

定向进化产琥珀酸放线杆菌高产丁二酸

孙文清^{1,2}, 赵运英^{1,2*}, 周胜虎^{1,2}, 邓禹^{1,2*}

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

孙文清, 赵运英, 周胜虎, 邓禹. 定向进化产琥珀酸放线杆菌高产丁二酸[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1994-2009.

SUN Wenqing, ZHAO Yunying, ZHOU Shenghu, DENG Yu. Directed evolution of *Actinobacillus succinogenes* for high succinic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1994-2009.

摘要: 丁二酸是一种重要的高值平台化合物, 广泛应用于化工、食品、医药等多个领域。化学法生产丁二酸具有高污染、高碳排放等缺陷, 因此发酵法成为目前丁二酸生产的主要方法。天然可产丁二酸的产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)具有丁二酸产量高、耐高渗、发酵时间短等优势, 是一种重要的工业生产菌株。为了进一步提高 *A. succinogenes* 的丁二酸产量, 降低生产成本, 本研究建立了一种基于溴百里酚蓝的简便高通量筛选方法, 结合常压室温等离子体诱变的方法对野生菌 *A. succinogenes* 进行了定向进化, 筛选得到了高产诱变菌株 A4-K74。此菌株在摇瓶中厌氧发酵 72 h 后最高积累 56.3 g/L 丁二酸, 比野生菌株提高了 40.8%, 且具有良好的遗传稳定性。转录组分析揭示了硫代谢途径以及半胱氨酸等氨基酸合成途径的增强是丁二酸产量提高的潜在原因, 为未来代谢工程改造 *A. succinogenes* 提供了参考, 有利于进一步推进丁二酸的生物法工业化生产。

关键词: 产琥珀酸放线杆菌; 丁二酸; 常压室温等离子体诱变; 高通量筛选; 转录组分析

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2104600); 江苏省杰出青年基金(BK20220089); 国家自然科学基金(22478156); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-KJGG-015)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2104600), the Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK20220089), the National Natural Science Foundation of China (22478156), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-015).

*Corresponding authors. E-mail: DENG Yu, dengyu@jiangnan.edu.cn; ZHAO Yunying, yunyingzhao@jiangnan.edu.cn.

Received: 2025-01-23; Accepted: 2025-03-18; Published online: 2025-03-20

Directed evolution of *Actinobacillus succinogenes* for high succinic acid production

SUN Wenqing^{1,2}, ZHAO Yunying^{1,2*}, ZHOU Shenghu^{1,2}, DENG Yu^{1,2*}

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

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Succinic acid, an important high-value platform compound, is widely used in chemical, food, and medicine fields. The chemical production of succinic acid has the defects of high pollution and high carbon emissions. Therefore, the fermentation method has become the main direction of succinic acid production at present. *Actinobacillus succinogenes*, a naturally succinic acid-producing strain, is praised for the high titer, high osmotic pressure tolerance, and short fermentation time, thus serving as an ideal strain for industrial production. Improving the succinic acid titer of *A. succinogenes* and thus reducing the production cost is an urgent need for industrial production. In this study, we developed a simple high-throughput screening method by combining bromothymol blue with atmospheric room-temperature plasma mutagenesis to direct the evolution of wild type *A. succinogenes*. A high-yielding mutant strain, A4-K74, was screened out. After 72 hours of anaerobic fermentation in a shake flask, this strain accumulated a maximum of 56.3 g/L of succinic acid, which represented a 40.8% increase compared with that of the wild type strain. Moreover, A4-K74 demonstrated good genetic stability. The transcriptome analysis revealed that the enhancement of sulfur metabolic pathway and amino acid (such as cysteine) synthesis pathway was the potential reason for the increase in succinic acid titer, which provided a reference for the future metabolic engineering of *A. succinogenes* and was conducive to the further promotion of the industrial production of succinic acid by bioprocessing.

Keywords: *Actinobacillus succinogenes*; succinic acid; atmospheric room-temperature plasma mutagenesis; high-throughput screening; transcriptome analysis

丁二酸(succinic acid)被美国能源部确定为12种高附加值生物基“平台化学品”之一,在化工、医药、食品、能源、化妆品等多个领域具有广泛应用。丁二酸是许多重要生物基化学品的前体,例如1,4-丁二醇(1,4-butanediol, 1,4-BDO)、四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)和聚丁二酸聚丁二醇酯[poly(butylene succinate), PBS]等^[1]。丁二酸的市场需求量极大,2021年的全球市场价值约为10.28亿美元,预计2030年将达到36.13亿美元,因此,可以看出丁二酸的生产极具前景^[2]。传统的丁二酸生产主要通过

石油化工原料(如天然气和石油)合成,具有底物不可再生、碳排放高、环境污染严重、合成反应能耗高等诸多问题^[3]。在当前“双碳”目标的背景下,开发负碳或者低碳排放的丁二酸生产工艺显得尤为重要。通过微生物发酵从可再生的资源中生产化学品是一种可持续且有前途的方案,不仅可以从可再生碳源实现丁二酸的生产,同时可以固定二氧化碳,减少碳排放。

以模式微生物作为底盘构建丁二酸高产菌株,如谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[4-5]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[6-7]、

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[8-9]及解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)^[9-10]等,显著增加了丁二酸的生产效率。同时自然界存在天然高产丁二酸的微生物,如产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)^[11-12]和产琥珀酸曼氏杆菌(*Mannheimia succinicproducing*)^[13-14]等,这些微生物具有产量高、发酵时间短和耐高渗等优势,因此具有较高的工业生产潜力。其中,*A. succinogenes*是一种从牛的瘤胃中分离得到的革兰氏阴性菌,能够利用多种碳源合成丁二酸^[15],并且可同时利用五碳糖和六碳糖,具有底物广谱性、丁二酸产量高等优势。*A. succinogenes*是一种兼性厌氧菌,有氧条件下也可以稳定生长,在含有CO₂的厌氧条件下发酵能够高效合成丁二酸,是最有前景的丁二酸生产菌株之一。Xi等^[11]在培养基中添加血红素后进行发酵,添加50 g/L葡萄糖生产了37.9 g/L丁二酸,生产率达到了0.75 g/(L·h)。Gonzales等^[16]采用2⁵⁻¹部分因子设计(fractional factorial design, FFD)和中心复合旋转设计(central composite rotatable design, CCRD)对丁二酸发酵工艺参数进行优化,显著提高了丁二酸产量。尽管目前丁二酸的发酵生产取得了显著成效^[2,15,17],但生产成本依然较高,无法满足市场对丁二酸日益增长的需求。因此,继续提高*A. succinogenes*的丁二酸产量、降低生产成本是当前亟待解决的问题。

然而,目前缺少对*A. succinogenes*代谢机制的理解,同时也缺少基因编辑工具,限制了对其进行代谢工程改造。在此背景下,定向进化是快速提高*A. succinogenes*的丁二酸产量的最有效的方法。高通量筛选方法是微生物定向进化的关键技术。浓硫酸促使丁二酸会形成丁二酸酐,同时加入间苯二酚缩合丁二酸酐,可生成绿色的丁二酰荧光素,因此发酵液中丁二酸含量与荧光圈大小成正比。基于这一原理,王乐等^[18]通过对比荧光显色状况和光圈大小建立了丁二酸高产菌株的高通量筛选方法。然而,这种筛选方法流程复杂且操作过程偏差大,限

制了检测通量和精度。此外,Sun等^[19]开发了一种基于微孔板的双酶偶联检测方法,使用富马酸还原酶(fumarate reductase)和过氧化物酶(peroxidase)进行高通量筛选。但微孔板制作成本高、操作复杂,不适合进行大规模的高通量筛选。针对这一问题,本研究建立了一个高效、简便的高通量筛选方法,从而实现从大规模的突变文库中快速筛选丁二酸高产菌株。结合常压室温等离子体(atmospheric room-temperature plasma mutagenesis, ARTP)诱变的方法,定向进化了野生型*A. succinogenes*,实现了丁二酸产量的显著提升。基因组重测序和转录组分析发现,硫代谢途径表达水平提高可能是突变体丁二酸产量提高的主要机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器

葡萄糖、氯化钠、胰蛋白胨、酵母浸出物、磷酸氢二钾、大豆蛋白胨、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、六水合氯化镁、二水合氯化钙、无水乙酸钠、碳酸镁、玉米浆等均购自国药集团化学试剂有限公司。ARTP诱变育种仪(无锡源清天木生物科技有限公司),pH计(Mettler-Toledo公司),功能酶标仪(BioTek Instruments, Inc.公司),紫外可见光分光光度计[翱艺仪器(上海)有限公司],超低温-80℃冰箱(Revco公司),恒温培养箱(上海医疗器械研究所有限公司),高效液相色谱HPLC仪(Agilent公司)。

1.1.2 菌株和培养基

菌株:产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)为本实验室保藏菌株,用于丁二酸的生产。利用TSB培养基制备*A. succinogenes*的种子液,利用复合发酵培养基进行丁二酸发酵。

TSB培养基:胰蛋白胨17 g/L,大豆蛋白胨3 g/L,葡萄糖2.5 g/L,氯化钠5 g/L,磷酸氢二钾2.5 g/L,115℃灭菌30 min;TSB固体培养基是在上述基础上加入终浓度为2%的琼

脂, TSBG 为 2×TSB, 灭菌后加入终浓度达到 50 g/L 的葡萄糖, 并用水补足。

复合发酵培养基: 玉米浆 10 g/L, 酵母浸出物 10 g/L, 磷酸二氢钠 1.01 g/L, 磷酸氢二钠 0.31 g/L, 氯化钠 1.0 g/L, 六水合氯化镁 0.2 g/L, 二水合氯化钙 0.2 g/L, 乙酸钠 1.5 g/L, 碳酸镁 100 g/L, 葡萄糖 100 g/L, 微量元素溶液 100 μL/L。其中微量元素溶液包含生物素 200 mg/L, 叶酸 200 mg/L, 硫胺素 500 mg/L, 核黄素 500 mg/L, 烟酸 500 mg/L, 泛酸 500 mg/L, 对氨基苯甲酸 500 mg/L, 硫辛酸 500 mg/L, VB₁₂ 10 mg/L, VB₆ 1 mg/L, 过水系滤膜除菌。

1.2 培养方法

1.2.1 菌株培养

将保藏在甘油管的 *A. succinogenes* 接种至含有 3 mL TSB 培养基的 5 mL EP 管中, 37 °C 培养 36–48 h 活化, 制备一级种子液。将一级种子液按 2% 的接种量转接至含有 100 mL TSB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、250 r/min 培养 12–16 h 获得二级种子液。

1.2.2 发酵培养

A. succinogenes 在含有 100 mL 复合发酵培养基的 250 mL 血清瓶中进行厌氧发酵。首先, 向每个血清瓶中添加 MgCO₃ 及 2×的复合培养基, 灭菌后再加入葡萄糖母液, 并以无菌水补足 100 mL。按 10% 的接种量将二级种子液接种至复合培养基中, 37 °C、250 r/min 厌氧培养 72 h。

1.2.3 ARTP 诱变方法

取生长至对数期的菌液用生理盐水洗涤 2 次, 随后利用生理盐水重悬菌体使其 OD₆₀₀ 在 0.6–0.8 之间。无菌环境下取 10 μL 菌悬液均匀涂布于金属载片上, 进行 ARTP 诱变。诱变工作参数设置为: 100 W 功率、纯氮流量为 10 NL/min、照射距离 2 mm^[20]。然后以 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 s 的不同时间间隔进行 ARTP 诱变, 0 s 为对照。诱变结束后, 载片放入含 490 μL TSB 液体培养基的 EP 管中振荡 10 min, 确保载片上的菌体

可以完全洗脱至培养基中。将获得的洗脱液进行多个梯度稀释, 分别涂布于 TSBG 固体培养基上。37 °C 条件下培养 2–3 d, 各梯度设 3 组平行。ARTP 致死率(%)=[(未诱变处理的菌落数–诱变处理后的菌落数)/未诱变处理的菌落数]×100%。

1.2.4 定向进化实验方法

定向进化是一种人工模拟并干预自然进化进程的技术, 通过人为引入突变并施加选择压力, 快速筛选出具有特定功能或优良特性的生物个体^[21]。本研究首先采用随机突变(ARTP 诱变)方法构建突变体文库。随后, 从文库中挑选大量生长旺盛的单菌落, 将其接种至 96 孔板中培养 12 h。培养后的种子液被接入装有 2 mL 发酵培养基的 48 孔板中, 进行厌氧发酵。发酵完成后, 利用溴百里酚蓝对孔板发酵样品进行高通量筛选。初筛获得的较优样品进一步通过摇瓶发酵进行复筛, 最终利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)对摇瓶发酵产物进行定量分析, 以确定最优筛选菌株。

1.3 分析检测方法

1.3.1 菌体浓度测定

将发酵液先用 HCl 适当稀释以去除碳酸镁影响, 再用水稀释到合适量程, 用紫外可见分光光度计、酶标仪测定 OD₆₀₀ 数值, 读数并记录。

1.3.2 发酵液中有机酸产量测定

对发酵液进行离心处理, 取 500 μL 上清液并用 10 mmol/L 稀硫酸稀释后, 用 0.2 μm 水系滤膜过滤。滤液经过高效液相色谱(HPLC)法进行有机酸产量的测定。高效液相色谱(Agilent 公司)配备了 HPX-87H 色谱柱(Bio-Rad 公司), 检测器为示差检测器及紫外检测器(210 nm), 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸, 流速为 0.6 mL/min, 测定温度为 50 °C, 进样量为 10 μL。

1.3.3 基因组重测序

A. succinogenes 诱变菌株 A4-K74 在 37 °C、150 r/min 培养 10 h 后提取基因组 DNA 用于微

生物基因组重测序。测序工作由苏州金唯智生物科技有限公司完成,选择质检合格的基因组 DNA 制备用于 Illumina™ 二代测序平台的 DNA 文库。测序完成后将初始数据进行质量评估后过滤得到高质量的数据,与参考基因组 *A. succinogenes* 130Z (GenBank 登录号: GCA_000017245.1) 进行比对。使用 Fastp (v0.23.0) 去除了接头序列、PCR 引物、N 碱基数量大于 14 和 Q20 低于 40% 的序列。使用 Sentieon (V202112.02) 将过滤后的数据比对到参考基因组,去除重复序列并进行单核苷酸变异以及插入/缺失 (single nucleotide variant, insertion/deletion, SNV/InDel) 检测,通过 Annovar (v21, 2018 年 4 月) 软件对检测到的 SNV/InDel 进行功能注释。

1.3.4 转录组分析

A. succinogenes 野生型 AS-1 和诱变菌株 A4-K74 在 37 °C、150 r/min 条件下培养 10 h 后提取 RNA 用于原核转录组(有参)测序。测序工作由苏州金唯智生物科技有限公司完成。选择质检合格的 RNA 进行文库构建,随后用于 Illumina HiSeq 平台进行转录组测序。测序完成后首先将原始数据进行质量评估,并利用软件 Cutadapt (v1.9.1) 进行过滤,去除污染、接头序列及低质量序列等,利用 Samtools (v0.1.19) 软件获取 SNV/InDel 结果,用 Annovar (v21, 2018 年 4 月) 软件分别进行注释。基因表达计算使用 Htseq 软件(v0.6.1) 通过每千碱基转录本每百万比对读数的片段数方法 (fragments per kilobase per million reads, FPKM)^[22] 计算基因的表达量,并使用 EdgeR (v3.28.1) 软件分析实验组与对照组的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。假发现率 (false discovery rate, FDR) 和校正后的 *P* 值 (adjusted *P*-value, P_{adj}) 表示相同含义,*Q* 值 (*Q*-value) 则是基于 *P* 值更严格的 FDR 估计方法。DEGs 的筛选条件为差异基因表达变化 2 倍以上且 *Q*-value (FDR, P_{adj}) ≤ 0.05。为进一步了解差异表达基因的功能,进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.3.5 实时定量逆转录 PCR

将 AS-1、A4-K74 活化后转接培养 10 h,使用江苏康为世纪生物科技股份有限公司的 RNAPure Bacteria Kit、HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit 进行 mRNA 提取、去除基因组 DNA 及反转录合成 cDNA 的操作。将实验组和对照组的 cDNA 均稀释成 50 ng/μL 左右,选择 *16S rDNA* 作为内参基因,使用 UltraSYBR Mixture 对不同样品的多个基因进行实时定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 测定,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量。所用引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成 (表 1)。

2 结果与分析

2.1 建立丁二酸高产菌株的高通量筛选方法

发酵过程中会产生大量丁二酸使发酵液的 pH 降低,因此有望通过 pH 指示的方法建立高产丁二酸菌株的高通量筛选方法。pH 指示剂在不同 pH 条件下具有显色差异和光谱学与吸光度差异,因此建立通过 pH 指示剂进行高通量筛选的方法是可行的。为了筛选合适的 pH 指示剂,选择用复合发酵培养基配制含有不同丁二酸浓度的溶液 (20、30、40、50、60、70、80、90 g/L),模拟发酵结束后发酵液的 pH 情况。经过 10 倍稀释后,分别测定溶液的 pH 值 (图 1A)。发现随着丁二酸浓度的升高,发酵液 pH 值逐渐降低,0–90 g/L 的丁二酸稀释 10 倍后的 pH 值范围为 8.47–5.62。随着丁二酸浓度的升高,单位丁二酸浓度所引起的 pH 值变化逐渐变小。因此,选择 pH 显色范围接近且颜色变化灵敏的 pH 指示剂至关重要。指示剂溴百里酚蓝的 pH 指示范围为 6.0–7.6,当 pH 逐渐从 7.6 降低到 6.0 时颜色会从蓝色经绿色变为黄

表 1 差异表达基因及 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Differentially expressed genes and RT-qPCR primer sequences

| Locus tag | Gene name | Prime sequence (5'→3') | Product size (bp) |
|--------------|---------------------|---|-------------------|
| ASUC_RS08750 | <i>cysG</i> | F: CGCACTTTTGGAGCTGGGAC R: CCGGAATACCCGTTTCGTTCA | 124 |
| ASUC_RS08755 | <i>ASUC_RS08755</i> | F: AACGACAGGTTACGGGTTT R: ACCAGCTCAAAGTCGTCTCG | 178 |
| ASUC_RS08760 | <i>cysT</i> | F: TTATCAGCGGTGCCGGTATG R: TAATGCTACGACCGATGCC | 161 |
| ASUC_RS08765 | <i>cysW</i> | F: CGCTTGCTGCCATTTGGTTA R: CACGGGCGAAATGGAAAAGG | 161 |
| ASUC_RS09545 | <i>ASUC_RS09545</i> | F: GCGGCGAATTTATCATCCG R: CGTTCGTTGCCGTTGTGTAG | 152 |
| ASUC_RS10895 | <i>cysK</i> | F: AACACTTCGGTCAAACGGC R: CTGGTGGCGTCAACGATTC | 151 |
| ASUC_RS08745 | <i>ASUC_RS08745</i> | F: GGAATTGGCTTCCGCGAAC R: CTGTTTGACGGGTTTGGTGC | 181 |
| ASUC_RS03370 | <i>ASUC_RS03370</i> | F: ATACTGTCGAAACCGCTCCG R: ATTTGCACCACTTCGCGTTC | 187 |
| ASUC_RS08735 | <i>ASUC_RS08735</i> | F: AGCAAGTCACCGTTCGCTTA R: CGGTTTGCGTGCCTTGTTA | 174 |
| ASUC_RS08740 | <i>cysD</i> | F: CGTGACGAAGAAAAGCCCCG R: TGTCGAGTTCCGTCCAGTTG | 172 |
| – | <i>16S rDNA</i> | F: ACTGGAAGTACGACACGGT R: GCTTCTTCTGTGGCTAACGTC | 187 |

色,其显色反应速度也很快,能在短时间内(通常在几分钟内)完成颜色变化,使其很适合高通量筛选。溴百里酚蓝的 pH 指示范围与丁二酸梯度溶液的 pH 范围有较高重合度,且颜色变化显著、易于区分,因此选取其作为丁二酸高产菌株高通量筛选的候选指示剂。

在高通量筛选过程中,加入检测体系的指示剂量可能对检测效果有显著的影响。为了探索最佳的指示剂添加量,在 96 微孔板中加入不同浓度的丁二酸溶液,随后分别加入不同体积的溴百里酚蓝(体积比分别为:1/400、1/300、1/250、1/200、1/100、1/50、1/25)进行测试,微孔板中的溶液总体积设定为 200 μL 。结果表明,体积比为 1/100,即加入 2 μL 溴百里酚蓝的指示剂能够更显著地区分不同浓度丁二酸(图 1B)。利用体积比为 1/100 的溴百里酚蓝检测丁二酸溶液的颜色,结果与 pH 缓冲液的颜色变化一致,首先

由碱性环境中的蓝色过渡变化为弱酸性环境中的绿色,最后在酸性环境中变化为黄色。同时,在实验过程中,溴百里酚蓝在丁二酸溶液的配制范围内展现出良好的颜色稳定性,且测试板在 15 min 内颜色不会发生明显变化。这种良好的颜色稳定性为高通量筛选提供了可靠的基础。

基于颜色变化的高通量筛选只能定性筛选,不能精准定量体现丁二酸产量。因此,探索溴百里酚蓝在最大吸收条件下的吸光度变化,并以吸光度变化定量指示丁二酸产量变化具有重要意义。对溴百里酚蓝测试液进行了全波长扫描,结果表明溴百里酚蓝溶液波长特征峰不一,其中有明显特征峰的为 2、3、4、5 g/L 丁二酸溶液,特征峰均集中在 615 nm。在 615 nm 波长下以溴百里酚蓝检测的 6、7、8 g/L 丁二酸溶液无明显吸收峰,猜测可能是因为在此条件下指示剂颜色呈现为黄色,而黄色与高 pH 条

件下的蓝色和绿色最大吸收波长不一致,因此在 615 nm 下无明显的特征峰(图 1C)。

随后将利用复合发酵培养基配制的丁二酸溶液稀释后分别加入 2 μ L (体积比 1/100)溴百里酚蓝测定吸光值,配制 pH 为 5.0–8.0 的缓冲液作颜色对照(图 1D),并立即用 HPLC 测定溶液中丁二酸含量。对比 HPLC 检测结果和溴百里酚蓝吸光度计算值,结果表明(图 1E),溴百里酚蓝溶液在 615 nm 处的吸光度与溶液中丁二酸浓度呈线性关系,线性关系方程为 $y = -0.05686x + 0.47396$, R^2 达到 0.9437。其中 y 值

为溶液检测吸光度, x 值为溶液中丁二酸的浓度,该方法在丁二酸浓度为 2–8 g/L 范围内表现出良好的线性关系,使用时应对溶液进行适当的稀释。总之,基于溴百里酚蓝对不同丁二酸浓度的颜色变化初筛和 615 nm 下吸光度定量检测,将有助于高效筛选出高产丁二酸菌株。

2.2 ARTP 诱变 *A. succinogenes* 的条件优化

将野生型的 *A. succinogenes* 以 2% 的接种量接种于 TSB 培养基,并分别于高转速(250 r/min)和低转速(150 r/min)条件下进行 37 $^{\circ}$ C 恒温培

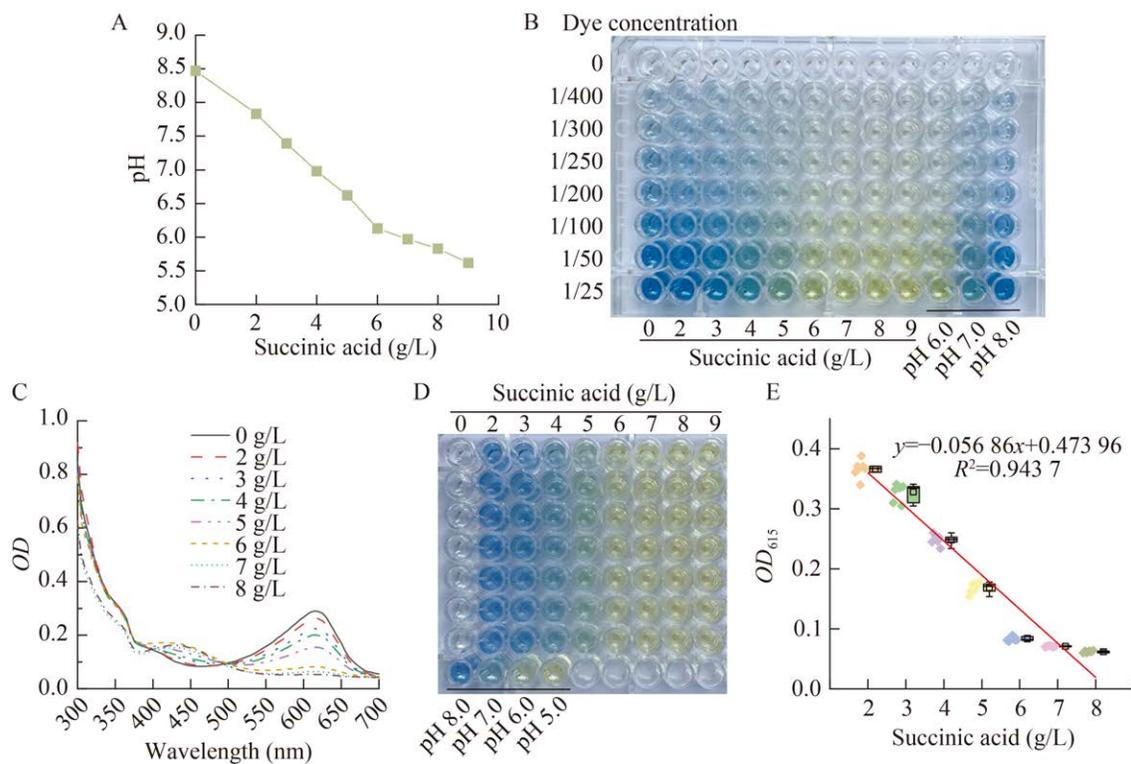


图 1 溶液 pH 值及溴百里酚蓝在不同丁二酸浓度条件下的颜色和吸光度变化 A: 以发酵培养基配制的不同浓度丁二酸溶液的 pH 测定值; B: 不同体积的溴百里酚蓝在梯度浓度丁二酸溶液中的颜色变化; C: 溴百里酚蓝指示剂在不同浓度丁二酸溶液中的全波长扫描; D: 溴百里酚蓝指示剂在不同浓度丁二酸溶液中的颜色变化; E: 溴百里酚蓝在不同浓度丁二酸溶液中吸光度与丁二酸含量的线性拟合方程。

Figure 1 Changes in solution pH and color and absorbance changes of bromothymol blue at different succinic acid concentrations. A: pH measurements of different concentrations of succinic acid solutions prepared in fermentation medium; B: Color changes of different volumes of bromothymol blue in solutions of graded concentrations of succinic acid; C: Full wavelength scanning of bromothymol blue indicator in succinic acid solutions of different concentrations; D: Color change of bromothymol blue indicator in different succinic acid solutions; E: Linear fitting equation for the absorbance of bromothymol blue in succinic acid solutions at different concentrations versus succinic acid content.

养。每隔 2 h 取样测定 OD_{600} 变化, 绘制野生型菌株的生长曲线(图 2A)。发现低转速时菌株生长显著优于高转速培养。此外, 菌株在培养 4 h 时由对数生长前期进入对数生长中期, 在培养 6 h 时菌株生长最快。当菌株处于对数期时基因组 DNA 会进行大规模的快速复制, 在该阶段进行诱变将会有更高的概率在基因组上引入突变。因此, 选择培养 6–7 h 后的野生型 *A. succinogenes* 作为种子进行 ARTP 诱变。

在 ARTP 诱变时间方面, 长时间诱变将会杀死绝大多数菌株导致存活菌株较少, 而诱变时间太短则会导致大量未突变菌株存活, 导致筛选工作量巨大。因此优化诱变时间对于后期 *A. succinogenes* 的定向进化至关重要, 研究建议细菌的致死率曲线范围在 15–120 s 之间^[20]。选择梯度 ARTP 诱变时间(10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 s)对野生型菌株进行诱变, 并绘制野生型 *A. succinogenes* 的致死率曲线。结果表明, 仅经过 10 s 的诱变即可杀死超过 70% 的菌株。超过 20 s 诱变时间后致死率超过 80%, 并随着诱变时间的延长缓慢上升, 诱变 50 s 后致死率达到 93% (图 2B)。考虑获得的单菌落数量不宜太多或太少, ARTP 诱变的致死

率在 90% 左右时, 将更易获得优势突变菌株且存活单菌落数量适中^[23]。因此, 选择对野生菌采用 50 s 的 ARTP 诱变时间。

2.3 定向进化选育高产丁二酸的 *A. succinogenes*

以高通量筛选方法为基础, 即可对经过 ARTP 诱变后的突变文库进行快速精准筛选(图 3A)。首先对菌株进行 ARTP 诱变处理后, 将菌液适量稀释后涂布于 TSBG 平板, 厌氧培养 2–3 d 后挑取 384 个单菌落进行多孔板培养和发酵。通过本研究所建立的溴百里酚蓝高通量筛选方法, 在 48 深孔板中对丁二酸含量进行检测, 并通过颜色变化初步判断高产菌株。随后, 对发酵液进行菌浓 OD_{600} 的测定以确定发酵菌株的生长状况, 并对发酵液上清进行 OD_{615} 吸光度的测定(结果已上传至国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0002084)。选择菌体生长状况旺盛的菌株, 并通过拟合线性方程计算丁二酸产量。指示剂吸光度值越低表明溶液中丁二酸含量越高, 其中突变体 A1-K180 吸光度最低为 0.209 5, 通过线性方程预测丁二酸浓度为 46.5 g/L。随后, 对孔板发酵筛选得到的前 50 个突变体的发酵液上清进行

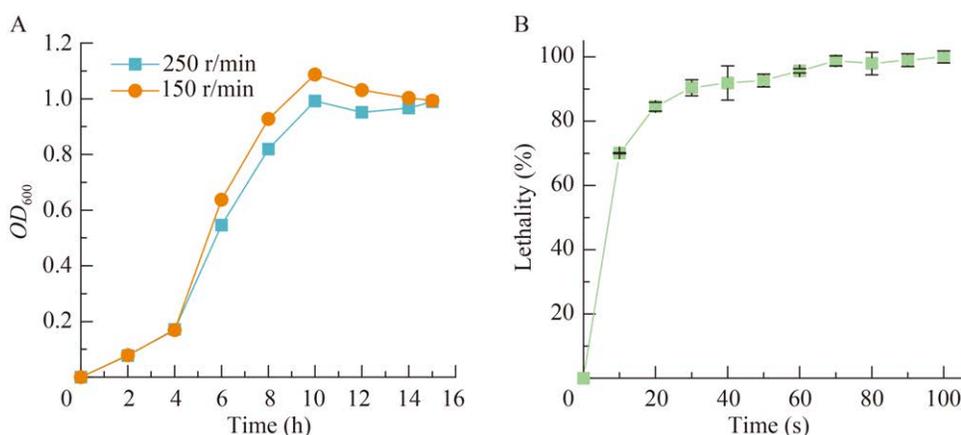


图 2 野生型 *A. succinogenes* 的 ARTP 诱变条件优化 A: 野生菌的生长曲线; B: ARTP 诱变致死率曲线。

Figure 2 Optimization of ARTP mutagenesis conditions in wild type *A. succinogenes*. A: Growth curves of wild type; B: ARTP mutagenic lethality curve.

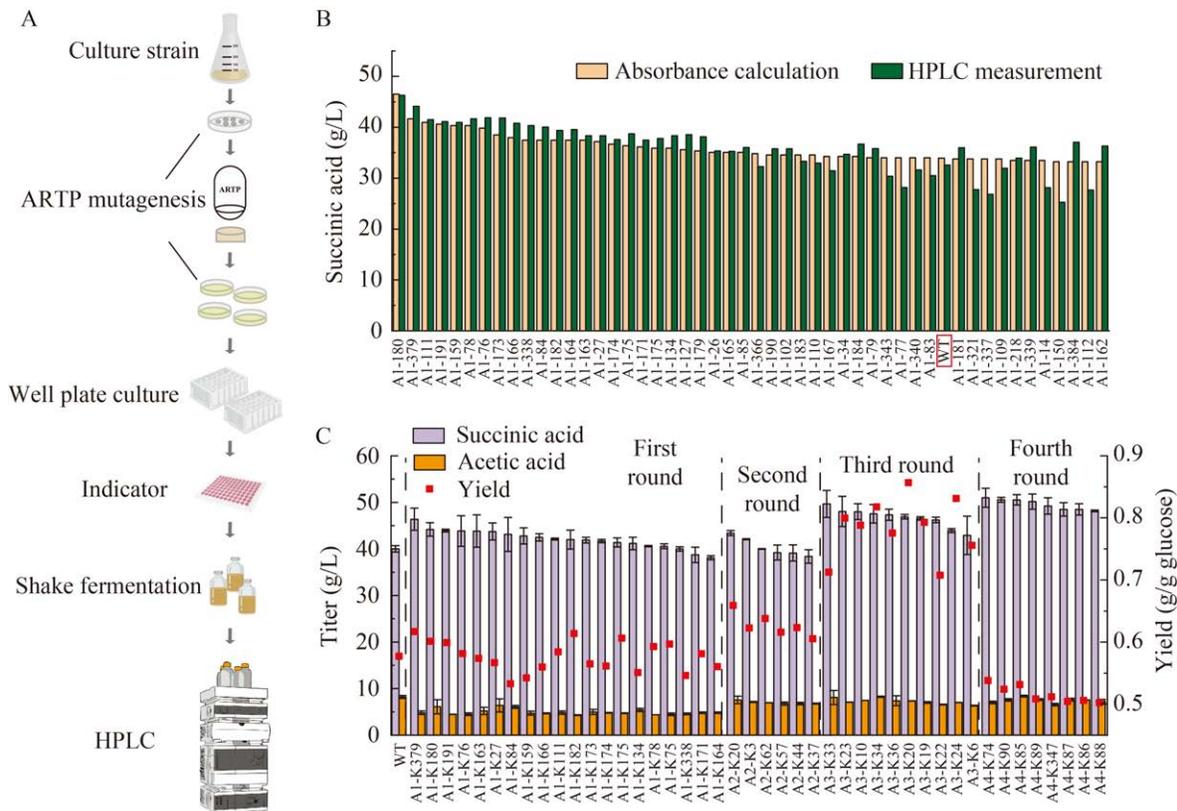


图3 定向进化及高产丁二酸菌株的性能表征 A: 基于 ARTP 诱变的定向进化流程图; B: HPLC 和 pH 指示剂检测第 1 轮定向进化高产菌株的丁二酸产量; C: 多轮定向进化筛选获得的高产菌株的丁二酸和乙酸摇瓶产量变化。

Figure 3 Directed evolution and performance characterization of high succinic acid producing strains. A: Flowchart of directed evolution based on ARTP mutagenesis; B: HPLC and pH indicator detection of succinic acid titers of high yielding strains from the first round of directed evolution; C: Changes in succinic acid and acetic acid shake flask titers of high yielding strains obtained from multiple rounds of directed evolution screening.

HPLC 分析,测定丁二酸产量(图 3B)。发现 A1-K180 菌株的发酵液中丁二酸 HPLC 测定产量为 46.3 g/L,与线性方程预测所得的产量无显著差异,表明溴百里酚蓝高通量筛选可靠性较高。从其中选择 20 株最高产菌株进行摇瓶复筛(图 3C),根据 HPLC 检测筛选获得最高产菌株 A1-K379,其发酵 48 h 达到最高菌浓($OD_{600}=7.3$) (国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084),72 h 厌氧发酵后积累丁二酸 46.4 g/L 和乙酸 4.8 g/L。未经诱变处理的野生菌株在 24 h 时 OD_{600} 达到最高,为 3.5,72 h 厌氧发酵后丁二酸浓度为 40.0 g/L,乙酸浓度为 8.2 g/L。

随后,基于 A1-K379 进行了定向进化。在第 2 轮定向进化中,选择了 576 个单菌落进行发酵和筛选(国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084)。选择产量最高的 6 株菌进行摇瓶复筛,得到最高产菌株 A2-K20,其丁二酸产量最高达到 43.4 g/L,乙酸产量为 7.6 g/L (图 3C)。发现 A2-K20 的产量比第 1 轮诱变最佳菌株 A1-K379 低,但在 72 h 时 OD_{600} 值达到最大,为 9.0 (国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084)。这可能是由于随着定向进化的诱变次数增加,菌体对等离子体射流产生了越来越强的耐受性,导致诱变提高产量的

效果下降。因此,分析 A2-K20 在 ARTP 诱变中的致死曲线,发现其经过 120 s 的处理时间才能达到 90% 的致死率(国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084)。因此,以 A2-K20 为基础,使用 120 s 的处理时间继续进行第 3 轮诱变。诱变和高通量筛选后,从 576 个单菌落中选择了 10 株生长旺盛且高产的菌株进行摇瓶复筛(国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084),发现最优菌 A3-K33 在摇瓶中丁二酸产量最高,为 49.7 g/L,产率为 0.71 g/g 葡萄糖。其在 72 h 生长最旺盛, OD_{600} 达到 9.3 (国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084),产量、产率与野生型菌株相比分别提高了 24.3% 和 22.4%。此外,突变体 A3-K20 的丁二酸产量为 46.9 g/L,产率为 0.86 g/g 葡萄糖,产率比出发菌株提高了 48.3%。在此基础上,以突变体 A3-K33 为基础继续进行第 4 轮定向进化(国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084)。在 480 株突变菌中选择了 8 株菌进行摇瓶复筛,8 株菌都具有良好的生长状况且预测产量较高(国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084)。其中最优秀菌 A4-K74 丁二酸产量达到 51.0 g/L,与出发菌株相比提高了 27.5%,产率为 0.54 g/g 葡萄糖,发酵 24 h 快速生长至 OD_{600} 为 9.1,具有良好的生长能力。虽然 A4-K74 的产率未获得显著提升,但其丁二酸产量最高,展现出较大的工业应用潜力。未来可以通过代谢改造、发酵条件优化及耐受性增强等策略,进一步优化菌株性能,从而使其在丁二酸生产中更具竞争力。

总之,经过多轮定向进化,从 2 016 株突变体中共选择了 44 株进行摇瓶发酵。这些突变体表现出不同的丁二酸生产力,且生长状况都优于出发菌株,获得了 17 株丁二酸摇瓶产量较原菌株提高 15.0% 以上的突变体。并选择最优菌 A4-K74 进行发酵稳定性实验、重测序及转录组分析等实验。

2.4 诱变高产菌株遗传稳定性测试

为了研究 A4-K74 菌株的高产是否由可遗传突变引起,同时也为防止诱变菌株在传代过程中出现不稳定的情况,对 A4-K74 进行遗传稳定性的测试。将 A4-K74 连续传代 5 次并进行厌氧发酵培养 72 h,测定每一代的生长情况和发酵产量情况(图 4)。结果表明,A4-K74 菌株在 0-5 代培养后,厌氧发酵 72 h 获得的丁二酸产量分别为 55.7、53.1、56.3、55.9、54.4、54.4 g/L,平均值为 55.0 g/L,无显著性差异。同时,传代过程中测得的最终 OD_{600} 依次为 7.2、7.0、7.1、6.3、7.4、7.7。说明 A4-K74 诱变菌株在传代过程中不仅具有较稳定的产量,还具有良好且稳定的生长状态,这足以证明其具有良好的遗传稳定性。其稳定的产量和生长状态进一步凸显了 A4-K74 菌株的巨大发展潜力,良好的遗传稳定性对于工业生产的连续性和可预测性至关重要。

2.5 高产丁二酸菌株 A4-K74 的基因组重测序及转录组分析

2.5.1 基因重测序结果

基因组重测序分析突变体 A4-K74 发现 5 个单核苷酸位点变异(SNV)和 4 个插入缺失突变(InDel)(表 2)。其中 2 个突变位点位于基因上/下游区域。其余 7 个突变位点均位于编码序列(coding sequence, CDS)区域,包括 2 个同义

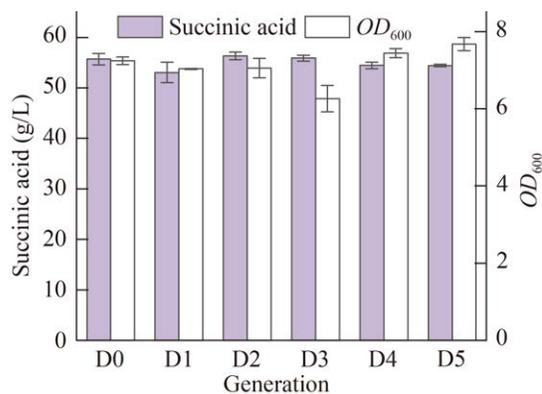


图 4 A4-K74 的遗传稳定性分析

Figure 4 Genetic stability profile of A4-K74.

突变(*ASUC_RS03800* 和 *ASUC_RS04615*)。引起蛋白质序列改变的突变分别涉及伸长因子 G (elongation factor G, EF-G, *ASUC_RS01455*)、N-乙酰葡萄糖胺激酶 (N-acetylglucosamine kinase, NAGK, *ASUC_RS07820*)、LexA 调控蛋白 (*ASUC_RS11105*)和磷酸转移酶系统组分 PtsH (*ASUC_RS05155*)等。这些基因突变会分别影响细胞中蛋白质的合成功率^[24-25]、调控 N-乙酰氨基葡萄糖代谢途径强化碳源和能量供给^[26]、调控基于 SOS 反应(SOS response)的 DNA 损伤修复增强菌株适应能力、调控糖进入细胞的速率等^[27]。最终可能通过多方面的细胞代谢控制,在增强细胞的生长和复制稳定性的同时,通过调控细胞能量代谢和糖运输等关键瓶颈增强丁二酸合成代谢通量。

2.5.2 转录组分析结果

为了进一步了解突变菌株 A4-K74 的丁二酸高产机制,选择出发菌株 AS-1 和 A4-K74 进行比较转录组测序分析,主要通过 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq)方法。测序质量分析发现碱基比 Q20 和 Q30 分别在 98%和 95%以上(国家微生物科学数据中心,登录号:NMDCX0002084),表明 RNA-seq 的质量较高,为后续分析提供了可靠的数据。A4-K74 与 AS-1 相比,在 Q -value (FDR, P_{adj}) <0.05 的条件下,有 13 个基因(10 个上调基因和 3 个下调基因)在 A4-K74 中表达差异达到 2 倍以上。上调的基因主要包括 ABC 转运蛋白、代谢途径的酶及其他种类酶的调控基因,下调基因则编码假设蛋白和 SlyX 家族蛋白(表 3)。

表 2 重测序突变位点变化

Table 2 Resequencing mutant site changes

| Gene | Locus | Protein product | Mutant amino acid |
|--|---------------------------|--|-------------------|
| <i>ASUC_RS01455</i> | <i>fusA</i> | Elongation factor G | V539G |
| <i>ASUC_RS03800</i> | – | Peptidylprolyl isomerase | L110L |
| <i>ASUC_RS04615</i> | <i>fabB</i> | Beta-ketoacyl-ACP synthase I | G304G |
| <i>ASUC_RS04730</i> | <i>rng</i> | Ribonuclease G | R392H |
| <i>ASUC_RS07820</i> | <i>nagK</i> | N-acetylglucosamine kinase | T298A |
| <i>ASUC_RS11105</i> | <i>ybfE</i> | LexA regulated protein | T64fs |
| <i>ASUC_RS05155</i> | <i>ptsH</i> | Phosphocarrier protein Hpr | 40_42del |
| <i>ASUC_RS05455</i> , <i>ASUC_RS05460</i> (dist=286) | –; <i>ompA</i> | FAD-binding and (Fe-S)-binding domain-containing protein; Porin OmpA | – |
| <i>ASUC_RS09280</i> (dist=652); <i>ASUC_RS09290</i> (dist=532) | <i>tolB</i> ; <i>tolR</i> | Tol-Pal system beta propeller repeat protein TolB; Colicin uptake protein TolR | – |

fs: Frameshift; del: Deletion; dist: Distance.

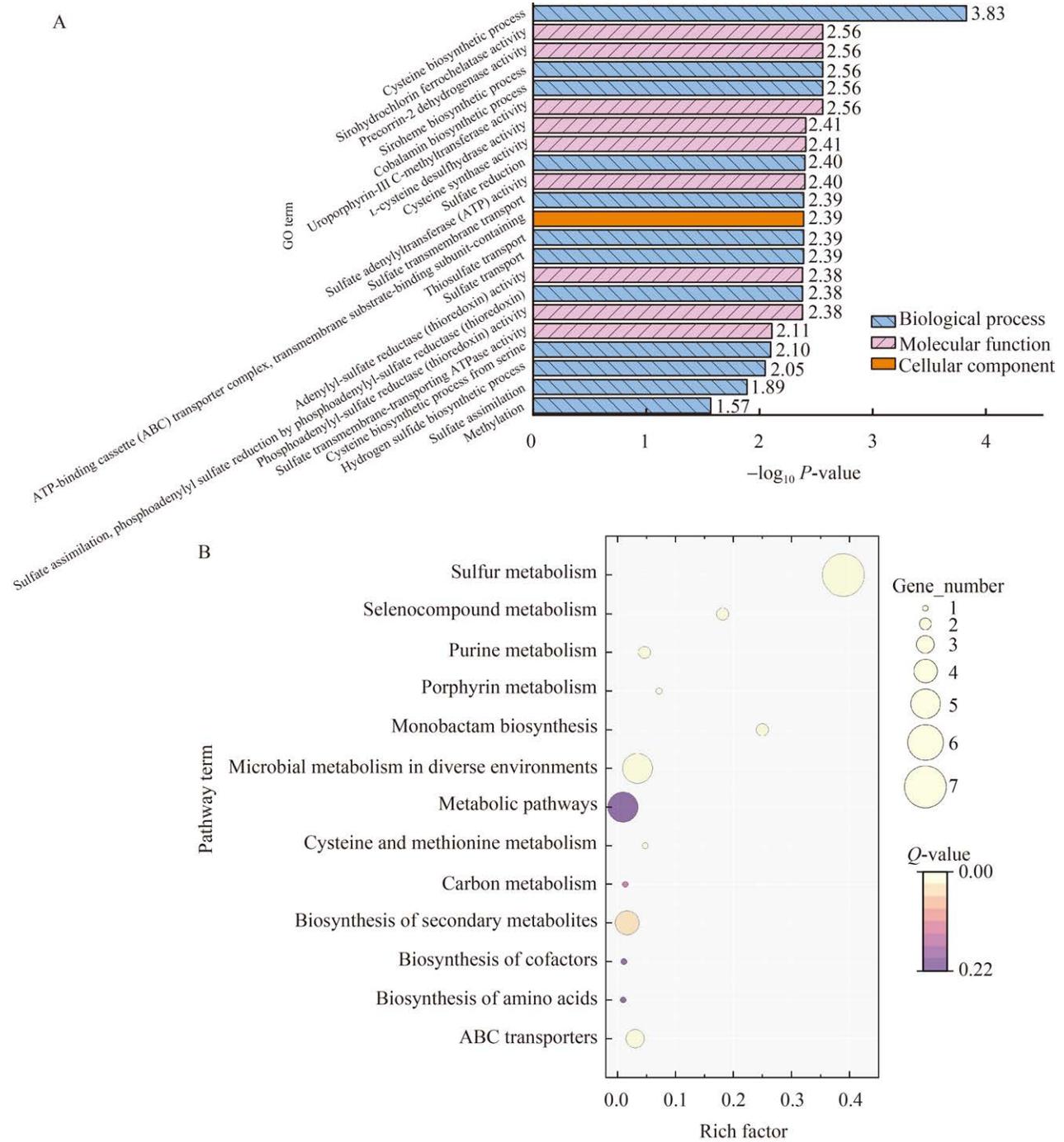
表 3 差异表达显著的上调及下调基因

Table 3 Significantly differentially expressed up- and down-regulated genes

| Old locus tag | Locus tag | Gene name | log ₂ FC | Product |
|---------------|--------------|---------------------|---------------------|---|
| Asuc_1691 | ASUC_RS08750 | <i>cysG</i> | 3.931 858 | Siroheme synthase CysG |
| Asuc_1692 | ASUC_RS08755 | <i>ASUC_RS08755</i> | 3.390 545 | Sulfate ABC transporter substrate-binding protein |
| Asuc_1693 | ASUC_RS08760 | <i>cysT</i> | 3.053 133 | Sulfate ABC transporter permease subunit CysT |
| Asuc_1694 | ASUC_RS08765 | <i>cysW</i> | 3.097 264 | Sulfate ABC transporter permease subunit CysW |
| Asuc_1843 | ASUC_RS09545 | <i>ASUC_RS09545</i> | 3.070 169 | Transferrin-binding protein-like solute binding protein |
| Asuc_2108 | ASUC_RS10895 | <i>cysK</i> | 2.882 444 | Cysteine synthase A |
| Asuc_1690 | ASUC_RS08745 | <i>ASUC_RS08745</i> | 2.848 876 | Phosphoadenylyl-sulfate reductase |
| Asuc_0651 | ASUC_RS03370 | <i>ASUC_RS03370</i> | 2.716 543 | Carboxymuconolactone decarboxylase family protein |
| Asuc_1688 | ASUC_RS08735 | <i>ASUC_RS08735</i> | 2.680 606 | GTP-binding protein |
| Asuc_1689 | ASUC_RS08740 | <i>cysD</i> | 2.655 200 | Sulfate adenylyltransferase subunit CysD |
| Asuc_0820 | ASUC_RS04245 | <i>ASUC_RS04245</i> | –3.034 370 | Hypothetical protein |
| Asuc_0423 | ASUC_RS11280 | <i>ASUC_RS11280</i> | –3.078 800 | Hypothetical protein |
| Asuc_0680 | ASUC_RS03515 | <i>ASUC_RS03515</i> | –2.693 860 | SlyX family protein |

随后结合 GO 和 KEGG 数据库的分析，以确定基因的功能和有关信息。GO 功能分析显示，分子功能(molecular function, MF)类别富集有 9 个亚类；细胞组分(cellular component, CC)只有 1 个功能亚类，有关于跨膜结合 ATP 的转

运功能；最后生物过程(biological process, BP)富集有 12 个功能亚类，主要集中在氨基酸合成、硫酸盐还原及转运、硫化氢合成过程(图 5A)。这表明诱变菌中有多种途径共同影响丁二酸合成的过程。



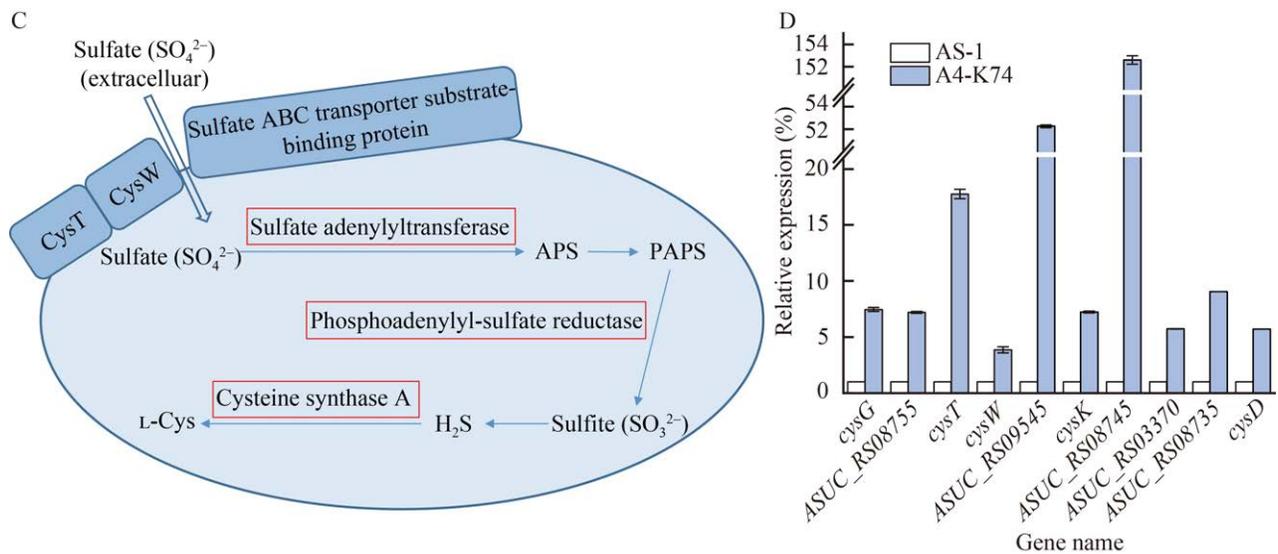


图5 转录组测序分析及 RT-qPCR 验证 A: 差异基因的 GO 富集 P -value 柱状图。B: 差异基因的 KEGG 富集散点图。C: 显著差异基因在硫代谢中的影响途径。CysT、CysW: 硫酸盐 ABC 转运系统渗透酶的 2 个亚基, 分别由 *cysT*、*cysW* 编码; APS: 5'-磷酸腺苷硫酸盐; PAPS: 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐。D: 显著差异基因的 RT-qPCR 表达水平。

Figure 5 Transcriptomic sequencing analysis and RT-qPCR validation. A: GO-enriched P -value histogram of differential genes. B: KEGG-enriched scatterplot of differential genes. C: Pathways of significant differential gene effects in sulfur metabolism. CysT, CysW: Two subunits of the sulfate ABC transport system permease, respectively encoded by *cysT*, *cysW*; APS: Adenosine 5'-phosphosulfate; PAPS: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. D: RT-qPCR expression levels of significantly different genes.

通过 KEGG 显著性富集以确定差异表达基因参与的最主要代谢途径, 发现了 13 个 KEGG 富集通路, 主要包含“硫代谢”“不同环境中的微生物代谢”“ABC 转运体”“半胱氨酸和蛋氨酸代谢”“碳代谢”“辅助因子的生物合成”“代谢途径”等(图 5B)。McKinlay 等^[28]研究发现, *A. succinogenes* 无法在不含半胱氨酸的培养基中正常生长, 这表明半胱氨酸是其必需的氨基酸, 无法通过自身合成来满足生长需求。进一步分析发现, *A. succinogenes* 缺乏编码同化硫酸盐还原途径中关键酶——腺苷硫酸激酶的基因, 因此无法自身同化硫酸盐, 但其基因组中存在丝氨酸乙酰转移酶和半胱氨酸合成酶(cysteine synthase, CysK)等有关酶, 允许其利用环境中的硫化氢(H_2S)、硫酸盐合成 L-半胱氨酸(L-Cys)^[29]。在本研究中, 发酵培养基的氮源为玉米浆和酵母浸出物, 玉米浆中含有丰富的硫

元素; 而酵母浸出物营养成分丰富, 亦残留有微量硫化物。A4-K74 诱变菌的显著差异基因及 KEGG 富集通路分析显示, 其硫代谢、半胱氨酸合成等有关途径高度活跃, 推测其高产丁二酸的潜在机制在于: 诱变使之加强细胞对环境中的硫酸盐等含硫物质的吸收与转化能力, 从而为菌体提供了更多的硫源。这不仅促进了半胱氨酸的合成, 满足了细胞生长和代谢对含硫氨基酸的需求, 还可能间接影响了细胞内的氧化还原平衡和代谢调控, 从而提高了菌体的生长性能及丁二酸的生产能力。

KEGG 富集的主要途径“硫代谢”包含了 7 个上调的主要差异基因: *ASUC_RS08755*、*cysT*、*cysW*、*cysK*、*ASUC_RS08745*、*ASUC_RS08735*、*cysD*, 它们对半胱氨酸的合成、硫酸盐及亚硫酸盐的转运及硫元素的代谢有重要作用, 差异基因在 A4-K74 中的对硫代谢的主要影响途径

(图 5C)。推测突变体 A4-K74 产量提高的主要原因在于基因突变增强了细胞的蛋白质合和糖转运速率,保障了菌株具有更好的生长状态。同时,突变后硫代谢显著增强,为菌株生长提供了必需的半胱氨酸,也为丁二酸合成提供了更多还原力和能量,最终显著提高了丁二酸产量。

2.6 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为了分析转录组测序结果的准确性,对转录组分析中具有显著差异的 10 个上调基因进行 RT-qPCR 验证(表 3)。将野生菌 AS-1 的基因表达量设定为 1,发现 RT-qPCR 分析结果与转录组测序结果具有相同的趋势(图 5D)。其中, *ASUC_RS08745* 基因相对表达量最高,是对照组的 152.6 倍;此外, *cysG*、*ASUC_RS08755*、*cysT*、*cysW*、*ASUC_RS09545*、*cysK*、*ASUC_RS03370*、*ASUC_RS08735*、*cysD* 的表达量分别是野生菌 AS-1 的 7.5、7.2、17.8、3.9、52.3、7.2、5.7、9.1、5.7 倍。表明转录组分析结果具有较高的可靠性。

3 讨论与结论

针对 *A. succinogenes* 产量低、缺少高通量筛选方法的问题,本研究建立了丁二酸的高通量筛选方法,结合 ARTP 诱变,定向进化了 *A. succinogenes* 并获得了最优突变体 A4-K74,其在摇瓶水平最高产量可达到 56.3 g/L。该菌株不仅在丁二酸产量上有所提升,还具有良好的遗传稳定性,表现出较高的发展潜力,为后续进一步改良菌株和优化发酵条件提供了坚实基础。后期,在扩大规模的发酵罐中进行补料分批发酵,进一步改善菌株的生长状况并提升丁二酸产量,同时应对其在更大规模发酵中的遗传稳定性和产酸能力进行验证。*A. succinogenes* 具有较高的底物耐受性,在高浓度的葡萄糖培养基中也可以正常生长,但是对于 pH 的耐受性较低,发酵过程中需要添加大量中和试剂以维持中性 pH。据报道, *A. succinogenes* 可以在 pH 最低为 5.8 的培养基条件下生长,但是丁二

酸的产能极低,优化后在 3 L 发酵罐中最高产量仅为 20.77 g/L^[30]。在实际工业发酵中若能有所耐酸型 *A. succinogenes* 进行丁二酸生产,减少中和剂的使用,将显著降低生产成本,因此未来可对其耐酸机制进行深入研究,通过定向进化或代谢工程提高菌株的耐酸性。本研究开发的高通量筛选方法,不仅可用于定向进化筛选高产丁二酸菌株。同时,也为后续在 A4-K74 的基础上,利用适应性实验室进化策略筛选耐酸突变体提供了方法。这种基于指示剂的高通量筛选方法原理简单、操作便捷,具有较高的通用性和可扩展性。对指示剂种类和检测条件等进行优化,提高其灵敏度和特异性,未来可尝试将其推广应用于其他酸类物质的生产菌株筛选,为其深入研究提供一定的参考和借鉴。

基于组学的分析可以深入揭示定向进化诱变菌株在丁二酸生产过程中的关键机制,通过对硫代谢的通路分析为后续理性代谢工程改造 *A. succinogenes* 提供了参考。在细菌中,ABC 转运系统可利用 ATP 进行底物的逆浓度梯度运输^[31]。硫酸盐 ABC 转运体底物结合蛋白(*ASUC_RS08755* 编码)和 2 个硫酸盐 ABC 转运系统渗透酶亚基(*cysT*、*cysW* 编码)负责转运微生物中的硫酸盐和结构类似的硫代硫酸盐^[32],使环境中的硫元素以主动运输的方式进入细胞,因此这 2 个基因的上调有助于 A4-K74 对硫酸盐的吸收。*ASUC_RS08735* 和 *cysD* 基因分别编码硫酸腺苷酸转移酶(sulfate adenylyltransferase)的大、小亚基,这是一种能够利用 ATP 将无机硫酸盐激活为 5'-磷酸腺苷硫酸盐(adenosine 5'-phosphosulfate, APS)的酶,是硫酸盐生化途径中的关键步骤,并且同时存在于同化和异化硫酸盐还原途径^[33]。随后 APS 在其他酶的作用下活化为 3'-磷酸腺苷 -5'-磷酸腺苷硫酸盐(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)。腺苷酸硫酸还原酶^[34](phosphoadenylyl-sulfate reductase, *ASUC_RS08745* 编码)在还原反应中催化 PAPS 转化为亚硫酸盐,其是由 AprB 和 AprA 这 2 个亚基构成的异

二聚体复合物,在 A4-K74 中的表达提高了细胞中硫元素的利用率。亚硫酸盐在亚硫酸盐还原酶的作用下进一步被还原为 H_2S 。表达水平显著提高的半胱氨酸合成酶 A (*cysK* 编码)可以催化 H_2S 与 O-乙酰丝氨酸反应生成半胱氨酸,这一过程在微生物中被称为 SAT 路径,保障了半胱氨酸的充足供应^[35]。以上几类基因是在 A4-K74 的硫代谢中产生影响的差异基因,推测其通过共同作用、互相影响提高了突变体的丁二酸产量。

然而,目前尚缺乏成熟的 *A. succinogenes* 基因编辑工具和调控元件,这限制了对其进行代谢工程改造提升产量的进一步探索。因此,未来以 A4-K74 为基础继续深入发展一系列合成生物学工具,如 CRISPR 编辑技术、代谢调控元件以及游离质粒表达系统,将是提升丁二酸生产能力的关键。通过这些工具,可以更精准地调控关键基因的表达、优化代谢通路,进而实现丁二酸产量的跨越式提升。

作者贡献声明

孙文清:方案设计、实验操作、数据管理、初稿写作;赵运英:数据管理、提供材料、稿件润色修改;周胜虎:方案设计、经费支持、稿件润色修改;邓禹:监督指导、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 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): 539-554.
- [2] WU J, WANG C, LIU FQ, SUN XY, LI YL, WU PF, ZHANG JN. Optimization of pretreatment and fermentation processes to enhance the production of succinic acid from corn straw by *Actinobacillus succinogenes*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 222: 119673.
- [3] LIU XT, ZHAO G, SUN SJ, FAN CL, FENG XJ, XIONG P. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 843887.
- [4] MAO YF, LI GY, CHANG ZS, TAO R, CUI ZZ, WANG ZW, TANG YJ, CHEN T, ZHAO XM. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinate from lignocellulosic hydrolysate[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 95.
- [5] LI K, LI C, ZHAO XQ, LIU CG, BAI FW. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinic acid from corn stover pretreated by concentrated-alkali under steam-assistant conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 378: 128991.
- [6] YANG HN, ZHOU SH. Rewiring the reductive TCA pathway and glyoxylate shunt of *Escherichia coli* for succinate production from corn stover hydrolysate using a two-phase fermentation strategy[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 412: 131364.
- [7] ZHANG WM, ZHANG T, SONG M, DAI ZX, ZHANG SJ, XIN FX, DONG WL, MA JF, JIANG M. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high yield production of succinic acid driven by methanol[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(12): 2803-2811.
- [8] ZAHOOR A, KÜTTNER FTF, BLANK LM, EBERT BE. Evaluation of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of succinic acid[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(10): 711-720.
- [9] LI C, ONG KL, CUI ZY, SANG ZY, LI XT, PATRIA RD, QI QS, FICKERS P, YAN JB, LIN CSK. Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123414.
- [10] BABAEI M, RUEKSOMTAWIN KILDEGAARD K, NIAEI A, HOSSEINI M, EBRAHIMI S, SUDARSAN S, ANGELIDAKI I, BORODINA I. Engineering oleaginous yeast as the host for fermentative succinic acid production from glucose[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 361.
- [11] XI YL, CHEN KQ, DAI WY, MA JF, ZHANG M, JIANG M, WEI P, OUYANG PK. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136: 775-779.
- [12] CHEN PC, ZHANG YD, YE XY, SUN YW, YIN L, ZHENG P. Immobilization of *Actinobacillus succinogenes* on nano- and micro-fiber membranes for efficient and robust production of succinic acid[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2023, 46(4): 611-620.
- [13] SONG H, LEE JW, CHOI S, YOU JK, HONG WH, LEE SY. Effects of dissolved CO_2 levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(6): 1296-1304.
- [14] LEE JW, YI J, KIM TY, CHOI S, AHN JH, SONG H, LEE MH, LEE SY. Homo-succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016,

- 38: 409-417.
- [15] 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.
- [16] GONZALES TA, de CARVALHO SILVELLO MA, DUARTE ER, SANTOS LO, ALEGRE RM, GOLDBECK R. Optimization of anaerobic fermentation of *Actinobacillus succinogenes* for increase the succinic acid production[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 27: 101718.
- [17] CARVALHO M, ROCA C, REIS MAM. Improving succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 491-497.
- [18] 王乐, 宇光海, 杨硕晔, 王为为, 惠明. 一株丁二酸高产菌株的筛选与选育[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(3): 127-134.
WANG L, YU GH, YANG SY, WANG WW, HUI M. Screening and breeding of a strain for high yield of succinic acid[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(3): 127-134 (in Chinese).
- [19] SUN L, ZHANG H, YUAN H, TU R, WANG Q, MA Y. A double-enzyme-coupled assay for high-throughput screening of succinic acid-producing strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(6): 1696-1701.
- [20] OTTENHEIM C, NAWRATH M, WU JC. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1): 12.
- [21] JAMES J, TOWERS S, FOERSTER J, STEEL H. Optimisation strategies for directed evolution without sequencing[J]. *PLoS Computational Biology*, 2024, 20(12): e1012695.
- [22] MARIONI JC, MASON CE, MANE SM, STEPHENS M, GILAD Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays[J]. *Genome Research*, 2008, 18(9): 1509-1517.
- [23] REN F, CHEN L, TONG QY. Highly improved acarbose production of *Actinomyces* through the combination of ARTP and penicillin susceptible mutant screening[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(1): 16.
- [24] LIN JZ, GAGNON MG, BULKLEY D, STEITZ TA. Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during tRNA translocation[J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 219-227.
- [25] SAVELSBERGH A, RODNINA MV, WINTERMEYER W. Distinct functions of elongation factor G in ribosome recycling and translocation[J]. *RNA*, 2009, 15(5): 772-780.
- [26] FLORES CL, ARIÑO J, GANCEDO C. The N-acetylglucosamine kinase from *Yarrowia lipolytica* is a moonlighting protein[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 13109.
- [27] RODIONOVA IA, ZHANG ZG, MEHLA J, GOODACRE N, BABU MH, EMILI A, UETZ P, SAIER MH. The phosphocarrier protein HPr of the bacterial phosphotransferase system globally regulates energy metabolism by directly interacting with multiple enzymes in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(34): 14250-14257.
- [28] MCKINLAY JB, GREGORY ZEIKUS J, VIEILLE C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6651-6656.
- [29] MCKINLAY JB, LAIVENIEKS M, SCHINDLER BD, MCKINLAY AA, SIDDARAMAPPA S, CHALLACOMBE JF, LOWRY SR, CLUM A, LAPIDUS AL, BURKHART KB, HARKINS V, VIEILLE C. A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus succinogenes* for industrial succinate production[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 680.
- [30] ZHANG WM, TAO YX, WU M, XIN FX, DONG WL, ZHOU J, GU JC, MA JF, JIANG M. Adaptive evolution improves acid tolerance and succinic acid production in *Actinobacillus succinogenes*[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 98: 76-82.
- [31] PATERAKI C, SKLIROS D, FLEMETAKIS E, KOUTINAS A. Succinic acid production from pulp and paper industry waste: a transcriptomic approach[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 325: 250-260.
- [32] 晏雄鹰, 王振, 王霞, 杨世辉. 微生物硫代谢与抗逆性[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(11): 150-167.
YAN XY, WANG Z, WANG X, YANG SH. Microbial sulfur metabolism and stress resistance[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(11): 150-167 (in Chinese).
- [33] FAUQUE GD, BARTON LL. Hemoproteins in dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2012, 60: 1-90.
- [34] WATANABE T, KOJIMA H, FUKUI M. Identity of major sulfur-cycle prokaryotes in freshwater lake ecosystems revealed by a comprehensive phylogenetic study of the dissimilatory adenylylsulfate reductase[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36262.
- [35] van der PLOEG JR, BARONE M, LEISINGER T. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *cysK* and *cysJ1* genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201(1): 29-35.