 编码基因 *acn*)、共表达分子伴侣蛋白基因 *groESL*、增加限速酶基因 *acn* 拷贝数和弱化竞争途径基因表达, 获得了工程菌

株 TDZI-08 (图 1)。在优化条件下, TDZI-08 细胞催化柠檬酸最高产生 63.60 g/L 衣康酸^[20]。尽管该盐单胞菌催化系统的衣康酸产量和效率低于大肠杆菌催化系统(表 1), 但由于盐单胞菌具有嗜盐嗜碱的特性, 在工业应用时可进行开放式不灭菌连续培养, 有利于简化生产工艺和降低生产成本^[21]。因此, 对盐单胞菌 TDZI-08 催化柠檬酸生产衣康酸工艺进行深入研究有望为其工业化生产提供实验基础。

表 1 全细胞催化柠檬酸合成衣康酸

Table 1 Whole cell catalytic synthesis of IA from citric acid

Strains	Strategies	Process	Titer (g/L)	Yield (g/g) ^a	References
<i>Escherichia coli</i> Rosetta(DE3)	Self-assembled reaction of aconitase (ACO) and CAD <i>via</i> protein-peptide interaction	Two-step cell catalysis	8.70	0.10	[15]
<i>E. coli</i> JY002	Overexpression of <i>acn</i> and multiple <i>cadA</i>		41.60	0.48	[16]
<i>E. coli</i> BL-CAR470E-DS/A-CS	Optimize CAD and synthesizing protein scaffolds to co-localize ACO and CAD	Two-step cell catalysis	51.79	–	[17]
<i>E. coli</i> AtCg	Overexpression of <i>cadA</i> and <i>acnA</i> under dual T7 promoters; optimization parameter and medium	Two-step cell catalysis	67.00	0.35	[18]
<i>E. coli</i> Lemo21(DE3)	Overexpression of <i>acn</i> and <i>cadA</i> ; cold treatment for 24 h; integration of <i>groESL</i> to chromosome	Two-step cell catalysis	98.17	0.51	[19]
<i>H. bluephagenesis</i> TDZI-08	Expression of <i>cadA</i> and <i>acn</i> ; co-expression of molecular chaperone GroESL; increasing the copy number of the <i>acn</i> ; downregulation of isocitrate dehydrogenase encoding gene <i>icd</i> ; optimization the reaction conditions	Two-step cell catalysis	63.60	0.63	[20]
<i>H. bluephagenesis</i> TDZI-08	Process optimization	One-pot synthesis	40.50	0.68	This study

^a: The yield was calculated according to the following formula: concentration of IA produced (g/L)/concentration of citric acid consumed (g/L).

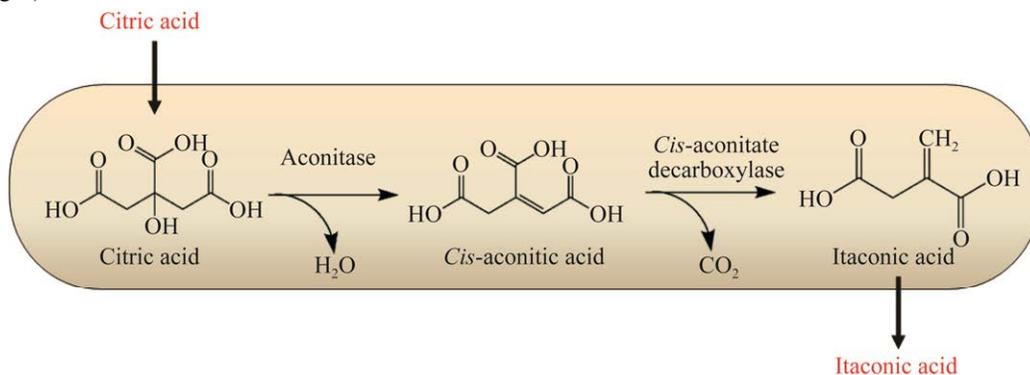


图 1 盐单胞菌 TDZI-08 以柠檬酸为底物合成衣康酸路径图

Figure 1 Pathway diagram of the synthesis of IA using citric acid as substrate in *Halomonas bluephagenesis* TDZI-08.

利用工程菌株 TDZI-08 两步法催化合成衣康酸时,需要先在丰富培养基中制备细胞,然后经过细胞收集、浓缩和洗涤后再转移到反应体系中进行催化,繁琐的工艺不利于后续的工业化应用^[20]。为了简化工艺,本研究基于工程菌株 TDZI-08 开发了一锅法合成衣康酸工艺,通过排查阻碍因素、优化碳源、氮源、诱导剂添加时间和表面活性剂添加量等,实现了细胞生长、诱导和催化合成的一体化,在开放式不灭菌条件下通过一锅法可高效合成衣康酸,从而简化了工艺流程,有利于提高经济效益,对衣康酸的产业化发展具有重要参考价值。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验所使用的菌株是前期本课题组构建的工程化盐单胞菌 *H. bluephagenesis* TDZI-08^[20]。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母抽提物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。

60-LB 培养基(g/L): 酵母抽提物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 60.0。

60-MM 培养基(g/L): 氯化钠 60.0, 酵母提取物 5.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.7, KH_2PO_4 1.5, MgSO_4 0.2, NH_4Cl 1.0, 溶液 I 10.0 mL, 溶液 II 1.0 mL, 根据实验需求添加适量柠檬酸钠或葡萄糖酸钠为碳源, 采用 5.0 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.5–9.0。

溶液 I (g/L): 柠檬酸铁铵 5.0, CaCl_2 2.0, 用 1.0 mol/L HCl 溶液配制。

溶液 II (mg/L): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100.0, H_3BO_3 300.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.0, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30.0, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.0, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30.0。

MM 培养基(g/L): 在 60-MM 基础上去除

60.0 g/L 氯化钠并调整碳源和氮源得到, 柠檬酸钠和葡萄糖酸钠混合物(总钠离子物质的量浓度不低于 0.68 mol/L 以维持盐单胞菌生长渗透压)为碳源, 酵母提取物 5.0+氯化铵 1.0 或酵母提取物 2.5+玉米浆干粉 2.5+氯化铵 5.0 为氮源, 其余组分不变。

培养基使用前添加 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 壮观霉素和 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素。

1.3 一锅法合成衣康酸方法

取 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保藏的 TDZI-08 甘油管液体, 在含抗生素的 60-LB 平板上划线, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养 24 h; 挑取单菌落接种于含抗生素的 60-LB 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h 获得一级种子液; 取一级种子液按 1% (体积分数)接种量转接至含抗生素的 60-LB 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养 10–12 h 获得二级种子液; 将二级种子液按 10% (体积分数)接种量转接至含有 200 mL 60-MM 液体培养基的 2 L 带挡板摇瓶中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 培养; 当细胞 OD_{600} 为 3 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 诱导培养 10 h; 诱导结束后, 使用柠檬酸溶液(500 g/L)下调并维持 pH 至 6.3 (同时也起到补加底物柠檬酸的作用), 并添加表面活性剂曲拉通 X-100 (Triton X-100)以增加细胞膜通透性促进反应进行^[20], 在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 条件下进行催化反应。其中培养基的碳源、氮源、诱导剂添加时间以及表面活性剂添加量按 2.3 所示进行优化。

1.4 5 L 发酵罐开放式一锅法合成衣康酸

二级种子液制备操作同 1.3 所述, 将二级种子液按 10% (体积分数)接种量转接至含有 2 L 60-MM 液体培养基的 5 L 发酵罐(上海百仑生物科技有限公司)中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、500 r/min 培养, 关联转速(500–800 r/min)和溶氧, 维持溶氧在 30%左

右;培养基、补料液和发酵罐体均不灭菌,接种和补料在开放式条件下操作;当细胞 OD_{600} 增长至 15 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,转至 30 °C 诱导培养 10 h;诱导结束后,将转速下调至 500 r/min,断开通气,使用柠檬酸溶液(500 g/L)下调并维持 pH 至 6.3,添加 0.03% Triton X-100,进行催化反应,当衣康酸产量不再增加时停止反应。

1.5 细胞生物量和反应物浓度的测定

细胞生物量使用 600 nm 下的吸光值(OD_{600})表示,取培养液适当稀释后,用紫外分光光度计 TU-1801 (北京普析通用仪器有限责任公司)测定 600 nm 波长下的吸光度。反应物柠檬酸、衣康酸、顺乌头酸和葡萄糖酸钠的含量采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定,检测条件为:HPLC 系统(Agilent Technologies 公司),分离柱为 Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 9 μm, Bio-Rad 公司),流动相为 0.5 mmol/L H_2SO_4 ,流速为 0.4 mL/min,柱温为 60 °C,柠檬酸、衣康酸和顺乌头酸采用紫外检测器(波长为 210 nm)检测,葡萄糖酸钠采用示差检测器检测。

2 结果与分析

2.1 一锅法合成衣康酸初步测试

为了实现利用菌株 TDZI-08 进行一锅法合成衣康酸,在 60-MM 培养基中添加 32 g/L 的二水合柠檬酸三钠(相当于 21 g/L 柠檬酸)作为碳源进行测试。接种后,分别在细胞密度(OD_{600})达到 1 和 3 时,添加 IPTG 进行诱导培养,48 h 后取样检测细胞生物量、柠檬酸残余量和衣康酸产量,结果如图 2 所示。在 OD_{600} 为 1 时加入 IPTG 导致细胞生长和代谢迟缓,最高细胞密度(OD_{600})为 1.73,且仅消耗了 4.30 g/L 柠檬酸,几乎没有衣康酸生成(图 2);当 OD_{600} 为 3 时加

IPTG 诱导培养,细胞生长有明显改善,细胞 OD_{600} 最高为 8.04,消耗了 14.10 g/L 柠檬酸,但衣康酸产量非常低(0.81 g/L) (图 2)。结果表明一锅法合成衣康酸的效率很低,为提高其合成效率,需要对影响因素进行排查和优化。

2.2 一锅法合成衣康酸影响因素的探索

前期研究发现,在盐单胞菌细胞催化合成衣康酸的过程中,维持反应体系中 pH 在 6.0–6.5 和添加表面活性剂 Triton X-100 是衣康酸高效合成的必要条件^[20]。然而,由于 60-MM 培养基的 pH 约为 9.0 且不含表面活性剂,可能会影响一锅法合成衣康酸的效率。使用初步测试的条件培养和诱导细胞(生长和诱导阶段),48 h 后使用 1 mol/L HCl 将培养液 pH 下调至 6.5,并补加 0.5% Triton X-100,以转变为适合细胞催化的条件(催化阶段),但衣康酸产量仍没有增加,这表明还有其他影响因素。

前期两步细胞催化时发现,在反应体系中添加高浓度氯化钠会显著降低衣康酸的合成效率。以 96 g/L 柠檬酸为底物,当催化体系中不含 1 mol/L 氯化钠时,反应正常,催化 47 h 产生 55 g/L 衣康酸(图 3A);当催化体系中含 1 mol/L 氯化钠

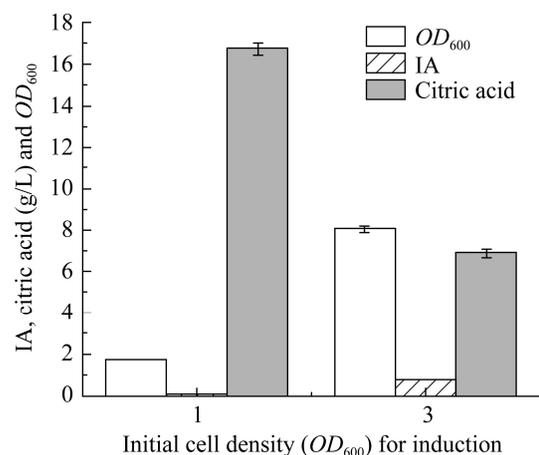


图 2 不同细胞密度时 IPTG 诱导对衣康酸合成的影响

Figure 2 Effect of IPTG induction at different cell density on IA synthesis.

时, 柠檬酸消耗明显减慢, 催化 45 h 仅产生 15 g/L 衣康酸(图 3B)。由于 60-MM 培养基中含 60 g/L 氯化钠(相当于 1 mol/L 氯化钠)以维持盐单胞菌生长所需的渗透压, 推测可能是高浓度氯化钠的存在影响了一锅法合成衣康酸的效率。盐单胞菌能在高盐环境下生存, 高浓度钠离子是其正常生长所依赖的^[22]。为了排除氯化钠对衣康酸合成的影响, 使用柠檬酸钠盐替代氯化钠以维持盐单胞菌的正常生长。盐单胞菌生长最适氯化钠浓度为 40–80 g/L^[23], 初步选择 40 g/L 氯化钠对应的钠离子浓度(0.68 mol/L)以确定柠檬酸钠盐的初始添加量, 将 60-MM 培养基调整为 MM, 即用 67 g/L 二水合柠檬酸三钠(含 0.68 mol/L 钠离子)替换 60 g/L 氯化钠, 其余成分不变。以 MM 为培养基进行三阶段培养: (1) 生长阶段。培养基 pH 用 5 mol/L NaOH 调至 9.0, 在 37 °C、200 r/min 下培养; (2) 诱导阶段。细胞 OD_{600} 增长至 3 时, 加入 IPTG, 30 °C、200 r/min 诱导培养至 24 h, pH 维持在 8.5–9.0; (3) 催化阶段。添加 0.5% Triton X-100, 并使用柠檬酸溶液(500 g/L)将 pH 下调至 6.3, 于 30 °C、200 r/min 下进行细胞催化, 其间使用柠檬酸溶液(500 g/L)

维持控制 pH 在 6.3 左右; 取样测定柠檬酸、衣康酸和顺乌头酸浓度以及细胞 OD_{600} , 结果如图 4 所示。细胞诱导培养后(24 h 时)的最高 OD_{600} 为 9.2, 转为催化阶段后, OD_{600} 快速降至 3 左右, 到催化结束时降至 2 左右; 细胞 OD_{600} 下降的很大原因是 Triton X-100 的添加导致细胞裂解, 因为一定浓度的 Triton X-100 可以破坏细胞膜的结构, 使细胞膜中的脂质层发生溶解导致细胞破碎; 生长和诱导阶段几乎没有衣康酸产生(<0.1 g/L), 调节 pH 为 6.3 后, 衣康酸快速积累, 最高产生了 3.50 g/L 衣康酸。以上结果表明经过去除氯化钠、调控 pH 和添加表面活性剂后, 可实现一锅法合成衣康酸。

2.3 一锅法合成衣康酸工艺优化

虽然初步确定了一锅法合成衣康酸的工艺, 但与两步细胞催化法相比, 衣康酸的产量仍较低, 推测是因为一锅法培养时获得的细胞量(最高 OD_{600} 仅 9.2)太低所致。为了增加细胞量, 对培养基中的碳源、氮源和 IPTG 添加时间进行优化。此外, 对表面活性剂的添加量也进行了优化。

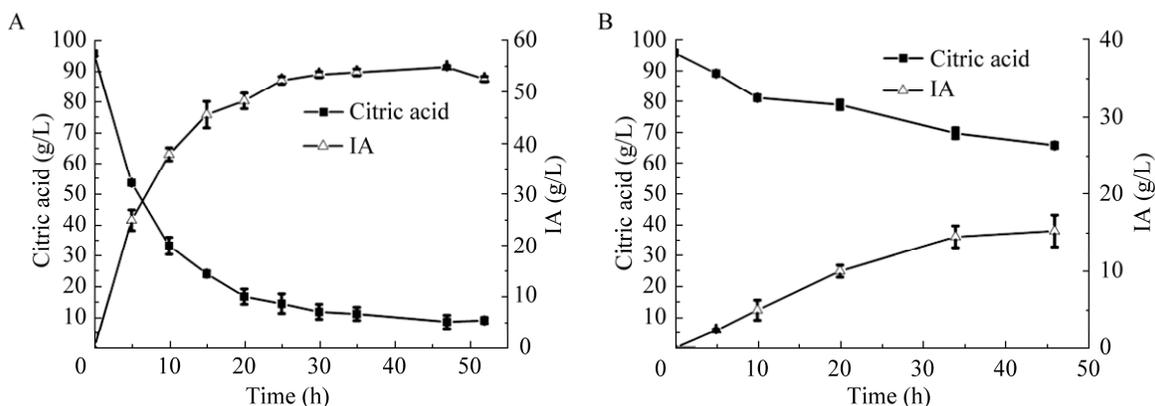


图 3 高浓度氯化钠对细胞催化柠檬酸合成衣康酸效率的影响 A: 催化体系中不含 1 mol/L 氯化钠. B: 催化体系中含 1 mol/L 氯化钠

Figure 3 Effect of high concentration sodium chloride on the efficiency of cell-catalyzed IA synthesis. A: Catalytic system without 1 mol/L sodium chloride. B: Catalytic system containing 1 mol/L sodium chloride.

2.3.1 优化碳源和氮源

为了改善盐单胞菌的生长, 将培养基中的渗透压提高, 即将总钠离子浓度提高至 0.77 mol/L (相当于 45 g/L 氯化钠所含的钠离子浓度)。在改造盐单胞菌合成其他产品的研究中, 发现使用 80 g/L 葡萄糖酸钠为碳源, 2.5 g/L 酵母提取物和 2.5 g/L 玉米浆干粉为氮源时, 盐单胞菌生长良好; 此外, 本课题组的研究发现, 将氯化铵浓度提高至 5 g/L 可以显著促进盐单胞菌的生长 (相关数据尚未发表)。因此, 采用 80 g/L 葡萄糖酸钠和 40 g/L 二水合柠檬酸三钠 (总钠离子浓度为 0.77 mol/L) 混合物为碳源, 同时添加 2.5 g/L 酵母提取物、2.5 g/L 玉米浆干粉和 5 g/L 氯化铵为氮源, 培养盐单胞菌 TDZI-08 并测试其细胞生长和衣康酸产生情况。结果表明, 改变碳源和氮源条件后, 细胞生长和衣康酸的合成都有明显改善 (图 5)。在生长阶段, 生物量迅速增长, 培养 17 h 时 OD_{600} 达到 30; 在 17 h 时添加 0.5% Triton X-100 并流加柠檬酸溶液 (500 g/L) 下调 pH 至 6.3 转为催化阶段, OD_{600} 降至 10 (这是由于表面活性剂 Triton X-100 导致细胞裂解所致); 在催化阶段衣康酸快速合成, 经过 36 h 的催化产生了 22.33 g/L 衣康酸 (图 5)。

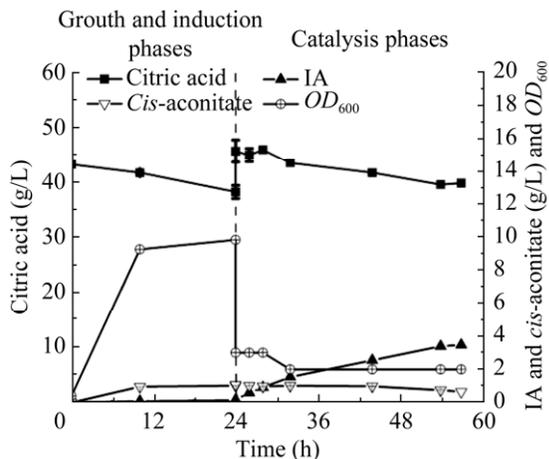


图 4 一锅法合成衣康酸相关参数
Figure 4 Characterization of one-pot synthesis of IA.

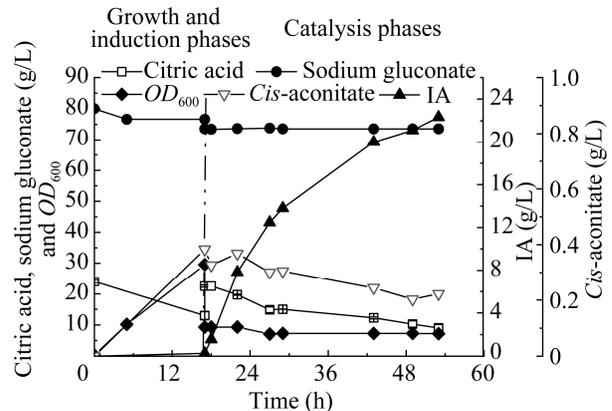


图 5 改变碳源和氮源对底物消耗、细胞生长和衣康酸产量的影响

Figure 5 Substrate consumption, cell growth, and IA production after changing carbon and nitrogen sources.

然而, 在上述条件下葡萄糖酸钠仅在生长阶段有少量消耗, 催化阶段不能用于衣康酸的合成, 导致葡萄糖酸钠有大量残留 (60–70 g/L) (图 5)。这既造成了底物的浪费也增加了产物分离难度, 需要降低混合物中葡萄糖酸钠的添加量。因此, 测试了两种碳源在不同配比条件下的细胞生长和底物消耗情况: (1) 30 g/L 葡萄糖酸钠+67 g/L 二水合柠檬酸三钠; (2) 20 g/L 葡萄糖酸钠+75 g/L 二水合柠檬酸三钠。结果如图 6 所示, 配比 1 最高细胞 OD_{600} (OD_{600} 为 54) 虽然略高于配比 2 (OD_{600} 为 50), 但诱导培养后配比 1 中葡萄糖酸钠剩余约 11 g/L, 而配比 2 中葡萄糖酸钠能够被完全消耗, 从而更有利于后续的分选纯化。综合考虑, 优选配比 2 作为 MM 培养基的碳源。

2.3.2 优化 IPTG 添加时间

前期研究表明适当推迟 IPTG 添加有助于增加诱导培养的细胞量^[20,24]。以 20 g/L 葡萄糖酸钠+75 g/L 二水合柠檬酸三钠为碳源, 2.5 g/L 酵母提取物、2.5 g/L 玉米浆干粉和 5 g/L 氯化铵为氮源培养盐单胞菌 TDZI-08, 当细胞 OD_{600} 分别

增长至 7、11、14 和 15 时, 添加 IPTG 并诱导培养 10 h, 然后添加 0.5% Triton X-100 并流加柠檬酸溶液(500 g/L)下调 pH 至 6.3, 转为催化阶段并反应 36 h。诱导后的最高 OD_{600} 和衣康酸产量如图 7 所示。当细胞 OD_{600} 分别为 7、11、14 和 15 时添加 IPTG, 诱导培养获得的最高细胞 OD_{600} 分别为 25、40、47 和 54; 整个过程中初始添加的 20 g/L 葡萄糖酸钠均被完全消

耗, 此外还分别消耗了 56.67、76.27、94.96、100.90 g/L 柠檬酸; 催化 36 h 的衣康酸产量分别为 28.07、36.51、43.84、44.77 g/L, 衣康酸总得率分别为 0.376、0.387、0.388、0.380 g/g (葡萄糖酸+柠檬酸)。以上结果表明适当推迟 IPTG 添加有利于改善细胞生长和衣康酸合成, 选择细胞 OD_{600} 为 15 时作为 IPTG 的添加时间点。

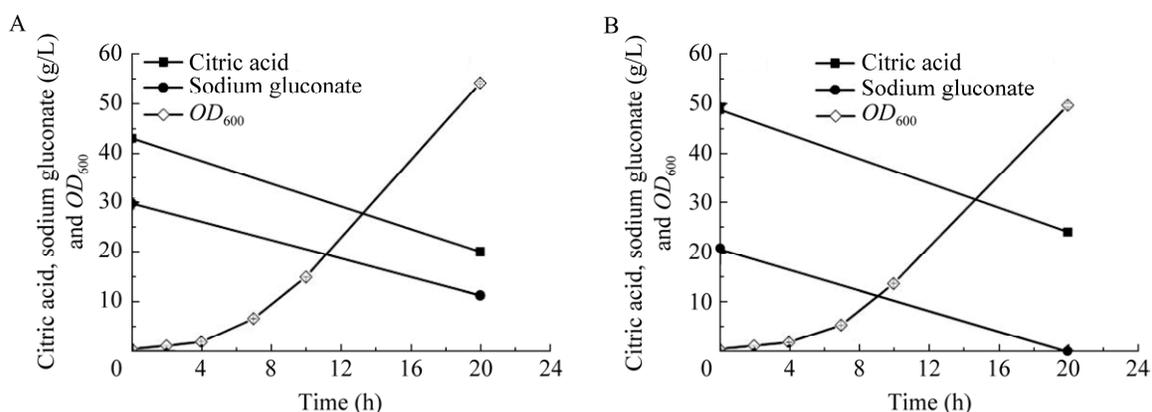


图 6 不同碳源配比下底物消耗和细胞生长 A: 30 g/L 葡萄糖酸钠+67 g/L 二水合柠檬酸三钠. B: 20 g/L 葡萄糖酸钠+75 g/L 二水合柠檬酸三钠

Figure 6 Substrate consumption and cell growth under different carbon source ratios. A: 30 g/L sodium gluconate+67 g/L trisodium citrate dihydrate. B: 20 g/L sodium gluconate+75 g/L trisodium citrate dihydrate.

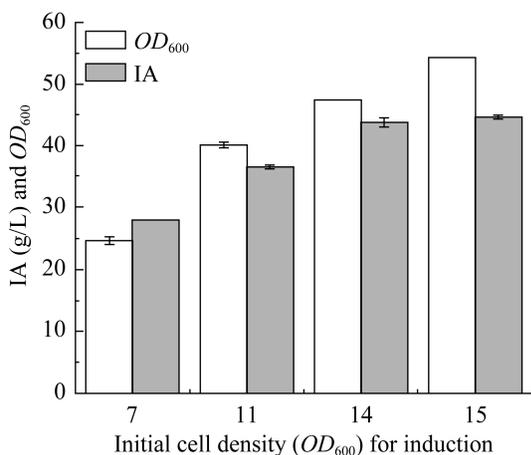


图 7 IPTG 诱导时的初始细胞密度(OD_{600})对细胞生长和衣康酸产量的影响

Figure 7 Effect of initial cell density (OD_{600}) induced by IPTG on cell growth and IA production.

2.3.3 优化表面活性剂添加量

为减少表面活性剂的使用, 对 Triton X-100 添加量进行优化。以 20 g/L 葡萄糖酸钠+75 g/L 二水合柠檬酸三钠为碳源, 2.5 g/L 酵母提取物、2.5 g/L 玉米浆干粉和 5 g/L 氯化铵为氮源, 培养盐单胞菌 TDZI-08, 当细胞 OD_{600} 增长至 15 时添加 IPTG 并诱导培养 10 h, 然后分别添加 0.01%、0.02%、0.03% 和 0.05% Triton X-100 并补加柠檬酸溶液(500 g/L)下调 pH 至 6.3 转为催化阶段, 当衣康酸产量不再增加时终止反应, 结果如图 8 所示。当 Triton X-100 添加量为 0.03% 和 0.05% 时, 衣康酸最高产量分别为 43.12 g/L (图 8C) 和 44.80 g/L (图 8D), 与添加量

0.5%时无差别(图 5); 但当 Triton X-100 添加量降为 0.02%时, 只产生了 33.89 g/L 衣康酸(图 8B), 继续降至 0.01%时, 产生的衣康酸仅 11.79 g/L (图 8A)。因此, 为保证催化的正常进行, Triton X-100 添加量选定为 0.03%。

至此, 确定了一锅法合成衣康酸工艺: 使用 MM 培养基(20 g/L 葡萄糖酸钠+75 g/L 二水合柠檬酸三钠为碳源, 2.5 g/L 酵母提取物+2.5 g/L 玉米浆干粉+5 g/L 氯化铵为氮源)进行三阶段培养。(1) 生长阶段: 培养基 pH 用 5 mol/L NaOH 调至 9.0, 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 此时细胞 OD_{600} 约 15; (2) 诱导阶段: 细胞 OD_{600} 为 15 时, 加入 IPTG, 30 °C、200 r/min 诱导培养, pH 维持在 8.5–9.0, 培养 10 h, 转为催化阶段; (3) 催

化阶段: 使用柠檬酸溶液(500 g/L)将 pH 下调并维持在 6.3, 添加 0.03% Triton X-100, 在 30 °C、200 r/min 条件下进行催化。

根据上述条件, TDZI-08 在摇瓶中采用一锅法催化反应 36 h 合成 43.12 g/L 衣康酸(体积 200 mL), 生长阶段消耗了 20.0 g/L 葡萄糖酸钠(实测 17.3 g/L 葡萄糖酸)和 24.75 g/L 柠檬酸, 共计 3.46 g 葡萄糖酸和 4.95 g 柠檬酸, 催化阶段共消耗 13.68 g 柠檬酸, 催化阶段的衣康酸得率为 0.63 g/g 柠檬酸, 衣康酸总得率为 0.39 g/g (柠檬酸+葡萄糖酸); 反应体系中只有衣康酸、柠檬酸和少量中间产物顺乌头酸(<0.20 g/L), 相对纯净, 便于下游分离; 整个过程无需细胞收集、浓缩和洗涤操作, 简单便捷。

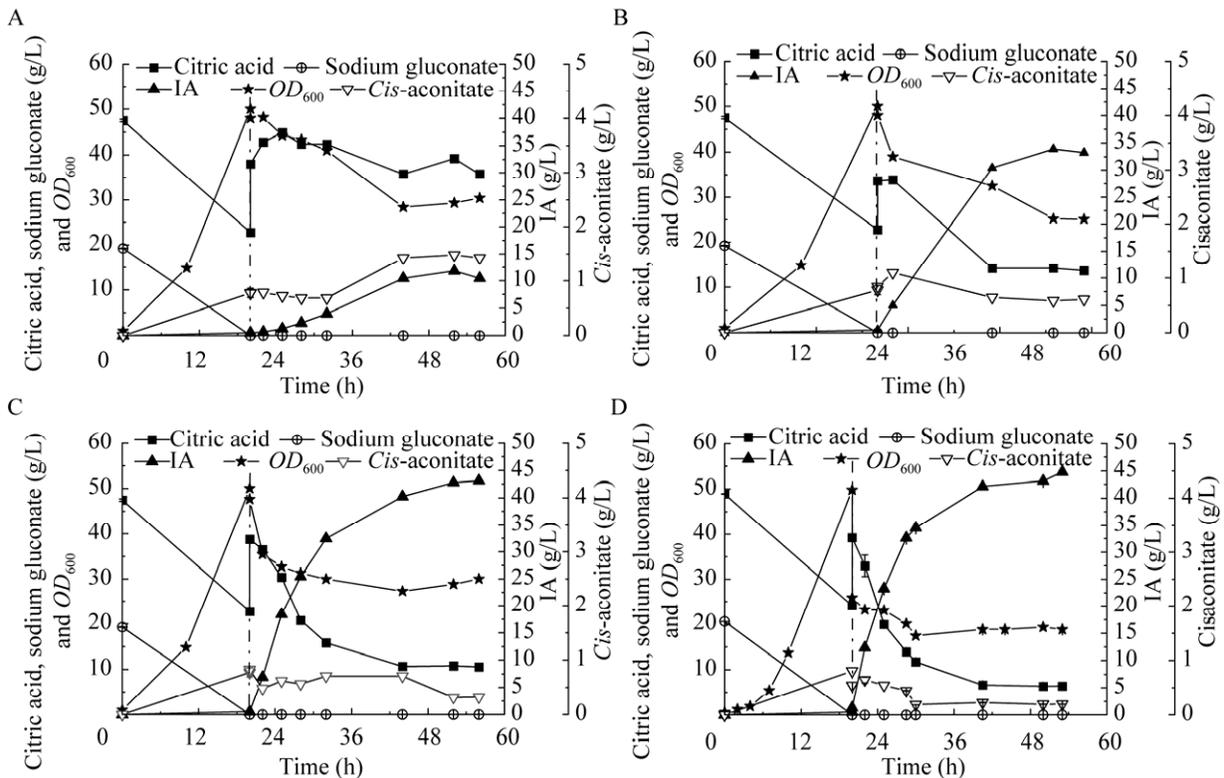


图 8 不同 Triton X-100 添加量对衣康酸合成的影响

Figure 8 Effect of different Triton X-100 addition amounts on IA production. A: 0.01% Triton X-100. B: 0.02% Triton X-100. C: 0.03% Triton X-100. D: 0.05% Triton X-100.

2.4 开放式不灭菌条件下在 5 L 发酵罐中一锅法合成衣康酸

在 5 L 发酵罐中进行开放式不灭菌一锅法合成衣康酸。初始体积为 2 L, 细胞 OD_{600} 增加至 15 时加 IPTG 并诱导培养 10 h, 然后转为催化阶段并到反应结束, 周期时长为 56 h, 过程中补料液的流加使最终体积增加至 2.04 L, 期间取样检测细胞 OD_{600} 、底物消耗及衣康酸产量, 结果如图 9 所示。在开放式不灭菌条件下, 诱导培养后的细胞最大 OD_{600} 为 41 (23 h), 添加 0.03% Triton X-100 并流加柠檬酸溶液(500 g/L)转为催化阶段后, OD_{600} 降至 30 左右, 到催化结束时 OD_{600} 降低至 15 左右; 生长阶段(前 23 h)葡萄糖酸钠(实测 17.90 g/L 葡萄糖酸)完全耗尽, 柠檬酸(实测 46.69 g/L)消耗了 18.71 g/L (剩余 27.98 g/L), 生长阶段共计消耗了 35.80 g 葡萄糖酸和 37.42 g 柠檬酸; 培养 23 h 时流加柠檬酸溶液(500 g/L)下调 pH 并维持至 6.3 转为催化阶段, 到催化结束共流加了 160 mL 柠檬酸溶液(共计 80 g 柠檬酸), 最后反应体系中剩余 7.21 g/L 柠檬酸, 催化阶段共计消耗了 121.25 g 柠檬酸; 催化阶段衣康酸快速积累, 反应 33 h 产生了 40.50 g/L 衣康酸(共计 82.62 g 衣康酸), 此阶段衣康酸产

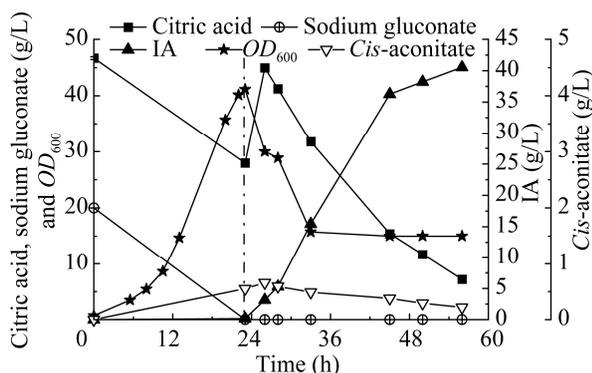


图 9 开放式不灭菌条件下在 5 L 发酵罐中一锅法合成衣康酸

Figure 9 One-pot synthesis of IA in a 5 L fermentation tank under open and unsterile conditions.

率为 1.23 g/(L·h), 得率达到了理论值(0.68 g/g 柠檬酸); 整个过程的衣康酸总得率为 0.42 g/g (柠檬酸+葡萄糖酸)。

3 讨论与结论

本研究基于工程化盐单胞菌 TDZI-08, 通过排查影响因素、优化细胞培养和表面活性剂添加量等途径, 开发了一锅法催化柠檬酸合成衣康酸工艺。在摇瓶中 TDZI-08 可利用一锅法合成 43.12 g/L 衣康酸, 催化阶段的衣康酸得率为 0.63 g/g 柠檬酸, 衣康酸总得率为 0.39 g/g (柠檬酸+葡萄糖酸) (图 8C); 在 5 L 发酵罐中进行开放式不灭菌一锅法合成, 产生了 40.50 g/L 衣康酸, 催化阶段的衣康酸得率达到了理论值(约为 0.68 g/g 柠檬酸), 总得率为 0.42 g/g (柠檬酸+葡萄糖酸) (图 9)。与前期的两步细胞催化法相比, 本研究中的一锅法合成过程无须细胞收集、浓缩和洗涤操作, 工艺流程更加简单; 与传统大肠杆菌催化系统相比, 盐单胞菌催化系统无须灭菌和无菌操作, 生产成本更加低廉。然而, 在发酵罐中一锅法合成衣康酸时 OD_{600} 出现两次明显的下降, 第一次是转为催化阶段时(23 h), OD_{600} 从 41 快速降至 30 (图 9), 这可能是因为表面活性剂 Triton X-100 的添加导致细胞裂解; 第二次是在 28 h 时发酵罐内容氧从之前的 30% 上升至 70%, OD_{600} 从 29 (28 h) 降至 15 左右(33 h) (图 9), 这可能与催化环境(包括溶氧和酸性环境)不利以及长时间搅拌导致细胞衰亡有关。细胞 OD_{600} 的下降反映了细胞裂解的增加, 导致更多的衣康酸合成酶释放至胞外, 这会降低酶的稳定性和催化活性, 从而减弱衣康酸的合成效率。因此, 后续需对条件进行优化和调整, 以进一步提高一锅法合成衣康酸的水平。

近年来随着研究的深入, 以大肠杆菌为底盘的催化系统在衣康酸合成方面取得了显著进展。

例如, 2022 年, Hsiang 等^[18]在大肠杆菌 BL21 中过表达 *cad* 和 *acn* 构建了工程菌 *E. coli* AtCg, 经过优化培养基、细胞量、反应时间和反应 pH 等参数后, 利用两步细胞催化法以柠檬酸为底物合成了 67.00 g/L 衣康酸, 产率为 8.375 g/(L·h) (表 1); 2023 年, Diankristanti 等^[19]在大肠杆菌 Lemo21(DE3)基因组上整合表达分子伴侣基因 *groESL*, 并引入表达 *cadA* 和 *acnA* 的质粒, 构建获得的菌株 L21::7G 经 -80 °C 低温处理 24 h 后用于细胞催化, 最高产生了 98.17 g/L 衣康酸, 产率为 9.82 g/(L·h), 且经过 4 轮重复催化合成的衣康酸产量仍保持在 86.9% (表 1)。相比之下, 以盐单胞菌为底盘的催化系统在衣康酸产量 (40.50 g/L) 和产率 [1.23 g/(L·h)] 方面仍存在较大差距。为了提高盐单胞菌底盘的催化效率, 可以进一步优化盐单胞菌工程菌株中衣康酸合成关键酶在转录 (主要从启动子工程、密码子优化和优化蛋白表达系统^[25]等方面展开) 和翻译层面 (主要对翻译起始区包括核糖体结合序列、核糖体结合序列与翻译起始位点之间的连接区域以及基因编码序列的前 5 个密码子进行优化^[26]) 的表达, 或利用蛋白质工程技术改善衣康酸合成关键酶的活性和稳定性, 以期达到更高的衣康酸产量和产率。

致谢

感谢清华大学陈国强教授提供盐单胞菌出发菌株和工具质粒。

REFERENCES

- [1] OKABE M, LIES D, KANAMASA S, PARK EY. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(4): 597-606.
- [2] KUENZ A, KRULL S. Biotechnological production of itaconic acid—things you have to know[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 3901-3914.
- [3] PFEIFER VF, VOJNOVICH C, HEGER EN. Itaconic acid by fermentation with *Aspergillus terreus*[J]. Industrial & Engineering Chemistry, 1952, 44(12): 2975-2980.
- [4] KRULL S, HEVEKERL A, KUENZ A, PRÜBE U. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4063-4072.
- [5] HOSSEINPOUR TEHRANI H, BECKER J, BATOR I, SAUR K, MEYER S, RODRIGUES LÓIA AC, BLANK LM, WIERCKX N. Integrated strain- and process design enable production of 220 g/L itaconic acid with *Ustilago maydis*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 263.
- [6] HOSSAIN AH, LI A, BRICKWEDDE A, WILMS L, CASPERS M, OVERKAMP K, PUNT PJ. Rewiring a secondary metabolite pathway towards itaconic acid production in *Aspergillus niger*[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 130.
- [7] van der STRAAT L, VERNOOIJ M, LAMMERS M, van den BERG W, SCHONEWILLE T, CORDEWENER J, van der MEER I, KOOPS A, de GRAAFF LH. Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 11.
- [8] HARDER BJ, BETTENBROCK K, KLAMT S. Temperature-dependent dynamic control of the TCA cycle increases volumetric productivity of itaconic acid production by *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(1): 156-164.
- [9] HARDER BJ, BETTENBROCK K, KLAMT S. Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 29-37.
- [10] MERKEL M, KIEFER D, SCHMOLLACK M, BLOMBACH B, LILGE L, HENKEL M, HAUSMANN R. Acetate-based production of itaconic acid with *Corynebacterium glutamicum* using an integrated pH-coupled feeding control[J]. Bioresource Technology, 2022, 351: 126994.
- [11] OTTEN A, BROCKER M, BOTT M. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the

- production of itaconate[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 156-165.
- [12] RONG LX, MIAO L, WANG SH, WANG YP, LIU SQ, LU ZH, ZHAO BX, ZHANG CY, XIAO DG, PUSHPANATHAN K, WONG A, YU AQ. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce itaconic acid from waste cooking oil[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 888869.
- [13] ZHAO C, CUI ZY, ZHAO XY, ZHANG JX, ZHANG LH, TIAN YJ, QI QS, LIU JJ. Enhanced itaconic acid production in *Yarrowia lipolytica* via heterologous expression of a mitochondrial transporter MTT[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(5): 2181-2192.
- [14] de CARVALHO CC. Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(2): 250-263.
- [15] YANG ZW, GAO X, XIE H, WANG FQ, REN YH, WEI DZ. Enhanced itaconic acid production by self-assembly of two biosynthetic enzymes in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(2): 457-462.
- [16] KIM J, SEO HM, BHATIA SK, SONG HS, KIM JH, JEON JM, CHOI KY, KIM W, YOON JJ, KIM YG, YANG YH. Production of itaconate by whole-cell bioconversion of citrate mediated by expression of multiple *cis*-aconitate decarboxylase (*cadA*) genes in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 39768.
- [17] FENG J, LI CQ, HE H, XU S, WANG X, CHEN KQ. Construction of cell factory through combinatorial metabolic engineering for efficient production of itaconic acid[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 275.
- [18] HSIANG CC, DIANKRISTANTI PA, TAN SI, KE YC, CHEN YC, EFFENDI SSW, NG IS. Tailoring key enzymes for renewable and high-level itaconic acid production using genetic *Escherichia coli* via whole-cell bioconversion[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 160: 110087.
- [19] DIANKRISTANTI PA, NG IS. Microbial itaconic acid bioproduction towards sustainable development: insights, challenges, and prospects[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 384: 129280.
- [20] ZHANG J, JIN B, HONG KQ, LV Y, WANG ZW, CHEN T. Cell catalysis of citrate to itaconate by engineered *Halomonas bluephagenesis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(11): 3017-3027.
- [21] TAN D, WU Q, CHEN JC, CHEN GQ. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 26: 34-47.
- [22] 王伟伟, 唐鸿志, 许平. 嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(3): 550-558.
WANG WW, TANG HZ, XU P. Salt-tolerance related genes in halophilic bacteria and archaea[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(3): 550-558 (in Chinese).
- [23] 陈国强, 薛源生, 谭丹, 吴琼. 一株盐单胞菌及其应用: CN102120973A[P]. 2011-07-13.
CHEN G, XUE YS, TAN D, WU Q. *Halomonas* strain and application thereof: CN102120973A[P]. 2011-07-13 (in Chinese).
- [24] OLAOFE OA, BURTON SG, COWAN DA, HARRISON STL. Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 52(1): 19-24.
- [25] CHEN JP, GONG JS, SU C, LI H, XU ZH, SHI JS. Improving the soluble expression of difficult-to-express proteins in prokaryotic expression system via protein engineering and synthetic biology strategies[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 78: 99-114.
- [26] RENNIG M, MUNDHADA H, WORDOFA GG, GERNGROSS D, WULFF T, WORBERG A, NIELSEN AT, NØRHOLM MHH. Industrializing a bacterial strain for L-serine production through translation initiation optimization[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(10): 2347-2358.

(本文责编 陈宏宇)