

好氧发酵生产琥珀酸工程菌株的构建

康振¹, 耿艳平¹, 张园园¹, 祁庆生^{1,2}

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 山东大学 国家糖工程技术研究中心, 济南 250100

摘要: 通过分析大肠杆菌的碳源代谢途径, 利用基因敲除手段, 以 *Escherichia coli* MG1655 为出发菌株, 成功构建了琥珀酸好氧发酵生产工程菌 *E. coli* QZ1111 (MG1655 Δ ptsG Δ poxB Δ pta Δ iclR Δ sdhA)。检测结果表明该菌株能以葡萄糖为碳源, 在好氧发酵且不表达任何异源基因的条件下大量积累琥珀酸。摇瓶试验证明, 琥珀酸发酵产量达到 26.4 g/L, 乙酸盐作为唯一检测到的副产物产量为 2.3 g/L。二者浓度比达到 11.5:1。

关键词: 大肠杆菌, 琥珀酸, 代谢工程

Construction of Engineered *Escherichia coli* for Aerobic Succinate Production

Zhen Kang¹, Yanping Geng¹, Yuanyuan Zhang¹, and Qingsheng Qi^{1,2}

1 State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Based on carbon metabolic pathway analysis of *Escherichia coli* MG1655, an aerobic succinate fermentation platform was constructed by knocking out five genes (*ptsG*, *poxB*, *pta*, *iclR* and *sdhA*), which was named *E. coli* QZ1111. Flask cultivation results showed that *E. coli* QZ1111 could accumulate succinate with a concentration of 26.4 g/L under aerobic conditions. The byproduct acetate was only 2.3 g/L. The production ratio of succinate and acetate reached 11.5:1.

Keywords: *Escherichia coli*, succinic acid, metabolic engineering

琥珀酸, 学名丁二酸, 是一种具有重要应用价值的四碳二羧酸, 作为前体被广泛用于合成药品及生物可降解性聚合物^[1]。目前, 琥珀酸主要由化学法合成。但由于环境问题, 以可再生资源为原料的琥珀酸发酵法将逐步取代传统的化学合成法^[2,3]。目前, 研究较多的琥珀酸产生菌株主要有产琥珀酸厌氧螺菌(*Anaerobiospirillum succiniproducens*), 产琥珀酸

放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*) 和大肠杆菌(*Escherichia coli*), 即利用代谢工程和基因工程构建琥珀酸发酵途径, 通过微生物发酵来生产琥珀酸。然而如何提高微生物发酵琥珀酸的产量、降低琥珀酸发酵成本并最终实现发酵法大工业生产琥珀酸? 除了优化发酵工艺之外, 关键在于如何获得以多种可再生碳源为底物、易培养的、高转化效率的、高

Received: September 10; **Accepted:** October 20, 2008

Supported by: National High-tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z218), National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (No. 2007CB707803).

Corresponding author: Qingsheng Qi. Tel: +86-531-88365628; Fax: +86-531-88565610; E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA02Z218)和国家重点基础研究发展规划项目(973 项目) (No. 2007CB707803)资助。

产量琥珀酸的优良工程菌株^[4]。

大肠杆菌作为生产工业产物的宿主,由于其遗传背景清楚、易操作、生长速率快、易培养及利用碳源广等诸多优点而受到越来越多的重视。大肠杆菌也被认为是最有潜力的琥珀酸生产菌株。基因工程与发酵工艺的结合也使大肠杆菌大规模发酵琥珀酸成为可能。许多代谢工程策略已经用于提高大肠杆菌琥珀酸的产量^[5-11]。一株基因改良的大肠杆菌突变株 AFP111/pTrc99A-*pyc* 在厌氧条件下,通过优化培养条件,琥珀酸产量达到了 99.2 g/L^[12]。

但是,厌氧发酵过程也存在一定的缺点,例如菌体量小、碳源利用缓慢、产物合成速率小等。本研究通过代谢流分析,构建了好氧发酵琥珀酸大肠杆菌菌株 *E. coli* QZ1111。该工程菌株具有 5 个基因缺失突变,分别是琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase, SDH),磷酸转乙酰基酶(Phosphotransacetylase, Pta),丙酮酸氧化酶(Pyruvate oxidase, PoxB),异柠檬酸裂解酶阻遏物(*aceBAK* operon repressor, IclR)及葡萄糖糖-磷酸转移酶系统 II(Glucose phosphotransferase system, PtsG)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本试验中,以大肠杆菌 k-12 型 MG1655 野生型为出发菌株。重组敲除系统质粒 pKD46、pKD4、pKD3 及 pCP20 由 Wanner (Yale University)教授惠赠。本研究中所用引物见表 1。

1.1.2 主要试剂及仪器

限制性内切酶及体外扩增聚合酶 *Taq* polymerase 购自 TaKaRa 公司。DNA 快速回收试剂盒购自 OMEGA 公司,胶回收试剂盒购自 Bioflux 公司。引物合成由博尚公司完成。胰蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司。

Shimadzu LC-10Avp 高压液相色谱仪,SPD-M10AvP 二极管阵列检测器,CLAAA-VP 工作站。PCR 仪 Techgene Thermal Cycler-PROGENE 型。

1.2 方法

1.2.1 工程菌株的构建

利用 Red 重组系统^[13]对各基因的敲除。根据同

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
pKD-ptsG F	ACGTAAAAAAGCACCCATACTCAGGAGCACTCTCAATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-ptsG R	AGCCATCTGGCTGCCTTAGTCTCCCAACGTCTTACGGAATGGGAATTAGCCATGGTCC
ptsG test F	CCTGTACACGGCGAGGCTCT
ptsG test R	AATAACACCTGTAAAAAAGGCAGCC
pKD-poxB F	AAACTTGTTACCGTTATCACATTCAGGAGATGGAGAACCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-poxB R	CATGGCATGTCCTTATTATGACGGGAAATGCCACCCTTTATGGGAATTAGCCATGGTCC
poxB test F	TCCCCCTCCGTCAGATGA
poxB test R	GGTATCACTGCGTAAATCAA
pKD-ptA F	GTAACCCGCCAAATCGGCGGTAACGAAAGAGGATAAACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-ptA R	TCAGATATCCGCAGCGCAAAGCTGCGGATGATGACGAGAATGGGAATTAGCCATGGTCC
Pta test F	TCAGCTGGCGGTGCTGTTT
Pta test R	ACCGGAAATAGTGATTATTTCCGG
pKD-iclR F	ATGAAAATGATTTCCACGATACAGAAAAAAGAGACTGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-iclR R	TATGATGGGCAGAATATTGCCTCTGCCGCCAGAAAAAGATGGGAATTAGCCATGGTCC
iclR test F	TAAAAGCGACCACCACG
iclR test R	GCGATTAACAGACACCCT
pKD-sdhA F	TTACGTGATTTATGGATTCGTTTGGTGTGGGTGTGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-sdhA R	ATAAATTGAAAACCTCGAGTCTCATTTCCTGTCTCCGCAATGGGAATTAGCCATGGTCC
sdhA test F	GCTGCAACTGGTGATTGTCCG
sdhA test R	GAGCATCATCAACATCCGGG

源重组原理设计带有 50 bp 同源臂的引物, 以 pKD4 或 pKD3 为模板, 体外克隆卡那霉素(Kan)或氯霉素(Cm)抗性基因。PCR 产物回收经 *Dpn* I 限制性内切酶消化, 胶回收纯化含有同源臂抗性基因的片段。将培养过夜的含有 pKD46 质粒的大肠杆菌按 1% 的接种量转入 50 mL 的 LB 培养基中培养, 同时添加 L-阿拉伯糖至 0.1% (*W/V*), 培养至(Optical density, *OD*) OD_{600} 为 0.5~0.6。将菌液冰浴 20 min, 4000 r/min, 离心 10 min。利用 10% 的甘油清洗菌体 3 次, 获得电转化感受态细胞。将 7~9 ng 的同源重组抗性基因片段加入 100 μ L 的感受态细胞中, 混匀, 冰浴 2 min, 电击(电压设为 2500 V)。向电击液中加入 900 μ L 的 SOC 培养基, 37°C, 150 r/min, 培养 1 h。于 4000 r/min, 离心 10 min, 浓缩菌液至 200 μ L, 涂布抗性平板, 筛选重组子, 同时利用菌落 PCR 进一步验证重组子的正确性。将质粒 pCP20 转入成功敲除基因的菌株中, 并在 30°C 下培养 8 h, 后转入 42°C 培养过夜。pCP20 在 42°C 下诱导表达 FLP 内切酶从而将 FRT 位点间的抗性基因从基因组上切除掉。敲除步骤如图 1 所示。

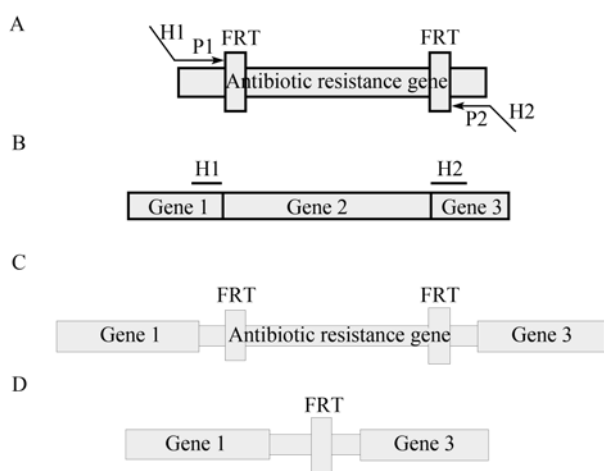


图 1 一步法基因敲除的步骤^[13]

Fig. 1 One-step gene disruption strategy^[13]

H1 and H2 refer to the homology extensions of aim region, P1 and P2 refer to priming sites

(A) PCR amplify FRT-flanked resistance gene; (B) Transform strain expressing λ red recombinase; (C) Select antibiotic-resistant transformants and verify with PCR; (D) Eliminate resistance cassette using a FLP expression plasmid

1.2.2 培养基及培养条件

本研究中培养菌体基本培养基为 LB(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。

基因敲除所用 SOC 培养基(g/L): 蛋白胨 20, 酵

母粉 5, NaCl 0.5, KCl 2.50 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, 葡萄糖 20。pH 7.0。

发酵培养基组成为(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 1, KH₂PO₄ 3, MgCl₂ 0.2, CaCl₂ 0.2, pH 6.5。发酵时加入葡萄糖, 利用 Na₂CO₃ 调节 pH 6.0~7.0。卡那霉素终浓度为 50 mg/L。

挑取平板中的单菌落至试管中, 培养 16 h, 后按 2% 的接种量接入 1000 mL 的三角瓶中(装液量为 200 mL), 37°C, 225 r/min。定时取样, 检测。

1.2.3 分析方法

菌液室温下 12 000 r/min, 离心 2 min, 取上清然后用孔径为 0.22 μ m 的无菌滤膜过滤, 后利用高效液相色谱(HPLC)检测发酵产物。色谱柱为 Atlantis T3 (5.0、4.6、250 mm), 流动相为 1/1000 的甲酸水溶液, 流速为 0.8 mL/min。琥珀酸与乙酸盐利用示差检测器(RI)检测, 丙酮酸利用紫外检测器检测, 波长为 210 nm。发酵结果均为测定 3 次的平均值。葡萄糖利用生物传感分析仪 SBA-40C 型检测(山东省科学院)。菌体用无菌 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液清洗 3 次, 然后利用分光光度计测量菌体 *OD*, 发射光波长为 600 nm。

2 结果与讨论

2.1 工程菌株 *E. coli* QZ1111 的构建

通过 Red 重组系统^[13], 在 MG1655 野生型菌株中分别敲除了琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase, SDH), 磷酸转乙酰基酶(Phosphotransacetylase, Pta), 丙酮酸脱氢酶(Pyruvate oxidase, PoxB), 异柠檬酸裂解酶阻遏物(*aceBAK* operon repressor, IclR), 及葡萄糖-磷酸转移酶系统 II(Glucose phosphotransferase system, PtsG), 成功构建了 *E. coli* QZ1111 琥珀酸好氧发酵菌株。好氧发酵途径如图 2 所示。PtsG 的缺失使葡萄糖的摄取速率减小, 阻止了葡萄糖的不均衡代谢, 同时, 也减少了丙酮酸的生成。更多的 PEP 作为 OAA 的前体进入 TCA 循环中, 从而使更多的碳源流向琥珀酸。此外, PtsG 的敲除解除了大肠杆菌的葡萄糖代谢产物的抑制现象, 从而使得大肠杆菌具备同时利用多种碳源的潜力; PoxB 和 Pta 的缺失在阻止了乙酸盐主要的生成途径, 从而使得更多的碳源流向 TCA 循环; IclR 的缺失使得已醛酸途径被激活, 从而增加了琥珀酸的生成途径, 同时 IclR 缺失也使得

乙酸盐的生成量减少; 琥珀酸脱氢酶共有 4 个亚基, *SdhA* 亚基的缺失可以阻断琥珀酸的氧化。培养中观察表明与 *SdhA* 缺失菌株相比, *SdhAB* 缺失菌株更容易衰老, 这说明 *SdhB* 亚基可能有其他功能。各基因敲除引物序列见表 1 (各基因敲除 PCR 检测图略)。

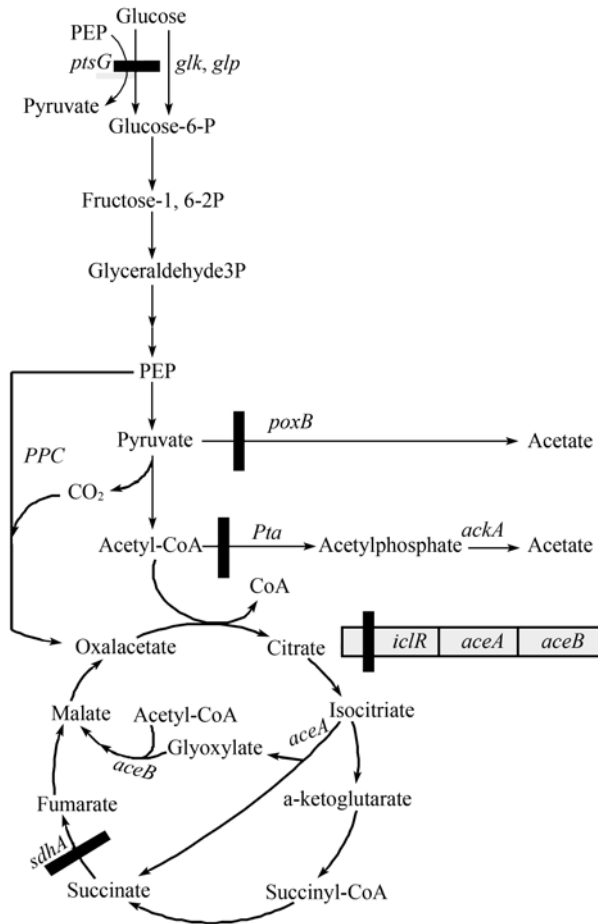


图 2 琥珀酸好氧发酵途径

Fig. 2 Aerobic fermentation pathway of succinate

2.2 工程菌株 *E. coli* QZ1111 的生理特性

对构建的大肠杆菌工程菌株 *E. coli* QZ1111 进行了培养及生理特性分析。结果表明由于乙酸盐主要生成途径 *pta* 与 *poxB* 基因的缺失, 造成工程菌株 QZ1111 生长初期能量供应的减少, 与野生型大肠杆菌相比, 较为缓慢。工程菌株 QZ1111 在 2 h 后进入对数生长期, 生长速率迅速增大, 在 6 h 时生长速率达到最大值 1.34 OD_{600}/h , 而野生型大肠杆菌 MG1655 在 4 h 达到最大生长速率 1.05 OD_{600}/h (结果如图 3 所示)。虽然工程菌株培养初期生长比野生型大肠杆菌 MG1655 缓慢, 但工程菌株 QZ1111 的最终生物量 ($OD_{600}=5.4$) 略大于野生菌的最大生物量 ($OD_{600}=4.9$)。结果表明 *ptsG*、*poxB*、*pta*、*iclR* 及 *sdhA* 基因不是大肠杆菌的

持家基因, 在缺失上述 5 个基因的情况下, 工程菌株 QZ1111 仍可以在 LB 培养基中很好的生长。

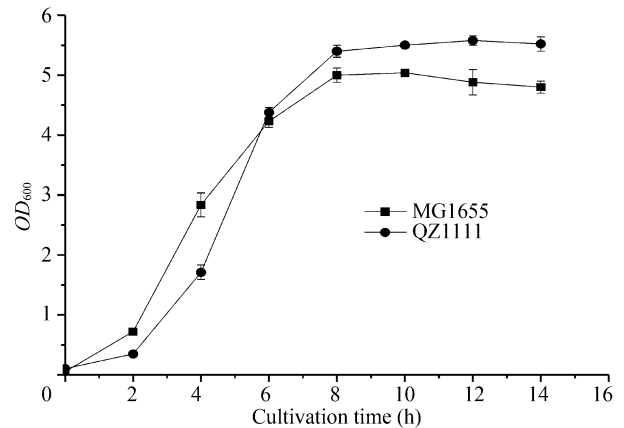


图 3 生长曲线比较

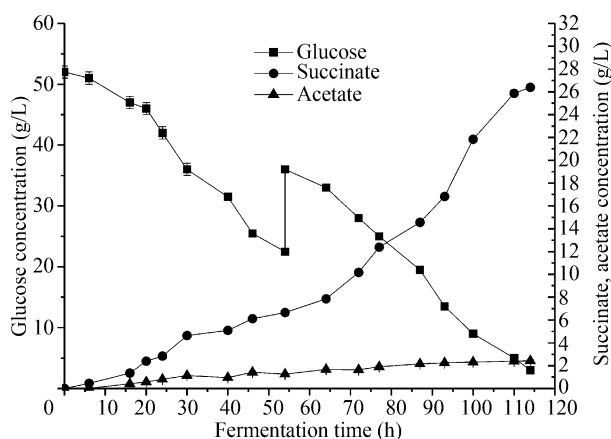
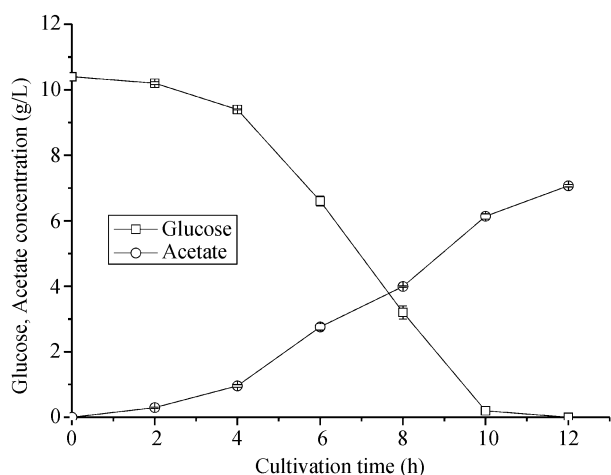
Fig. 3 Comparison of growth curve

2.3 工程菌株 *E. coli* QZ1111 的发酵

为了验证工程菌株 *E. coli* QZ1111 积累琥珀酸的能力, 本研究对该工程菌株进行了摇瓶发酵试验。结果表明 *E. coli* QZ1111 在好氧条件下, 发酵产物主要是琥珀酸, 乙酸盐产量较少, 丙酮酸没有积累。在消耗约 52 g/L 的葡萄糖情况下, 琥珀酸、乙酸盐的终浓度分别为 26.4 g/L 和 2.3 g/L, 两者浓度之比达到为 11.5:1 (图 4)。同时, 从葡萄糖的消耗曲线可以看出, *ptsG* 基因的敲除使得葡萄糖代谢更为均衡。而野生型大肠杆菌在以葡萄糖为碳源、好氧条件下培养, 其代谢产物主要是乙酸盐。培养消耗 10.4 g/L 的葡萄糖生成 7.07 g/L 的乙酸盐 (图 5), 在发酵产物中没有监测到琥珀酸, 说明琥珀酸作为 TCA 循环中的中间代谢产物, 生成后迅速被氧化掉转化为延胡索酸, 琥珀酸不会在发酵醪中积累。

3 结论与展望

通过对大肠杆菌碳源代谢流的分析, 本研究利用 Red 重组系统在大肠杆菌中敲除了 *ptsG*、*poxB*、*pta*、*iclR* 及 *sdhA* 基因, 成功构建了琥珀酸好氧发酵途径。该工程菌株具有生长迅速, 菌体量大等特点。好氧工程菌株 *E. coli* QZ1111 在 LB 中培养结果表明, 上述 5 个基因的缺失虽然使工程菌的生长延滞期略微变长, 但 *E. coli* QZ1111 仍可以很好的生长, 在进入对数生长期后获得更大的比生长速率并且其最终生物量大于野生型的生物量。这表明该菌株适合于发酵生产琥珀酸, 具有一定的潜在价值。

图4 *E. coli* QZ1111 好氧发酵生产琥珀酸Fig. 4 Aerobic production of succinate by *E. coli* QZ1111图5 *E. coli* MG1655 发酵及检测Fig. 5 Aerobic fermentation results of *E. coli* MG1655

本研究对工程菌株 *E. coli* QZ1111 进行了摇瓶发酵检测表明该工程菌株可以有效地利用葡萄糖生成琥珀酸, 副产物仅有少量的乙酸盐生成。在消耗 52 g/L 葡萄糖的情况下, 生成 26.4 g/L 的琥珀酸, 乙酸盐的浓度仅为 2.3 g/L。而葡萄糖和琥珀酸的质量转化率为 50.7%(W/W), 进一步的发酵罐发酵和发酵策略的优化会进一步提高琥珀酸的产量和比率。目前, 后期的发酵优化试验正在进行。同时, 该菌株由于敲除了 *ptsG* 基因, 因此大肠杆菌葡萄糖代谢产物抑制现象得以解除, 从而使该工程菌株 *E. coli* QZ1111 可以同时利用含有葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等多种碳源、廉价的生物质原料水解物^[14]。这就为今后的大规模廉价发酵生产琥珀酸提供了基础。

REFERENCES

[1] Hong SH, Lee SY. Importance of redox balance on the

production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**(3): 286–290.

- [2] Kim P, Laivenieks M, Vieille C, *et al.* Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(2): 1238–1241.
- [3] Samuelov NS, Datta R, Jain MK, *et al.* Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(5): 2260–2263.
- [4] Sanchez AM, Bennett GN, San KY. Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains. *Metab Eng*, 2006, **8**(3): 209–226.
- [5] Chatterjee R, Millard CS, Champion K, *et al.* Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(1): 148–154.
- [6] Gokarn RR, Eiteman MA, Martin SA, *et al.* Production of succinate from glucose, cellobiose, and various cellulosic materials by the ruminal anaerobic bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, **68**(1-2): 69–80.
- [7] Hong SH, Lee SY. Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **74**(2): 89–95.
- [8] Lin H, Bennett GN, San KY. Chemostat culture characterization of *Escherichia coli* mutant strains metabolically engineered for aerobic succinate production: a study of the modified metabolic network based on metabolite profile, enzyme activity, and gene expression profile. *Metab Eng*, 2005, **7**(5/6): 337–352.
- [9] Sanchez AM, Bennett GN, San KY. Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol Prog*, 2005a, **21**(2): 358–365.
- [10] 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. *Metab Eng*, 2005b, **7**(3): 229–239.
- [11] Stols L, Donnelly MI. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(7): 2695–2701.
- [12] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(4): 1715–1727.
- [13] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(12): 6640–6645.
- [14] Li R, Chen Q, Wang PG, *et al.* A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(5): 1103–1109.