

产丁二酸工程菌的构建及其厌氧发酵

谢鑫, 陈可泉, 刘忠敏, 姜岷, 韦萍

南京工业大学制药与生命科学学院, 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 为了考察过量表达苹果酸酶对于 *E. coli* NZN111(*ldhA::Kan pfl::Cam*)厌氧发酵产丁二酸的影响, 将连接有苹果酸酶基因 *sfcA* 的表达载体 pTrc99a-*sfcA* 转化进 NZN111 中, 构建了重组 NZN111(pTrc99a-*sfcA*)。0.5 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后, 测定的苹果酸酶比酶活为 30.67 u/mg, 比受体菌提高了 140 倍。采用两阶段发酵模式, 结果表明: 过量表达的苹果酸酶在 NZN111 体内催化了从丙酮酸到苹果酸的逆向反应, 丁二酸是发酵过程中积累的主要有机酸, 且当加入 0.7 mmol/L IPTG 诱导, 初始葡萄糖浓度为 18.5 g/L 时, 选择对数生长期后期的菌种以 10% 的接种量转入厌氧发酵, 发酵结束时发酵液中丁二酸的浓度为 12.84 g/L, 对葡萄糖的收率为 69.43%, 乙酸为 0.58 g/L, 二者浓度比为 22:1, 没有检测到甲酸和乳酸。构建的菌种具有高产丁二酸和副产物极少的优点, 在同类菌种中处于先进水平。

关键词: 苹果酸酶, NZN111, 两阶段发酵, 逆向催化, 丁二酸

Construction and Anaerobic Fermentation of Metabolically Engineered *Escherichia coli* Producing Succinate

Xin Xie, Kequan Chen, Zhongmin Liu, Min Jiang, and Ping Wei

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: To study the effect of malic enzyme overexpression on succinate production in the *pfl ldh* double mutant *Escherichia coli* NZN111 (*ldhA::Kan pfl::Cam*), we transformed the expression vector pTrc99a-*sfcA* into it and constructed the recombinant NZN111(pTrc99a-*sfcA*). The specific malic enzyme activity of the recombinant was 30.67 u/mg after 8-hour inducement by 0.5 mmol/L Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, 140 times higher than that of NZN111. The two-step fermentation was used and the results showed that the overexpression of malic enzyme catalyzed the reverse reaction from pyruvate to malate, which was impossible under general conditions. Succinate accumulated as the major product. Cells at the late exponential phase were inoculated to an anaerobic fermentation with 0.7 mmol/L IPTG in medium containing 18.5 g/L glucose. The final concentration of succinate and acetate was 12.84 g/L and 0.58 g/L, respectively. Formate and lactate were not detected. The constructed metabolically engineered strain had the feature of higher succinate yield and less by-products.

Received: February 6, 2007; **Accepted:** April 4, 2007

Supported by: National Programs for High Technology Research and Development of China(No. 2006AA02Z235), National Natural Science Foundation of China(No. 20606017), Key Program of National Natural Science Foundation of China(No. 20336010) and Jiangsu Higher School Natural Science Research Project(No. 05KJB180043).

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83587330; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn.

国家高技术发展计划“863”(No. 2006AA02Z235), 国家自然科学基金资助(No. 20606017), 国家自然科学基金重点项目(No. 20336010), 江苏省高校自然科学研究计划(No. 05KJB180043)资助。

Keywords: malic enzyme, NZN111, two-step fermentation, reverse direction catalysis, succinate

丁二酸, 俗称琥珀酸, 作为一种常见的天然有机酸, 广泛存在于动植物和微生物中, 许多厌氧微生物生产丁二酸作为其能量代谢的主要末端产物。作为一种优秀的 C4 平台化合物, 丁二酸可被广泛用于药物、精细化工产品以及可生物降解的聚合物的前体。传统丁二酸化学合成法采用以不可再生的战略资源石油作为原料, 环境污染严重, 无法实现可持续发展。利用生物法转化可再生资源来生产丁二酸, 成本低, 污染小, 环境友好, 且在发酵过程中可吸收大量的 CO₂, 有效减轻温室效应, 近年来受到了各国科研人员的关注^[1]。生物法制备丁二酸的研究在国外已处于中试阶段^[2], 国内尚处于实验室阶段。*E. coli* 由于遗传背景清楚, 故近年来被广泛用作各种基因表达的宿主^[3-6], 用于丁二酸的生产, 但国内工程菌产丁二酸的研究报道不多。

过去本实验室从 *E. coli* DH5 α 中克隆了苹果酸酶基因 *sfcA*, 连接至质粒 pTrc99a 中, 构建了表达载体 pTrc99a-*sfcA*, 在 *E. coli* FMJ39 中获得了大量表达并考察了其对 FMJ39 厌氧混合酸发酵的影响^[7]。Stols 等人^[6] 测定的苹果酸酶对苹果酸的 K_m 值为 0.4 mmol/L, 对丙酮酸的 K_m 值为 16 mmol/L, 故正常生理条件下该酶催化动力学上有利的苹果酸转化为丙酮酸的正向反应, 但他们同时认为苹果酸酶在特定的菌种中有可能催化从丙酮酸到苹果酸的逆向反应, 原因是该反应方向在热力学上是有利的。

研究中选择双突变株 NZN111(*ldhA::Kan pfl::Cam*)^[8] 作为受体菌, 其厌氧条件下编码乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因和编码丙酮酸甲酸裂解酶的 *pfl* 基因分别被带有卡那霉素和氯霉素抗性基因的片段插入失活, 二者分别催化丙酮酸转化为乳酸以及丙酮酸转化为甲酸和乙酰辅酶 A 的反应(图 1), 因此厌氧条件下, 丙酮酸在体内积累无法代谢, 菌体生长出现缺陷。丙酮酸的大量积累使得苹果酸酶在体内有可能催化丙酮酸到苹果酸的逆向反应。图 1 是 *E. coli* 中厌氧混合酸发酵途径示意图, 可见丁二酸作为厌氧发酵末端产物之一, 是葡萄糖经糖酵解生成磷酸烯醇式丙酮酸, 再经草酰乙酸、苹果酸、富马酸最终生成丁二酸, 该反应方向与 TCA 循环方向相反。本研究通过在 NZN111 体内大量表达苹果酸酶, 重新恢复了其在厌氧条件下的生长能力, 观察到苹果酸酶在体内催化了从丙酮酸到苹果酸的逆向反应, 苹

果酸最终转化为丁二酸, 导致丁二酸成为厌氧混合酸发酵途径中积累的主要有机酸, 构建的产丁二酸的工程菌在同类菌种中处于先进水平。

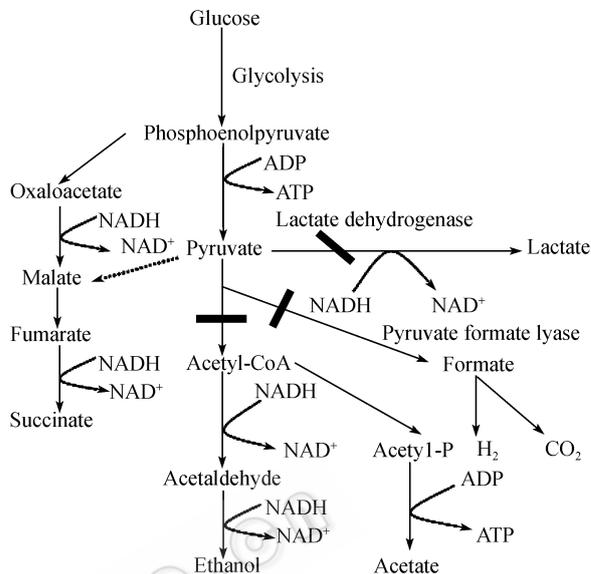


图 1 *E. coli* 厌氧混合酸发酵途径
Fig. 1 Anaerobic mixed acid fermentation metabolic pathway in *E. coli*
Filled rectangles represent inactivated enzyme, dash line represents the newly constructed pathway

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

受体菌 NZN111 由 David P. Clark 教授(Southern Illinois University)惠赠, 表达载体 pTrc99a-*sfcA* 由本实验先期构建并保藏。重组菌 NZN111 (pTrc99a-*sfcA*)为本研究中构建。

1.1.2 主要试剂及仪器

胰蛋白胨和酵母粉(OXOID 公司), L-苹果酸(Sigma 公司), NAD(南京凯基生物科技发展有限公司), IPTG 和抗生素(南京生兴生物技术有限公司), 蛋白质分子量标准(北京天根生化科技有限公司), 其它试剂皆为国产分析纯。100 mL 血清瓶(德国默克公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件

有氧培养采用 LB 培养基。厌氧发酵由有氧培养转接血清瓶, 培养基为 LB 添加 1.5%碱式碳酸镁、2%葡萄糖以及 0.15%乙酸钠, 氯霉素和硫酸卡那霉

素终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 重组菌培养时, 加入氨苄终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及相应终浓度的 IPTG, 有氧培养转接厌氧发酵时即加入 IPTG。加入 MgCO_3 的目的是为了控制发酵过程中的 pH, 且厌氧发酵中产生的各种有机酸和其反应产生的 CO_2 对于厌氧环境的维持和丁二酸的产生都是有利的^[9]。加入乙酸钠的原因是 NZN111 缺失了 *pfl* 基因导致不能正常合成乙酰辅酶 A, 少量的乙酸钠可作为生物合成的前体, 有利于其在厌氧条件下的生长^[10]。

厌氧培养条件如下: 选择有氧条件下处于不同生长期的菌种按 10% 接种量接入装液量为 30 mL, 容积为 100 mL 的血清瓶中厌氧发酵。菌种转接后, 从 CO_2 钢瓶中经高压灭菌后的 0.22 μm 滤器向培养基中充入 CO_2 1 min, 从而保证血清瓶中为厌氧环境, 30 $^\circ\text{C}$, 200 r/min 厌氧培养。

1.2.2 重组苹果酸酶的诱导表达

菌体转化: CaCl_2 法^[11]。有氧诱导: 37 $^\circ\text{C}$, 200 r/min 培养菌体 A_{600} 至 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 30 $^\circ\text{C}$ 诱导 8 h, 超声破碎后取上清即粗酶液, 测定酶活并进行 SDS-PAGE 分析。总蛋白浓度测定按照 Bradford 法^[12], 以 BSA 为标准。

1.2.3 酶活检测

标准反应体系如下: 100 mmol/L HEPES, pH 7.5, 1 mmol/L NAD, 5 mmol/L L-苹果酸, 5 mmol/L MnCl_2 。室温下连续监测 340 nm 处吸光值的变化, 根据测定的标准曲线换算成底物浓度。

酶活定义为 25 $^\circ\text{C}$, 1 min 内, 催化 1 μmol L-苹果酸转化为丙酮酸所需要的酶量为 1u。比酶活定义为每毫克蛋白含有的酶活(u/mg)。

1.2.4 发酵及代谢物分析

培养基中的葡萄糖用生物传感仪(SBA40C)检测, 有机酸用高效液相色谱法(HPLC)检测, 泵型号为 Dionex P680, 紫外检测器型号为 Dionex UVD170U, 色谱柱为 Alltech Prevail C18 5 μ ; 流动相为 25 mmol/L

KH_2PO_4 , pH2.5, 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 215 nm。结果均为至少 3 次重复实验得出的稳定值。

2 结果与讨论

2.1 苹果酸酶的诱导表达

选择诱导剂 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 重组菌 30 $^\circ\text{C}$, 200 r/min 诱导 8 h 后, 超声破碎测定酶活力和进行 SDS-PAGE 实验, 以受体菌为对照。

酶活测定结果为重组菌苹果酸酶比酶活为 30.67 u/mg, 而对应的受体菌仅为 0.216 u/mg, 重组菌的比酶活提高了 140 倍, SDS-PAGE 的结果如图 2 所示, 可见在大约 64 kD 的位置上有一明显的诱导蛋白条带, 其大小与 *sfcA* 的分子量相符。可见, 苹果酸酶在 NZN111 中获得了大量的表达。

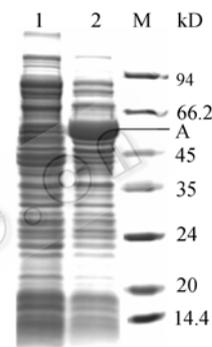


图 2 pTrc99a-sfcA 表达的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of pTrc99a-sfcA expression
1: NZN111; 2: recombinant NZN111; M: protein marker;
A: malic enzyme

2.2 厌氧发酵研究

2.2.1 过量表达苹果酸酶对产丁二酸的影响

为了考察过量表达的苹果酸酶对重组 NZN111 发酵产酸的影响, 以受体菌 NZN111 为对照, 采用先有氧培养生长菌体, 再转接厌氧发酵的两阶段发酵模式, 按 1.67%(V/V) 接种量从冻存管接入三角瓶中, 当有氧培养菌体 A_{600} 至 2.5 左右时, 按接种量 10% 转接至血清瓶中厌氧发酵, 其中厌氧诱导添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 发酵 48 h, 发酵结果见表 1。

表 1 过量表达苹果酸酶对发酵产物形成的影响

Table 1 The effect of overexpression of malic enzyme on fermentation product formation

Strains	t/h	pH	Glucose/(g/L)	Succinate/(g/L)	Pyruvate/(g/L)	Formate/(g/L)	Acetate/(g/L)	Lactate/(g/L)
NZN111	0	6.98	17.25	ND	ND	ND	0.48	ND
	48	7.09	11.75	0.37	1.50	ND	0.87	ND
Recombinant NZN111	0	6.98	17.0	ND	ND	ND	0.44	ND
	48	6.28	0	8.96	2.49	ND	0.65	ND

37, pH 6.3 时, 野生型 *E. coli* 厌氧发酵利用 20 g 葡萄糖可以产生 1.3 g 丁二酸, 2.4 g 乙酸和 8.0 g 乳酸^[13], 乳酸是厌氧发酵中有机酸含量最高的。由结果可见, 过量表达的苹果酸酶在重组 NZN111 体内催化了从丙酮酸到苹果酸的逆向反应, 苹果酸最终经过富马酸转化为丁二酸, 丁二酸是积累的主要有机酸。发酵结束时, 重组 NZN111 葡萄糖全部耗尽, 丁二酸的浓度为 8.96 g/L, 乙酸 0.65 g/L, 而对应的受体 NZN111 葡萄糖还剩 11.75 g/L, 丁二酸只有 0.37 g/L, 乙酸 0.87 g/L。重组菌丁二酸浓度提高了 23 倍, 且丁二酸和乙酸的浓度比为 13.7:1。

丙酮酸并未完全被苹果酸酶转化成为苹果酸, 发酵液中还残留有 2.49 g/L, 预测是由于在重组 NZN111 体内, 苹果酸酶本身催化的就是逆向反应, 动力学参数 K_m 的限制, 故丙酮酸不会完全转化成为丁二酸。发酵液中没有检测到乳酸和甲酸, 和文献报道^[6] 一致。由于发酵液中添加了 1.5 g/L 乙酸钠, 对应的初始乙酸检测浓度为 0.44 g/L, 故实际上发酵过程中产生的乙酸是很少的, 少量乙酸的产生推测是由于培养基成分蛋白胨和酵母粉中含有少量乙酸合成的前体物质。

同时还观察到对于受体 NZN111 而言, 延长发酵时间对于其生长和发酵产酸都没有帮助, 且培养基中添加乙酸钠作用不大。而对于重组 NZN111, 培养基中添加乙酸钠, 有利于葡萄糖消耗速率的提高(数据未列出)。

2.2.2 不同 IPTG 浓度对发酵产酸的影响

合适的 IPTG 浓度是诱导型基因工程菌发酵中的一个关键因素, 过低的 IPTG 浓度会影响目的蛋白的表达量和活性, 过高的 IPTG 浓度对于细胞生长具有毒害作用。一般推荐的 IPTG 浓度为 0.01 mmol/L~1 mmol/L^[11], 实验中选择不同的 IPTG 浓度考察其对发酵产酸的影响, 同时以不加 IPTG 诱

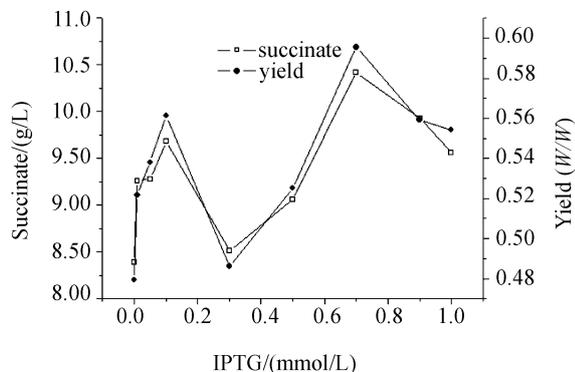


图3 不同 IPTG 浓度对发酵产酸及丁二酸收率的影响
Fig. 3 Effect of different IPTG concentration on succinate production and yield of succinate

导的结果作为对照。转接方式和转接 OD 的选择同上。由结果可见: 加入 IPTG 诱导比不加 IPTG 诱导丁二酸产量及其对葡萄糖的收率要高, 且当 IPTG 终浓度为 0.7 mmol/L 时, 丁二酸和丁二酸/葡萄糖的值均为最大, 分别为 10.42 g/L 和 59.54%, 故选择 0.7 mmol/L 为最终的诱导剂浓度。

2.2.3 不同生长时期菌体转接对发酵产酸的影响

微生物在有氧和厌氧条件下培养时, 其生理和代谢路径有很大的差别^[14], 故从有氧培养转变为厌氧培养的时机选择就显得尤为重要, 即需要选择有氧培养时合适的菌体生长期来进行两阶段的转接。

为此从甘油管中按 1.67%(V/V) 的接种量接入三角瓶中过夜培养活化菌种, 并以相同的接种量再转接一次, 制作重组 NZN111 的生长曲线(图 4)。根据得到的生长曲线, 分别选取对数生长期的初期、中期、末期以及稳定期的菌种, 即 A_{600} 为 0.5、1.5、2.5、3.5、4.10 左右时, 按 10% 接种量接入血清瓶中厌氧发酵, 发酵液中丁二酸含量和其对葡萄糖的收率如图 5 所示。

可见, 选择不同生长期的菌种转接厌氧发酵产酸,

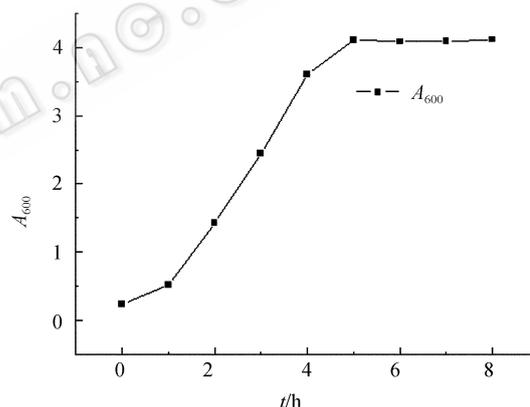


图4 重组 NZN111 的生长曲线
Fig. 4 Growth curve of recombinant NZN111

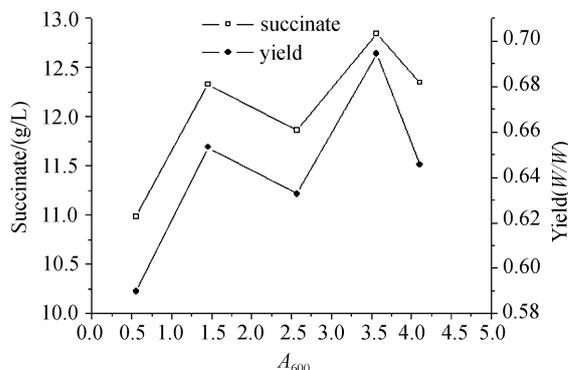


图5 不同生长时期菌体转接对发酵产酸的影响
Fig. 5 Effect of transition of different growth periods on succinate production

结果差别较大, 当菌种生长至对数生长期后期, 即 A_{600} 为 3.5 左右转接时, 初始葡萄糖为 18.5 g/L, 至发酵结束时, 菌体生长 A_{600} 为 3.45, 丁二酸产量及其对葡萄糖的收率均为最高, 分别为 12.84 g/L 和 69.43%, 发酵液中的乙酸为 0.58 g/L, 丁二酸和乙酸的浓度比为 22:1, 丙酮酸浓度为 1.01 g/L, 丁二酸的大量积累使得发酵液的 pH 值由初始的 6.98 左右降至 5.88。另外, 经过活化后的菌种在转接 A_{600} 为 2.5 时发酵产丁二酸为 11.86 g/L, 收率为 63.27%, 均比前文提及的未经活化的菌种的 10.42 g/L 和 59.54% 有明显提高。

3 结论与展望

本研究中将先前构建的含有苹果酸酶基因的表达载体 pTrc99a-sfcA 转化进 *E.coli* NZN111(*ldhA::Kan pfl::Cam*)中, 构建了基因工程菌 NZN111 (pTrc99a-sfcA), 苹果酸酶在 NZN111 体内获得了大量表达, 0.5 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后测定的比酶活为 30.67 u/mg, 比受体菌提高了 140 倍。

厌氧发酵实验结果表明, 过量表达的苹果酸酶在 NZN111 体内催化了从丙酮酸到苹果酸的逆向反应, 重新恢复了其在厌氧条件下的生长能力, 最终丁二酸成为发酵过程中积累的主要有机酸。优化后得出结论: 采用两阶段发酵模式, 将经过一次活化的菌种先有氧培养菌体至 A_{600} 为 3.5 左右, 即对数生长期的后期, 再以 10% 的接种量转入厌氧发酵, 初始葡萄糖为 18.5 g/L, 选择 0.7 mmol/L IPTG 作为诱导剂时, 发酵结束时发酵液中丁二酸的浓度为 12.84 g/L, 对葡萄糖的收率为 69.43%, 发酵液中没有检测到乳酸和甲酸, 有极少量的乙酸, 丁二酸和乙酸的浓度比为 22:1, 丙酮酸浓度为 1.01 g/L。可见, 本研究中构建的基因工程菌具有高产丁二酸, 且副产物极少的优点。

Stols^[6]和 Hong^[15]分别在 NZN111 中表达苹果酸酶, 20 g/L 的初始葡萄糖发酵最终分别产生 12.8 g/L 和 8 g/L 丁二酸, 可见本研究中构建的工程菌在同类菌种中处于先进水平。

一般野生型 *E.coli* 20 g/L 葡萄糖过夜即可耗光^[6], 而构建的重组 NZN111 葡萄糖消耗的速度相比较慢, 下一步研究的重点将集中于尝试在 5 L 发酵罐上通过调整培养方式及培养条件来考察葡萄糖消耗速率以及重组 NZN111 对于高浓度葡萄糖的耐受性。目前这部分研究工作正在展开, 敬请关注后续报道。

致谢 感谢 Prof. David. P. Clark (Southern Illinois University) 提供受体 NZN111, 以及在实验中给予的帮助和指导!

REFERENCES

- [1] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **51**(5): 545–552.
- [2] Carol Potera. Making Succinate More Successful. *Environmental Health Perspectives*, 2005, **113**(12): A832–A835.
- [3] Sanchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metabolic Engineering*, 2005, **7**(3): 229–239.
- [4] 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. *Metabolic Engineering*, 2005, **7**(2): 116–127.
- [5] Vemuri G N, Eiteman M A, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 1715–1727.
- [6] Stols L, Donnelly MI. Production of succinic acid through overexpression of NAD⁺-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(7): 2695–2701.
- [7] Jiang M, Xie X, Xu L, et al. Effect of overexpression of NAD⁺-dependent malic enzyme on anaerobic mixed acid fermentation of *E.coli* FMJ39. *China Biotechnology*, 2007, **27**(1): 69–74.
- 姜岷, 谢鑫, 许琳, 等. 过量表达苹果酸酶对 *E. coli* FMJ39 厌氧混合酸发酵的影响. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(1): 69–74.
- [8] Bunch PK, Mat -Jan F, Lee N et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1997, **143**(1): 187–195.
- [9] Samuelov NS, Lamed R, Lowe S, et al. Influence of CO₂-HCO₃⁻ levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(10): 3013–3019.
- [10] Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 1989, **171**(1): 342–348.
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, Beijing: Science Press, 1998.
- [13] Neidhardt FC, Gurtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC: ASM Press, 1996.
- [14] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, **28**(6): 325–332.
- [15] Hong SH, Lee SY. Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **74**(2): 89–95.