

## 摘要

琥珀酸是一种重要的四碳平台化学品,广泛应用于制药、可降解塑料、膳食、纤维、金属加工和农药等领域。面对化石燃料枯竭的问题和可持续发展的需要,利用可再生原料生物合成琥珀酸已成为全世界关注的课题。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,存在得率低、生产强度低、副产物多等问题。本研究根据不同发酵条件下琥珀酸产量,通过化学计量学分析发现,两阶段发酵条件下 *E. coli* FMME-N-26 高效生产琥珀酸需要借助氧化性三羧酸(TCA)循环为还原性三羧酸(r-TCA)循环提供足够的 ATP 和 NADH; 通过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; 最后通过发酵优化策略,促进了菌株 *E. coli* FW-17 生产琥珀酸。主要研究内容如下:

1. 化学计量学分析琥珀酸生产: 首先,在有氧、厌氧和两阶段发酵条件下分析了菌株 *E. coli* FMME-N-26 的琥珀酸生产情况,发现在菌株 *E. coli* FMME-N-26 高效生产琥珀酸的过程中需要借助 TCA 循环为 r-TCA 途径提供一定量的 NADH 和 ATP。其次,研究了胞内 NADH 和 ATP 含量对菌株 *E. coli* FMME-N-26 生产琥珀酸的影响,对 *E. coli* 生产琥珀酸的过程进行了化学计量分析,发现部分碳流进入 TCA 循环用于生成能量与辅因子,从而解除了能量与辅因子不足而导致的 r-TCA 合成琥珀酸能力下降的问题。

2. 提高胞内 ATP 和 NADH 水平促进琥珀酸生产: 首先,为了提高胞内 ATP 水平,异源表达源自运动假单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的葡萄糖扩散蛋白编码基因 *Zmgf*、过表达磷酸甘油酸变位酶编码基因 *pgm* 和源自产琥珀酸放线杆菌的磷酸烯醇式丙酮酸激酶编码基因 *Aspck*, 分别构建了 *E. coli* FW-1、*E. coli* FW-2 和 *E. coli* FW-3。发酵结果表明: *E. coli* FW-1、*E. coli* FW-2 和 *E. coli* FW-3 的胞内 ATP 含量分别提高了 17.95%、100.00%和 47.44%。其中, *E. coli* FW-1 和 *E. coli* FW-3 的琥珀酸产量比出发菌株 *E. coli* FMME-N-26 分别提高了 9.25%和 6.55%, 但是 *E. coli* FW-2 的琥珀酸产量无明显变化。其次,为了提高胞内 NADH 水平,敲除乙醇脱氢酶编码基因 *adhE*, 构建了菌株 *E. coli* FW-5; 分别过表达磷酸甘油醛脱氢酶编码基因 *gapA* 和烟酸磷酸核糖基转移酶编码基因 *pncB*, 构建了菌株 *E. coli* FW-6 和 *E. coli* FW-7。发酵结果表明,与 *E. coli* FMME-N-26 相比, *E. coli* FW-5、*E. coli* FW-6 和 *E. coli* FW-7 的胞内 NADH 含量分别提高了 28.13%、8.57%和 17.20%, 琥珀酸产量分别提高了 6.26%、10.50%和 13.09%。最后,为了协调 ATP 与 NADH 供给平衡,借助不同强度 RBS 组合优化 *pgm* 和 *Zmgf* 的基因表达水平,以及 *gapA* 和 *pncB* 的基因表达水平,获得最优工程菌株 *E. coli* FW-17, 琥珀酸产量达到 85.67 g·L<sup>-1</sup>, 比出发菌株 *E. coli* FMME-N-26 提高了 34.80%。

3. 发酵优化促进琥珀酸生产: 首先,从玉米浆品牌种类与浓度、厌氧阶段 pH 中和剂和厌氧阶段葡萄糖浓度三方面优化了菌株 FW-17 的两阶段发酵过程。5 L 发酵罐发酵结果表明,采用 5 g·L<sup>-1</sup> 同盛牌玉米浆为氮源、碳酸镁与碳酸钠协同调节 pH、厌氧阶段控制葡萄糖浓度为 1 g·L<sup>-1</sup> 时,琥珀酸的产量和生产强度分别提高至 144.36 g·L<sup>-1</sup> 和 1.99

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。其次，将上述最优发酵条件放大至 1000 L 发酵罐，琥珀酸的产量和生产强度分别达到了  $143.58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1.99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

**关键词：**琥珀酸；大肠杆菌；辅因子；代谢工程；发酵优化

## Abstract

Succinic acid is an important four-carbon platform chemical that is widely used in pharmaceutical, degradable plastics, dietary, fiber, metal processing, and pesticides. Because of the depletion of fossil fuels and the need for sustainable development, the biosynthesis of succinic acid from renewable raw materials has become a worldwide concern. The production of succinic acid by *Escherichia coli* is limited by the imbalance of intracellular cofactors, resulting in low yield, low titer, and many by-products. In this study, based on the yield of succinic acid under different fermentation conditions, the stoichiometric analysis showed that efficient production of succinic acid by *E. coli* FMME-N-26 under two-stage fermentation conditions required the oxidative tricarboxylic acid (TCA) cycle to provide sufficient ATP and NADH for the reducing tricarboxylic acid (r-TCA) cycle. The intracellular ATP and NADH contents were regulated by metabolic engineering strategy to build engineering strain *E. coli* FW-17. Finally, through the fermentation optimization strategy, the production of succinic acid by *E. coli* FW-17 was promoted. The main contents of this study are as follows:

1. Chemometric analysis of succinic acid production: First of all, the production of succinic acid by *E. coli* FMME-N-26 was analyzed under aerobic, anaerobic and two-stage fermentation conditions. It was found that TCA cycle was required to provide a reasonable amount of NADH and ATP for the r-TCA pathway during the efficient production of succinic acid. Secondly, the effects of intracellular NADH and ATP content on the production of succinic acid by *E. coli* FMME-N-26 strain were studied. The process of succinic acid production by *E. coli* was analyzed by stoichiometry. Thus, the problem of reduced synthesis of succinic acid by r-TCA caused by insufficient energy and cofactor was relieved.

2. Increase intracellular ATP and NADH levels to promote succinate production: First, to increase intracellular ATP levels, we heteronomically expressed *Zmg1f* gene encoding the glucose-diffusing protein from *Zymomonas mobilis*, overexpressed *pgm* gene encoding phosphoglycerate mutase and *Aspck* gene encoding phosphoenolpyruvate kinase from *Actinobacillus succinogenes*. *E. coli* FW-1, *E. coli* FW-2, and *E. coli* FW-3 were constructed, respectively. The results of fermentation showed that the intracellular ATP content of *E. coli* FW-1, *E. coli* FW-2 and *E. coli* FW-3 were increased by 17.95%, 100.00% and 47.44%, respectively. Succinic acid titer of *E. coli* FW-1 and *E. coli* FW-3 was 9.25% and 6.55% higher than that of the parent strain *E. coli* FMME-N-26, respectively. However, there was no significant change in the succinic acid titer of *E. coli* FW-2. Secondly, to increase the intracellular NADH level, the *adhE* gene encoding alcohol dehydrogenase was knocked out to construct *E. coli* FW-5, *E. coli* FW-6 and *E. coli* FW-7 strains were constructed by overexpressing the *gapA* gene encoding glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and *pncB*

gene encoding nicotinic phosphoribosyltransferase, respectively. The results of fermentation showed that the intracellular NADH content of *E. coli* FW-5, *E. coli* FW-6, and *E. coli* FW-7 were 28.13%, 8.57%, and 17.20% higher than that of *E. coli* FMME-N-26, respectively. Succinic acid titer was increased by 6.26%, 10.50%, and 13.09%, respectively. Finally, in order to coordinate the balance of ATP and NADH supply, the expression levels of *pgm* and *Zmglf* genes, *gapA* and *pncB* genes were optimized by RBS combinations of different strength, and the optimal engineering strain *E. coli* FW-17 was obtained. The succinic acid titer reached 85.67 g·L<sup>-1</sup>. Compared with the original strain *E. coli* FMME-N-26, it was increased by 34.80%.

3. Fermentation optimization to promote succinic acid production: First, the two-stage fermentation process of *E. coli* FW-17 was optimized in terms of the type and concentration of corn pulp, pH neutralizer in the anaerobic stage, and glucose concentration in the anaerobic stage. The results of 5 L fermenter showed that the titer and productivity of succinic acid increased to 144.36 g·L<sup>-1</sup> and 1.99 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively, when 5 g·L<sup>-1</sup> Tongsheng corn pulp was used as nitrogen source, the pH was adjusted by magnesium carbonate and sodium carbonate, and the concentration of glucose was 1 g·L<sup>-1</sup>. Secondly, when the optimal fermentation conditions were scaled up to 1000 L fermenter, the titer and productivity of succinic acid reached 143.58 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> and 1.99 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** succinic acid, *Escherichia coli*, cofactor, Metabolic engineering, Fermentation optimization

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 琥珀酸概述.....	1
1.1.1 琥珀酸简介.....	1
1.1.2 琥珀酸生产方法.....	1
1.2 微生物生产琥珀酸的研究现状.....	2
1.2.1 琥珀酸的生产菌株.....	2
1.2.2 微生物生产琥珀酸的适应性进化策略.....	4
1.2.3 微生物生产琥珀酸的诱变育种策略.....	5
1.2.4 微生物生产琥珀酸的发酵优化策略.....	5
1.3 代谢工程改造大肠杆菌生产琥珀酸的研究进展.....	7
1.3.1 重构琥珀酸合成路径.....	8
1.3.2 敲除竞争代谢路径.....	8
1.3.3 强化琥珀酸合成路径.....	9
1.3.4 调控辅因子代谢.....	10
1.4 本论文的立题依据与意义.....	10
1.5 本论文的研究内容.....	11
第二章 材料和方法.....	13
2.1 菌株和质粒.....	13
2.2 仪器与试剂.....	19
2.2.1 仪器.....	19
2.2.2 试剂.....	20
2.2.3 培养基.....	20
2.3 培养条件.....	21
2.4 分子生物学技术.....	21
2.4.1 细菌基因组 DNA 的提取.....	21
2.4.2 PCR 反应及其产物回收.....	22
2.4.3 感受态细胞的制备与转化.....	23
2.4.4 质粒提取.....	23
2.4.5 基于 CRISPR-Cas9 系统的基因编辑.....	23
2.5 基因表达菌株的构建.....	24
2.5.1 单基因表达菌株的构建.....	24
2.5.2 不同表达水平组合基因表达菌株的构建.....	24
2.6 分析检测方法.....	25
2.6.1 细胞浓度的测定.....	25

2.6.2 葡萄糖浓度的测定 .....	25
2.6.3 有机酸浓度的测定 .....	25
2.6.4 辅因子 ATP, NADH, NAD <sup>+</sup> 和 NADH 总量的测定 .....	25
2.6.5 RBS 强度的测定 .....	26
第三章 结果与讨论 .....	27
3.1 E. coli 生产琥珀酸的评估 .....	27
3.1.1 不同溶氧条件对 E. coli FMME-N-26 生产琥珀酸的影响..	27
3.1.2 大肠杆菌生产琥珀酸的化学计量分析 .....	28
3.1.3 小结 .....	29
3.2 代谢工程改造 E. coli FMME-N-26 促进琥珀酸生产 .....	29
3.2.1 提高胞内 ATP 含量促进琥珀酸生产 .....	29
3.2.2 提高胞内 NADH 水平促进琥珀酸生产 .....	30
3.2.3 协调 ATP 与 NADH 平衡促进琥珀酸生产 .....	31
3.2.4 小结 .....	34
3.3 发酵优化促进 E. coli FW-17 生产琥珀酸.....	34
3.3.1 不同玉米浆对琥珀酸生产的影响.....	34
3.3.2 不同 pH 中和剂对琥珀酸生产的影响.....	36
3.3.3 不同葡萄糖浓度对琥珀酸生产的影响 .....	37
3.3.4 E. coli FW-17 放大生产琥珀酸 .....	39
3.3.5 小结 .....	40
主要结论与展望 .....	41
参考文献.....	43
附录二:主要符号表 .....	51

# 第一章 绪论

## 1.1 琥珀酸概述

### 1.1.1 琥珀酸简介

琥珀酸作为一种重要的四碳平台化学品，广泛应用于制药、可降解塑料、金属冶炼和食品加工等领域<sup>[1]</sup>，常用作表面活性剂、添加剂、中间体、螯合剂<sup>[2]</sup>；另外，琥珀酸也可以加工成琥珀酸盐作为生产散装化学品的起始原料，如 1,4-丁二醇、二琥珀酸乙二胺，琥珀酸二乙酯和己二酸等<sup>[3]</sup>。琥珀酸的广泛应用使它成为一种十分有潜力的化学品，美国能源部已将琥珀酸列为 12 种最有潜力的大宗生物基化学品首位<sup>[4]</sup>。在 2022 年，全球琥珀酸市场规模达到 10.01 亿元，预计在未来几年将迅速增长。预计至 2028 年全球琥珀酸市场规模将会达到 19.14 亿元<sup>[5]</sup>。

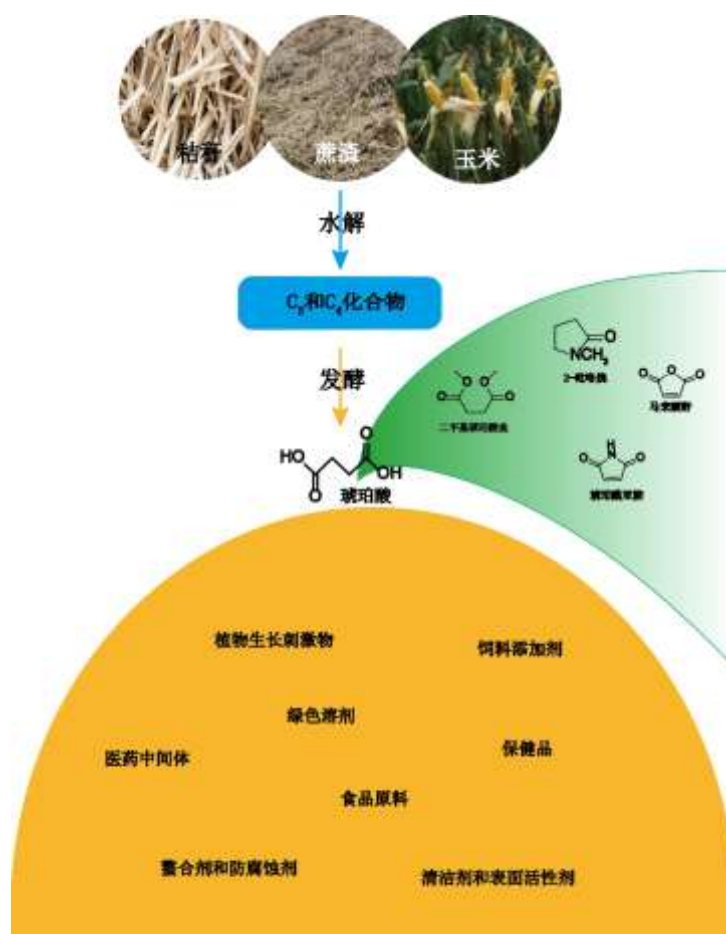


图 1-1 琥珀酸的应用领域

Fig. 1-1 Applications of succinate

### 1.1.2 琥珀酸生产方法

琥珀酸的生产过程中，最常见的化学合成方法是石油化学，它能够有效地满足各类

化学产品的高质量需求。主要包括：(1) 石蜡氧化，这一技术最初被认为是生产琥珀酸的最佳选择，它利用钙或锰作催化剂使得石蜡完全转化，形成含有二羧酸的混合物，随后采用蒸馏、凝聚和干燥等步骤<sup>[6]</sup>，最终获得纯度较高的琥珀酸，但该工艺十分复杂。(2) 催化加氢，该法通过使用 Ni 或 Pb 作为催化剂，顺丁烯二酸酐可通过加氢反应器进行还原，从而获得琥珀酸。尽管这种方式的转换效果较好，但是由于使用的催化成本较高，而且实验过程也比较复杂。(3) 电解合成，该方法通过使用合适的催化剂和电极材料，将马来酸酐电解还原成琥珀酸，电解合成可以通过提高反应中电流效率降低生产成本，但是合成量较低<sup>[7]</sup>。

随着石油储量下降，石油化学方法价格上涨，加上石油工业对环境污染较大，促使人们转向生物化学生产<sup>[8]</sup>。迄今为止，一些高效的琥珀酸生物生产方法已成功应用于工业用途<sup>[8, 9]</sup>。与石油化学生产相比，琥珀酸生物化学生产的原料范围更广，成本更低<sup>[10]</sup>，例如玉米纤维<sup>[11]</sup>、粗甘油<sup>[12]</sup>、木薯根<sup>[13]</sup>、木质纤维素水解物和食品加工废弃物<sup>[14]</sup>等。另外，琥珀酸生物化学生产还可以吸收二氧化碳，因此具有环保效益。

## 1.2 微生物生产琥珀酸的研究现状

### 1.2.1 琥珀酸的生产菌株

为了降低琥珀酸生产成本，近年来，琥珀酸的生产菌株选育受到了科学家们的广泛关注<sup>[15]</sup>。生产菌株在发酵产物的产量、得率及生产强度中起关键作用，另外，生产菌株有与之配套的发醇工艺和下游分离技术，影响着产物生产的生产成本，因此生产菌株决定了微生物生产的经济性。琥珀酸的生产菌株主要包括：(1) 原核生物，例如产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)<sup>[16]</sup>、产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)<sup>[17]</sup>、产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)<sup>[18]</sup>、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[19]</sup> 和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[20]</sup> 等；(2) 真核生物，例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[21]</sup>、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)<sup>[15]</sup>、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 等。

产琥珀酸放线杆菌属于革兰氏阴性菌，它们可以天然地合成琥珀酸，兼性厌氧，其生产能力高、底物谱广且能够固定二氧化碳，另外，它们的稳定性好，可以在各种恶劣的条件下存活<sup>[16, 22, 23]</sup>，对渗透压、高浓度葡萄糖和琥珀酸盐具有较高的耐受性<sup>[24]</sup>。然而，针对产琥珀酸放线杆菌的基因操作工具比较少，并且利用该菌株生产琥珀酸的原料成本比较高<sup>[25]</sup>。因此，产琥珀酸放线杆菌工业化生产琥珀酸仍面临诸多困难。例如，*A. succinogenes* FZ53 以葡萄糖为碳源酵母提取物为氮源，最终琥珀酸产量达到 105.80 g·L<sup>-1</sup><sup>[26]</sup>。

产琥珀酸曼氏杆菌属于革兰氏阴性菌，被认为是一个天然的产琥珀酸菌，具有良好的厌氧性，可以有效地将二氧化碳固定，而且其发酵产出的琥珀酸也十分丰富<sup>[27]</sup>，例如，菌株 *M. succiniciproducens* PALK-CgMDH 异源表达编码谷氨酸棒杆菌苹果酸脱氢酶的 *CgMDH* 基因，最终琥珀酸产量、得率和生产强度分别达到 134.25 g·L<sup>-1</sup>、0.82 g·g<sup>-1</sup> 和 21.30



$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>[18]</sup>。但是该菌株在发酵过程中需要外源补加多种维生素、氨基酸和重金属盐等用于维持菌体的生长和代谢,使得发酵培养基十分复杂,因此实现工业化较为困难<sup>[18, 28]</sup>。

产琥珀酸厌氧螺菌属于革兰氏阴性菌,是一个天然产琥珀酸厌氧菌,通过利用葡萄糖或乳糖等碳源,除发酵生产琥珀酸外,还有乙酸、甲酸和乳酸等有机酸<sup>[29]</sup>。并且其产酸情况会随着  $\text{CO}_2$  的含量而变化,当  $\text{CO}_2$  含量低( $0.1 \text{ mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$  葡萄糖)时,乳酸为主要产物,而当高  $\text{CO}_2$  含量高( $1 \text{ mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$  葡萄糖)时,琥珀酸为主要产物,仅有微量的乳酸生成,在最适  $\text{CO}_2$  含量下,琥珀酸的浓度和得率分别可以达到  $65.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.79 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[30]</sup>。另外,该菌只有在严格厌氧条件下才能正常生长和代谢,使得利用产琥珀酸厌氧螺菌较难实现琥珀酸工业化生产。

谷氨酸棒杆菌属于革兰氏阳性菌,兼性厌氧,其生长速度快并且没有任何毒性,因此在许多领域都得到了应用。目前,其已成为工业生产中的常见菌株,并且该菌正不断地被研究以拓宽其应用范围<sup>[31]</sup>。通过代谢工程改造技术可以大幅度增加从磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)转化至草酰乙酸(OAA)的代谢效率,最终琥珀酸产量、得率和生产强度分别达到  $152.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.09 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  葡萄糖和  $1.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>[32]</sup>。但是该菌株在厌氧条件下生长缓慢,必须选用两阶段的发酵方式进行琥珀酸生产。

酿酒酵母遗传背景清晰,可以利用多种基因手段对菌株进行改造以生产琥珀酸。与传统的产琥珀酸原核细菌相比,酿酒酵母具有更高的耐低 pH 和抗菌性,可以有效地免受噬菌体和其他菌株的污染<sup>[33, 34]</sup>,从而显著减少了发酵过程中 pH 中和剂和抗生素的使用,同时也可以简化羧酸的提纯工艺,进而大幅降低产品的生产成本,提升了酿酒酵母的工业生产性能<sup>[35]</sup>。但是利用酿酒酵母进行发酵生产琥珀酸的浓度并不是很高。通过代谢工程策略得到的菌株 *S. cerevisiae* SUC-297,经补料分批发酵后琥珀酸产量和得率分别为  $43.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.45 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  葡萄糖<sup>[36]</sup>。

大肠杆菌属于革兰氏阴性菌,兼性厌氧,具有明显的遗传特征、易进行基因操作、对培养基要求较少并且能快速繁殖,这些特性使得大肠杆菌成为了高产琥珀酸的理想菌种<sup>[37]</sup>。目前,通过基因工程改造已经构建出不同的琥珀酸生产菌株,例如, *E. coli* AFP111、*E. coli* HX024 和 *E. coli* KJ060 等。

表 1-1 琥珀酸的生产菌株  
Table 1-1 Strains for succinic acid production

微生物	琥珀酸( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	碳源	得率( $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	生产强度( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	参考文献
<i>A. succinogenes</i> 130Z	34.2	葡萄糖	0.55	0.58	[38]
<i>A. succinogenes</i> FZ6	60.2	葡萄糖	1.14	1.30	[39]
<i>A. succinogenes</i> FZ53	105.8	葡萄糖	1.21	1.36	[26]
<i>A. succiniproducens</i> ATCC 29305	15.3	葡萄糖	1.37	1.46	[40]
<i>M. succiniciproducens</i> LPK7	52.4	葡萄糖	1.16	1.8	[27]
<i>M. succiniciproducens</i> PALK-CgMDH	134.25	葡萄糖	1.25	21.3	[18]

表 1-1 琥珀酸的生产菌株(续表)  
Table 1-1 Strains for succinic acid production (continued)

微生物	琥珀酸(g·L <sup>-1</sup> )	碳源	得率(mol·mol <sup>-1</sup> )	生产强度(g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	参考文献
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> ATCC 29035	35	葡萄糖	-	-	[30]
<i>C. glutamicum</i> MB001ΔcrtYEB	152.2	葡萄糖	1.67	1.11	[32]
<i>C. glutamicum</i> R AldhA-pCRA717	146	葡萄糖	1.40	3.17	[41]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	133.8	葡萄糖	1.67	2.53	[20]
<i>E. coli</i> AFP111	99.2	葡萄糖	1.10	1.31	[42]
<i>E. coli</i> HX024	96	葡萄糖	1.36	-	[43]
<i>E. coli</i> KJ060	86.5	葡萄糖	1.41	0.90	[44]
<i>E. coli</i> NZN111	105.13	木薯淀粉 和生木薯	1.19	2.45	[45]
<i>E. coli</i> AS1600a	84.7	甘油	0.70	1.12	[46]
<i>Y. lipolytica</i>	160.2	粗甘油	0.40	0.40	[12]
<i>S. cerevisiae</i> SUC-297	43.0	葡萄糖	-	0.45	[36]

### 1.2.2 微生物生产琥珀酸的适应性进化策略

适应性进化是通过特定的选择性压力, 利用菌株对周围环境的自适应性, 在众多菌株中筛选出所需要的突变表型的高效菌株筛选方法<sup>[47]</sup>, 其在菌株选育和生物进化研究中具有广泛的应用。*E. coli* 具有数量大, 传代速度快和适应环境能力强(即鲁棒性强)等特点, 可以快速筛选出适应选择性压力并达到生长稳定期的优势菌株; 对于那些不能快速适应周围环境的劣势菌株, 由于其生长缓慢很快就被优势菌株淘汰<sup>[48, 49]</sup>。例如, 钠是保持细胞正常生理特性的关键元素<sup>[50]</sup>, 它能够促进微生物的正常发育<sup>[51]</sup>, 并在维持微生态系统<sup>[52]</sup>、ATP 生成<sup>[53]</sup>等方面发挥着至关重要的作用。然而, 随着钠的含量增加, 会导致培养基渗透压增加, 从而抑制微生物的正常发育, 对微生物的生长代谢造成不利的影响<sup>[54]</sup>。利用氯化钠为渗透压调节剂, 通过不断提高培养基中氯化钠的浓度对 *E. coli* AFP111 进行适应性进化, 最终获得了一种生产菌株 *Escherichia coli* XB4, 这种菌株能够承受高渗透压, 并且能够生产出较高浓度的琥珀酸, 与出发菌株相比, 它的产量和生产强度都有所提升, 分别达到了 69.50 g·L<sup>-1</sup>、1.81 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, 分别提高了 18.60% 和 20.00%。另外, 在厌氧条件下, 随着有机酸浓度的增加活细胞数量逐渐降低, 观察到 *E. coli* 的琥珀酸生产能力下降, 通过适应性进化可以减少高有机酸浓度对细胞的损害, 以增加 *E. coli* 的琥珀酸生产能力<sup>[55]</sup>。

随着科学技术的不断进步, 将适应性进化与基因组学分析相结合<sup>[56, 57]</sup>, 我们能够更加清晰地观察到突变菌株的基因组变化, 这不仅为基因学研究带来了新的突破, 而且也

为研究菌株系统生物学提供了更多的可能性。

### 1.2.3 微生物生产琥珀酸的诱变育种策略

微生物诱变育种是一种常见的菌株选育方法，由于自然进化的自发突变率低、耗时长、效率低，因此微生物诱变育种被广泛用于提高突变率和筛选效率<sup>[58]</sup>，诱变方式主要包括化学诱变和物理诱变两种。化学诱变是采用各种化学试剂实现，主要包括能够引起基因突变的烷化剂、吡啶色素、亚硝基胍和吡啶橙等；物理诱变是采用不同的物理射线实现，主要包括紫外线、 $\gamma$ 射线和 X 射线等。通常研究者们同时使用不同的诱变方法来提高诱变效率，例如，利用紫外线和亚硝基胍的组合诱变后选育得到米曲霉诱变菌株 ASC-5，其琥珀酸产量是出发菌株、单用紫外线诱变后菌株的 371 倍、13.43 倍<sup>[59]</sup>；利用紫外线-亚硝基胍-吡啶黄三种方式进行复合诱变，最终筛选得到菌株 *A. succinogenes* F3-21，其琥珀酸产量达到  $87.60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，比出发菌株提高 30.00%<sup>[60]</sup>。

常压室温等离子(ARTP)诱变技术是一种新型的诱变方式，其具有突变率高、环境友好、安全性高等特点，该技术现已广泛应用于细菌、真菌和酵母等多种微生物的诱变选育<sup>[61]</sup>。例如，利用 ARTP 诱变技术对菌株 *E. coli* AFP111 进行诱变筛选，最后得到一株可以利用木糖生产琥珀酸的菌株，胞内 ATP 浓度提高了 1.33 倍，也提高了菌株在厌氧条件下的生长速度<sup>[62]</sup>；另外，通过 ARTP 和  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线两种诱变方式对菌株 *E. coli* FMME-N 进行复合诱变，最终筛选出耐高渗的突变菌株 *E. coli* FMME-N-2，琥珀酸产量、得率以及生产强度比出发菌株分别为  $51.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.07 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  葡萄糖和  $0.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，分别比出发菌株提高了 45.50%、12.90%和 51.70%<sup>[63]</sup>。

### 1.2.4 微生物生产琥珀酸的发酵优化策略

微生物生产琥珀酸的发酵优化策略主要包括：底物的选择、pH 中和剂的选择、相容性物质的外源添加和发酵过程的精确控制等。

(1) 底物的选择：原料成本是决定产品生产成本的关键，因此，显著降低产品生产成本的一种方法是通过利用廉价的生物质原料进行琥珀酸生产<sup>[64]</sup>，生物质原料主要包括：甘油、云杉木屑水解液、蔗渣水解液、玉米水解液和山梨糖醇等。其中甘油、山梨糖醇等碳源还能提供还原力<sup>[65]</sup>，有利于琥珀酸等还原产物的发酵生产<sup>[66]</sup>。例如，通过代谢工程改造和适应性进化策略构建的工程菌株 *E. coli* AS1600a 是一种能够从甘油中生产琥珀酸的菌株，它的琥珀酸产量和得率分别达到  $84.70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.90 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[46]</sup>。另外，菌株 *E. coli* SD121 以玉米秸秆水解物为发酵原料采用两阶段发酵，最终琥珀酸产量和得率分别达到  $57.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.87 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[67]</sup>；粗木薯粉也可作为一种廉价的琥珀酸生成原料，以木薯淀粉和生木薯代替葡萄糖为原料，利用菌株 *E. coli* NZN111 生产琥珀酸，经两段发酵后琥珀酸产量和得率分别达到  $127.13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.86 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[45]</sup>。

(2) pH 中和剂的选择：pH 作为发酵过程的关键参数，对微生物发酵至关重要，大多数微生物只有在接近中性 pH 的环境下才能获得最优的发酵性能。为了保证微生物发酵的顺利进行，需要使用 pH 中和剂以维持发酵液的 pH 值。值得注意的是，在 PEP 在羧

化成 OAA 时会伴随着一分子  $\text{CO}_2$  吸收。在琥珀酸生产阶段  $\text{CO}_2$  的供给不足会导致琥珀酸产量下降, 杂酸积累, 所以保证  $\text{CO}_2$  的供给是提高琥珀酸产量的关键<sup>[68]</sup>。碳酸盐作为一种有效的 pH 中和剂, 能够有效地中和发酵过程中产生的酸, 从而释放出大量的  $\text{CO}_2$ , 为琥珀酸的合成提供必要的条件<sup>[25]</sup>。常用的碳酸盐主要包括  $\text{MgCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  的一种或多种的混合<sup>[69]</sup>。选择合适的中和剂可以有效地提高菌株 *E. coli* AFP184 的琥珀酸产量, 具体而言, 当选择  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  作为 pH 中和剂时, 可以获得更高的琥珀酸产量, 最终琥珀酸产量为  $77.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 当选择  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$  作为 pH 中和剂时, 则会导致菌体的生长受阻, 琥珀酸产量仅为  $40.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[55]</sup>。相似地,  $\text{MgCO}_3$  也是一种有效的 pH 中和剂, 在菌株 *A. succinogenes* NJ113 发酵过程中, 当  $\text{MgCO}_3$  作为 pH 中和剂时, 可以促进细胞生长和琥珀酸生产, 而  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $\text{CaCO}_3$  和  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$  会导致琥珀酸产量降低。另外, 通过  $\text{NaOH}$  和  $\text{MgCO}_3$  来调节 pH 时, *A. succinogenes* ATCC 55618 的琥珀酸产量达到  $59.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 这不仅有效抑制了细胞絮凝, 还促进了琥珀酸的生产<sup>[70]</sup>; 在 *E. coli* WS100 发酵过程中使用  $\text{KOH}$  和  $\text{K}_2\text{CO}_3$  的混合液作为 pH 中和剂发酵, 琥珀酸产量、生产强度、转化率分别为  $70.13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、 $0.76 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[71]</sup>。

在琥珀酸发酵中, pH 还通过影响  $\text{CO}_2$  在发酵液中的溶解度及发酵液中碳酸的电离程度, 来影响菌体对  $\text{CO}_2$  的摄取利用。琥珀酸发酵的 pH 最适范围为 6.2~7.2, 在此 pH 范围下菌体的生长以及产酸能力较强<sup>[55, 70]</sup>。例如, 在产琥珀酸放线杆菌生产琥珀酸过程中, 当 pH 值为 6.5 时, 通过向发酵液中供应  $\text{CO}_2$ , 琥珀酸的得率提高至  $0.88 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 但是当 pH 值为 6.2 时, 不管是否向发酵液中供应  $\text{CO}_2$ , 琥珀酸的得率都没有明显变化<sup>[72]</sup>。

(3) 相容性物质的外源添加: 在有机酸发酵过程中, 随着有机酸浓度的提高, 发酵液 pH 逐渐降低, 为了维持发酵液的 pH 值需要添加碱用来中和生成的酸, 以营造适合菌体生长代谢的中性环境, 这造成发酵液的渗透压不断升高。单位细胞的琥珀酸生产能力会因为渗透压的升高而逐渐下降, 这是菌体活力下降或者菌体死亡的结果<sup>[69]</sup>。相容性溶质是一种高浓度积累于细胞中, 可使维持细胞的稳定, 胞内相容性溶质的积累对提高细胞克服高渗环境具有重要作用, 在高渗透压条件下, 相容性溶质可以维持胞内 DNA 和蛋白质等大分子活力, 从而帮助微生物抵御更加恶劣的环境。海藻糖、甜菜碱、氨基酸等是常用的相容性物质, 其中甜菜碱、氨基酸等以提高细胞内水活度, 使细胞的体积和膨压达到正常水平, 促进细胞生长和琥珀酸生产<sup>[73]</sup>。例如, 甜菜碱的加入不管是在有氧还是厌氧阶段都可以加快葡萄糖的消耗速率<sup>[55, 69]</sup>, 从而大肠杆菌的生长速度提高了 35.29%; 另外, 在高渗条件下添加脯氨酸, 产琥珀酸放线杆菌的琥珀酸产量提高了 22%<sup>[74]</sup>; 与脯氨酸相同, 在高渗条件下添加甲硫氨酸, 琥珀酸产量和菌体浓度分别提高了 102% 和 56%<sup>[73]</sup>。

(4) 发酵过程的精确控制: 发酵方式对实现生物生产的高产量、高生产效率和 high 转化率有关键作用, 其中底物浓度和控氧方式至关重要。底物浓度过高可能阻碍细胞生长和产物生成, 因此流加补料是琥珀酸发酵中常见的补料方式<sup>[75]</sup>。例如, 当培养基中葡萄糖浓度高于  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 琥珀酸产量与菌种的 OD 值都会随葡萄糖浓度的增加而减少, 这表明, 当葡萄糖浓度过高时, 细胞的生长因渗透压过高而开始减弱<sup>[76]</sup>。不同生产琥珀

酸菌株需要与之对应的控氧方式，主要采用三种不同的控氧方式：有氧、厌氧和两阶段控氧方式，例如，解脂耶氏酵母和一些重组 *E. coli*<sup>[77]</sup>能在有氧条件下高效生产琥珀酸；产琥珀酸放线杆菌和多数 *E. coli* 可以通过厌氧或两阶段发酵方式生产琥珀酸，当菌株 *E. coli* AFP111(pTrc99A-*pyc*)采用两阶段发酵方式时，在调整好有氧阶段的溶氧条件及转厌氧方式后，最终琥珀酸产量、生产强度和得率都达到最高水平，分别达到  $99.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  和  $1.10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[42]</sup>。

另外，在低曝气实验中发现 *E. coli* 的琥珀酸产量和得率方面均有较好的效果，这很可能是由于细胞在切换到完全厌氧环境之前经历了微有氧阶段，此阶段可以促进细胞通过表达厌氧生产阶段所需的蛋白来调整它们的酶机制，使它们成为更好的生物催化剂<sup>[78]</sup>。值得注意的是，有氧阶段诱导的酶可以在厌氧阶段保持其活性，并显著影响厌氧阶段琥珀酸发酵，有氧阶段的细胞生长对于提高酶表达是必不可少的，而细胞生长直接受葡萄糖补加的影响，例如，以菌株 *E. coli* AFP111( $\Delta\text{ldhA}$ ,  $\Delta\text{pflB}$ ,  $\Delta\text{ptsG}$ )为生产菌株进行琥珀酸发酵，在有氧阶段通过三种不同的葡萄糖补加方式进行发酵，测试了有氧阶段细胞的生长速度和厌氧阶段琥珀酸生产情况，结果表明，当菌体在有氧阶段的生长速率控制在一定水平时( $0.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )，琥珀酸产量和生产强度达到最高，分别为  $101.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.89 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>[79]</sup>。



图 1-2 发酵优化策略汇总

Fig. 1-2 Summary of fermentation optimization strategies

### 1.3 代谢工程改造大肠杆菌生产琥珀酸的研究进展

### 1.3.1 重构琥珀酸合成路径

在 *E. coli* 的代谢途径中, 有机酸的生物合成途径相当复杂, 合成琥珀酸的代谢路径主要有 3 条: (1) 在厌氧条件下较为活跃的还原性三羧酸(r-TCA)循环, r-TCA 循环是 *E. coli* 合成琥珀酸的最主要途径, 葡萄糖通过糖酵解转化成 PEP 后, 再经 r-TCA 转化成琥珀酸。1 mol 葡萄糖代谢生成 2 mol PEP 后能产生 2 mol NADH, 1 mol PEP 转化为 1 mol 琥珀酸需要消耗 2 mol NADH, 因此, r-TCA 循环不足以满足琥珀酸生产的需要, NADH 的缺乏会影响琥珀酸的生产<sup>[66]</sup>; (2) 在好氧条件下较为活跃的乙醛酸循环, 可以催化 1 mol OAA 和 2 mol 乙酰辅酶 A 转化成 1 mol 琥珀酸和 1 mol 苹果酸, 1 mol 苹果酸随后消耗 1 mol NADH 转化成 1 mol 琥珀酸, 每生成 1 mol 琥珀酸仅需要 0.5 mol NADH<sup>[80]</sup>; (3) 氧化性三羧酸(TCA)循环, 1 mol 葡萄糖代谢生成 2 mol PEP 后能产生 2 mol NADH, 2 mol PEP 经 TCA 循环生成 1 mol 琥珀酸, 并生成 2 mol ATP 和 3 mol NADH。研究表明, 当流向 r-TCA 和 TCA 循环中的碳通量分别达到 71.4%和 28.6%时, 琥珀酸可以达到最大理论得率  $1.71 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ <sup>[81]</sup>。

### 1.3.2 敲除竞争代谢路径

在厌氧条件下, *E. coli* 发酵生产琥珀酸的同时伴随乳酸、乙酸、甲酸和乙醇生成。当电子传递链不能将糖酵解途径产生的 NADH 氧化成  $\text{NAD}^+$  时, 乙酸和丙酮酸等则作为氧化剂生成乙醇和乳酸等副产物, 副产物的生成除了竞争碳流外, 还会额外消耗 NADH<sup>[19]</sup>。为了降低副产物的生成, 采用的策略主要是通过代谢工程策略阻断副产物合成路径。例如, 以野生型 *E. coli* W 为出发菌株, 在敲除了乳酸脱氢酶基因(*ldhA*)、乙醇脱氢酶基因(*adhE*)、丙酮酸甲酸裂解酶基因(*pflB*)、丙酮酸氧化酶基因(*poxB*)和乙酸激酶基因(*ackA*), 构建了菌株 *E. coli* WS100, 该菌株的琥珀酸产量和生产强度分别达到  $70.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 发酵液中副产物浓度低, 乙酸浓度和乳酸浓度分别为  $5.34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 无甲酸和乙醇生成<sup>[71]</sup>。另外, 在菌株 *E. coli* AFP111( $\Delta\text{ldhA}$ ,  $\Delta\text{ptsG}$ ,  $\Delta\text{pflB}$ )中敲除乙酸合成路径基因(*tdcDE* 和 *ackA-pta*)后构建出发菌株 *E. coli* SX03, 琥珀酸的产量和得率都有所提升, 分别达到了  $98.90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 乙酸浓度也下降了 75.80%<sup>[82]</sup>; 此外, 工程菌株 *E. coli* YJ003( $\Delta\text{ldhA}$ ,  $\Delta\text{ptsG}$ ,  $\Delta\text{ackA-pta}$ )的琥珀酸产量为  $150.78 \text{ mM}$ , 比野生型对照菌株 DY329 高 5 倍( $25.13 \text{ mM}$ ), 副产物乳酸、乙酸、富马酸和乙醇浓度都减少<sup>[83]</sup>。

值得注意的是, 虽然通过敲除竞争代谢路径可以有效减少副产物的积累, 但也会引起细胞生长受阻、代谢流失衡和氧化还原不平衡等问题。例如, 敲除五个基因后的菌株 *E. coli* WS100 在发酵初期生长速度变慢<sup>[71]</sup>, 很难使菌株保持原有的生长情况; 另外, 敲除 *ldhA* 和 *pflB* 基因的菌株 *E. coli* NZN111 由于氧化还原失衡而丧失了利用葡萄糖厌氧发酵能力<sup>[84]</sup>。在敲除特定基因后进行代谢进化, 选育出生长速度恢复的菌株是一种较为有效的策略<sup>[7]</sup>。

## 1.3.3 强化琥珀酸合成路径

除敲除竞争代谢路径外，强化琥珀酸合成路径也是提高琥珀酸生产能力的一种重要策略。强化琥珀酸合成路径主要包括两个方面：

(1)调控琥珀酸代谢路径中的关键酶。通过表达琥珀酸生成路径中关键的羧化酶，可以有效地促进琥珀酸的生成，其中 PEP 羧化酶(PPC)和 PEP 羧激酶(PCK)是催化 PEP 转化为 OAA 的两种关键酶，它们能够有效地将碳代谢流集中转移到 r-TCA 循环，从而实现琥珀酸的高效生产。例如，在菌株 *E. coli* JCL1208 中过表达 PEP 羧化酶基因 *ppc*，琥珀酸产量和转化率分别提高了 3.50 倍和 3.75 倍<sup>[85]</sup>。另外，PCK 具有显著的能量优势，它可以比 PPC 产生更多的 ATP，这使得 PCK 更能促进菌株的琥珀酸生产<sup>[86]</sup>。例如，在菌株 *E. coli* AD32( $\Delta dhA$ ,  $\Delta pflB$ ,  $\Delta ptsG$ )中过表达 *pck* 基因，发现能同时提高菌体生长速率和琥珀酸的产量及得率<sup>[87]</sup>；另外，菌株 *E. coli* KJ073 在分别敲除四种羧化酶基因 *ppc*, *pck*, *maeA*, *maeB* 后，*pck* 基因的缺失对琥珀酸产量、菌株生长和葡萄糖代谢的抑制最为显著，随后在敲除 *ppc* 基因的菌株中过表达 *pck* 基因，发现 PCK 能弥补 PPC 的羧化能力，并能提高菌株的琥珀酸酸生产能力<sup>[88]</sup>。

(2)过量表达外源酶基因。通过引入外源基因可以构建出新的羧化途径，从而有效地将代谢流聚焦在琥珀酸的生成上，进而大幅提升琥珀酸的生成。在 *E. coli* 中表达外源丙酮酸羧化酶基因 *pyc*，促进了琥珀酸的生成，同时减少了副产物的积累<sup>[89]</sup>。例如，在菌株 *E. coli* NZN111( $\Delta dhA$ ,  $\Delta pfl$ )与 *E. coli* AFP111 中均通过对源自 *Rhizobium etli* 的 *pyc* 基因的异源表达，不仅可以有效抑制丙酮酸积累，还可以激活乙醛酸途径，从而使得该菌株的琥珀酸产量、转化率和细胞生长速率得到显著提高<sup>[81]</sup>。另外，在菌株 *E. coli* SB202( $\Delta dhA$ ,  $\Delta pfl$ )中异源表达高粱 *ppc* 基因可使琥珀酸产量和得率分别提高了 47%、50%<sup>[90]</sup>。同样地，在菌株 *E. coli* K-12 *ppc* 中，通过异源表达来自 *A. succinogenes* 的 *pck* 基因，使得琥珀酸的产量大幅增加，达到了原本的 6.5 倍<sup>[86]</sup>。

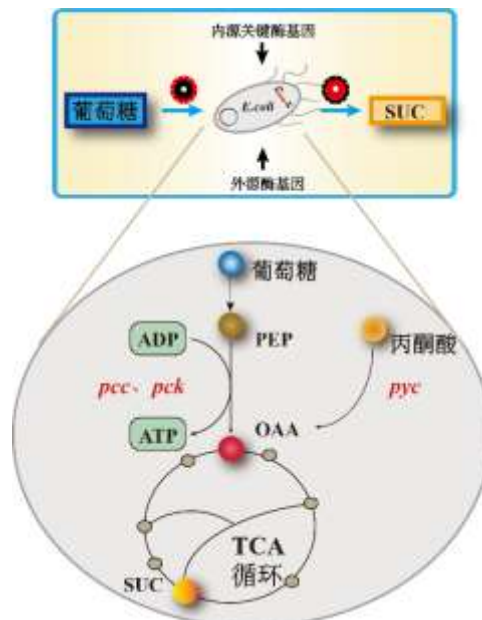


图 1-3 强化琥珀酸合成路径

Fig. 1-3 Enhancing succinic acid synthesis pathway

### 1.3.4 调控辅因子代谢

微生物胞内存在氧化还原与能量平衡,这种平衡建立在  $\text{NAD(P)}^+$ 、 $\text{NAD(P)H}$ 、 $\text{ATP}$  和  $\text{ADP}$  等辅因子的浓度上。当使用代谢工程技术对细菌胞内代谢路径进行改造后,会造成辅因子含量及比例的变化,从而进一步影响菌株的生长速度和新陈代谢。与 *E. coli* 生产琥珀酸相关的辅因子代谢调控主要包括两方面:

(1)调控  $\text{NADH}$  的供应。*E. coli* 在厌氧条件下通过 r-TCA 循环生产琥珀酸的主要障碍是  $\text{NAD(H)}$  的限制,可以通过代谢工程策略改造 *E. coli* 以提供更多的  $\text{NAD(H)}$  促进琥珀酸生产。例如,通过从 *E. coli* 中异源表达博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*) $\text{NAD}^+$  依赖的甲酸脱氢酶基因 *fdh*, 在 *E. coli* 胞内再生  $\text{NADH}$ , 从而琥珀酸产量和得率分别提高至  $20.29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.75 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 副产物甲酸的浓度降低至  $0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[91]</sup>。另外,在将磷酸戊糖途径进行优化后,通过提高  $\text{NADH}$  转氢酶的表达促进  $\text{NADPH}$  转化为  $\text{NADH}$ , 从而提高胞内  $\text{NADH}$  的含量,最终得到菌株 *E. coli* SUC-P02, 琥珀酸产量和得率分别提高至  $45.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.62 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  葡萄糖<sup>[92]</sup>。除了直接提高  $\text{NADH}$  生成外,也可以通过减少  $\text{NADH}$  消耗来提高胞内  $\text{NADH}$  含量。例如,在菌株 *E. coli* MG1655 中首先敲除了 *adhE*、*ldh*、*pta-ack* 这些竞争性代谢路径上的关键基因,随后又敲除了编码 *aceBAK* 操纵子阻遏物的基因 *iclR*, 激活了 *E. coli* 中的乙醛酸循环,构建出菌株 *E. coli* SBS550MG, 减少了  $\text{NADH}$  的消耗,琥珀酸得率和生产强度分别为  $1.10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  和  $1.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ <sup>[93]</sup>。值得注意的是,敲除了 *ldhA* 和 *pflB* 基因的菌株 *E. coli* NZN111, 使得  $\text{NAD}^+$  的再生受到影响,从而细胞内辅因子的平衡受到破坏,在厌氧条件下无法正常地通过葡萄糖来维持其正常的代谢活动<sup>[81, 84]</sup>, 为了解决这个问题,在菌株 *E. coli* NZN111 中过表达 *mdh* 基因,提高其  $\text{NAD}^+$  的生成,构建了菌株 *E. coli* NZN111/pTrc99A-*mdh* 恢复了厌氧条件下对葡萄糖的利用能力,摇瓶发酵时可利用  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖产生  $0.55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的琥珀酸<sup>[94]</sup>。

(2)调控  $\text{ATP}$  的供应。 $\text{ATP}$  在代谢合成和细胞维持中起着关键的作用。例如,在 *ldhA*、*pflB* 和 *ptsG* 三基因敲除 *E. coli* 中过表达琥珀酸放线菌中与  $\text{ATP}$  形成相关的 *pck* 基因,在促进琥珀酸生产的同时也提高了生物量<sup>[87]</sup>。但是过多的  $\text{ATP}$  会抑制 *E. coli* 在厌氧条件下的菌体生长和琥珀酸生产,通过在 *E. coli* 中过表达编码磷酸烯醇式丙酮酸合成酶基因 *ppsA*, 引入  $\text{ATP}$  无效循环来降低  $\text{ATP}$  水平,从而提高琥珀酸的产量,比之对照菌株 YL104 提高了 39%<sup>[95]</sup>。这说明  $\text{ATP}$  的供应需要经过调控,将其含量控制在一个相对合适的水平才可以促进 *E. coli* 生产琥珀酸。

## 1.4 本论文的立题依据与意义

### (1) 立题依据

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>[4]</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>[16]</sup>、产琥珀酸曼氏杆菌(*Mannheimia*



*succiniciproducens*)<sup>[17]</sup>、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[21]</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>[96]</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)、乙醛酸途径和氧化三羧酸途径(tricarboxylic acid pathway, TCA)。其中 r-TCA 因受到胞内辅因子含量的限制，琥珀酸的得率为 1 mol·mol<sup>-1</sup> 葡萄糖<sup>[66]</sup>；乙醛酸循环中琥珀酸得率为 1.25 mol·mol<sup>-1</sup> 葡萄糖<sup>[66]</sup>，但是在厌氧条件下，乙醛酸途径与 r-TCA 途径结合，可将理论得率提高到 1.71 mol·mol<sup>-1</sup> 葡萄糖<sup>[81, 93]</sup>；有氧条件 TCA 途径的理论得率为 1.00 mol·mol<sup>-1</sup> 葡萄糖<sup>[97]</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；(2)提高 ATP 供给；(3)平衡 NADH/NAD<sup>+</sup>比值和 ATP 水平。然而，上述策略研究工作仅通过单独提高辅因子(NADH 和 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，显著降低了琥珀酸得率，增加了琥珀酸的生产与下游提取成本<sup>[98, 99]</sup>。基于上述分析，本文在进行琥珀酸生产化学计量学分析的基础上，借助代谢工程策略组合调控 ATP 与 NADH 含量，促进琥珀酸生产，最后通过优化发酵条件，提高菌株的琥珀酸生产能力。

## (2) 研究意义

本研究根据不同发酵条件下琥珀酸产量和化学计量学分析，人工调控了 *E.coli* 中与 ATP 和 NADH 合成相关的基因，优化了胞内 ATP 与 NADH 含量，促进琥珀酸的生产，为二元酸或其他有机酸的生产提供了一个绿色且易操作的策略。有机酸代谢过程中碳原子的充分利用，可以进一步促进目的产物产量，具有极大的应用潜力。因此，本研究是利用葡萄糖生产高附加值化学品的有力佐证，不仅有助于开发高性能细胞工厂，为工业化生产奠定基础，还有利于引导绿色技术创新，为解决碳达峰和碳中和的实现路径问题提供参考。

## 1.5 本论文的研究内容

本论文基于化学计量分析，通过加强或阻断相关途径，调整胞内 ATP 和 NADH 含量。其次，结合 RBS 优化与代谢工程两种策略，优化 ATP 和 NADH 含量，促进琥珀酸生产。最后，通过发酵优化，提高琥珀酸产量。具体的研究内容如下：

(1) 化学计量分析琥珀酸生产情况：首先，测试菌株 *E. coli* FMME-N-26 在不同发酵条件下的产酸情况，研究菌株在琥珀酸生产过程中的能量与辅因子需求。其次，基于化学计量分析，探究不同发酵条件下对应的琥珀酸生成时 NADH 与 ATP 的生产情况。

(2) 代谢工程改造促进琥珀酸生产：首先，通过对不同基因的改造，调整菌株 *E. coli* FMME-N-26 胞内 ATP 和 NADH 含量提高琥珀合成；其次，借助基因敲除、基因过表达、RBS 优化等代谢工程策略，进一步优化胞内 ATP 和 NADH 含量，促进菌株的琥珀酸生产。

(3) 发酵优化促进琥珀酸生产：首先，通过优化玉米浆种类与浓度、pH 中和剂，优

化发酵工艺，降低发酵成本。其次，通过优化发酵液中的葡萄糖浓度，提高菌株琥珀酸生产能力。最后，进行发酵体系放大，将上述最优发酵控制条件放大至 1000 L 发酵罐，验证菌株工业化潜力。

## 第二章 材料和方法

## 2.1 菌株和质粒

本研究所使用的菌株和质粒见表 2-1，本研究中所用引物见表 2-2。

表 2-1 本研究所用的菌株与质粒

Table 2-1 Plasmids and strains used in this study

菌株/质粒	特性	来源
质粒		
pCas	pMB1 ori, Kan, Pcas-cas9, ParaB-Red, P <sub>trc</sub> -sgRNA	本研究室
pTargetF	pMB1 ori, SpeR, PJ23119 promoter	本研究室
pJ01	pMB1 ori, AmpR, PJ23119 promoter	[100]
pQE- <i>Aspck</i>	pMB1 ori, KanR, T5 promoter	[101]
pJ01-119- <i>Glf-k-AroG-ktkA</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119 promoter	本研究室
pCDR-A	pBR322 ori, AmpR, P <sub>trc</sub> promoter	本研究室
pJ01- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>Zmglf</i>	本研究构建
pJ01- <i>pgm</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i>	本研究构建
pJ01- <i>Aspck</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>Aspck</i>	本研究构建
pJ01-RBS0034(H)- <i>pgm</i> -RBS0034(H)- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0034, RBS0034	本研究构建
pJ01-RBS0034(H)- <i>pgm</i> -RBS0031(M)- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0034, RBS0031	本研究构建
pJ01-RBS0034(H)- <i>pgm</i> -RBS0011(L)- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0034, RBS0011	本研究构建
pJ01-M- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0031, RBS0034	本研究构建
pJ01-M- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0031, RBS0031	本研究构建
pJ01-M- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0031, RBS0011	本研究构建
pJ01-L- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>Zmglf</i> , RBS0011, RBS0034	本研究构建

表 2-1 本研究所用的菌株与质粒(续表)

Table 2-1 Strains and plasmids used in this study (continued)

菌株/质粒	特性	来源
pJ01-L- <i>pgm</i> -M- <i>ZmgI</i> f	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>ZmgI</i> f, RBS0011, RBS0031	本研究构建
pJ01-L- <i>pgm</i> -L- <i>ZmgI</i> f	pMB1 ori, AmpR, PJ23119, <i>pgm</i> , <i>ZmgI</i> f, RBS0011, RBS0011	本研究构建
pCDR-A- <i>gapA</i>	CloDF13 ori, SpeR, PJ23119, <i>gapA</i>	本研究构建
pCDR-A- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, SpeR, PJ23119, <i>pncB</i>	本研究构建
pCDR-A-H- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0034, RBS0034	本研究构建
pCDR-A-H- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0034, RBS0031	本研究构建
pCDR-A-H- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0034, RBS0011	本研究构建
pCDR-A-M- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0031, RBS0034	本研究构建
pCDR-A-M- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0031, RBS0031	本研究构建
pCDR-A-M- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0031, RBS0011	本研究构建
pCDR-A-L- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0011, RBS0034	本研究构建
pCDR-A-L- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0011, RBS0031	本研究构建
pCDR-A-L- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>	CloDF13 ori, AmpR, PJ23119, <i>gapA</i> , <i>pncB</i> , RBS0011, RBS0011	本研究构建
pTargetF- <i>poxB</i>	pMB1 ori, SpeR, PJ23119, <i>poxB</i> -N20	本研究构建
菌株		
<i>E. coli</i> JM109	General cloning host	Takara Bio
FMME-N	Wild type screened from rumen of camel (preservation number, CCTCCM2018568)	本研究室
FMME-N-1	After ARTP mutagenesis breeding from FMME-N	本研究室
FMME-N-2	After 60Co- $\gamma$ irradiation mutagenesis breeding from FMME-N-1	本研究室

表 2-1 本研究所用的菌株与质粒(续表)

Table 2-1 Strains and plasmids used in this study (continued)

菌株/质粒	特性	来源
FMME-N-26	FMME-N-2 $\Delta pflB$ - <i>focA</i> $\Delta ldhA$ $\Delta pta$ $\Delta tdcD$ $\Delta tdcE$	本研究室
FW-1	FMME-N-26-PJ01- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-2	FMME-N-26-PJ01- <i>pgm</i>	本研究构建
FW-3	FMME-N-26-PJ01- <i>Aspck</i>	本研究构建
FW-4	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i>	本研究构建
FW-5	FMME-N-26- $\Delta adhE$	本研究构建
FW-6	FMME-N-26-pCDR- <i>gapA</i>	本研究构建
FW-7	FMME-N-26-pCDR- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-8	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-9	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-10	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-11	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-M- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-12	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-M- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-13	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-M- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-14	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-L- <i>pgm</i> -H- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-15	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-L- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-16	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-L- <i>pgm</i> -L- <i>Zmglf</i>	本研究构建
FW-9- $\Delta adhE$	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$	本研究构建
FW-17	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDR-H- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-18	FMME-N-26- $\Delta poxB$ - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta adhE$ -pCDR-H- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	本研究构建

表 2-1 本研究所用的菌株与质粒(续表)

Table 2-1 Strains and plasmids used in this study (continued)

菌株/质粒	特性	来源
FW-19	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR- H- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-20	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR-M- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-21	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR-M- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-22	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR-M- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-23	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR-L- <i>gapA</i> -H- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-24	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR-L- <i>gapA</i> -M- <i>pncB</i>	本研究构建
FW-25	FMME-N-26- $\Delta$ <i>poxB</i> - <i>Aspck</i> -PJ01-H- <i>pgm</i> -M- <i>Zmglf</i> - $\Delta$ <i>adhE</i> -pCDR-L- <i>gapA</i> -L- <i>pncB</i>	本研究构建

表 2-2 本研究所用的引物

Table 2-2 List of primers used in this study

引物	序列(5'-3')
<i>poxB</i> -500-up-F	GCG GCC CGG CTC CGT ATA TG
<i>poxB</i> -500-up-R	CCT CTT TAC TAG TAT TAT ACC TAG GAC TGA GCT AGC TGT CAA GGT TCT CCA TCT CCT GAA TGT G
<i>Aspck</i> -Mid-F	CTC AGT CCT AGG TAT AAT ACT AGT AAA GAG GAG AAA AAG CTT ATG ACT GAC TTA AAC AAA CTC G
<i>Aspck</i> -Mid-R	GAC GGG AAA TGC CAC CCT TTT TAT GCT TTT GGA CCG GCG C
<i>poxB</i> -500-down-F	GCG CCG GTC CAA AAG CAT AAA AAG GGT GGC ATT TCC CGT C
<i>poxB</i> -500-down-R	AAT TCC CAT GCT TCT TTC AGG TAT T
<i>poxB</i> -JP-check-F	ACA ATA TTG CGT GAT CTC TTT CAG T
<i>poxB</i> -JP-check-R	GTG GCA GAA AAT AAC GTT ACC GAA G
<i>poxB</i> -N20-F	TGT CGT GTT ACC AGG CGA CGG TTT TAG AGC TAG AAA TAG CAA GTT

表 2-2 本研究所用的引物(续表)

Table 2-2 List of primers used in this study (continued)

引物	序列(5'-3')
<i>poxB</i> -N20-R	CGT CGC CTG GTA ACA CGA CAA CTA GTA TTA TAC CTA GGA CTG AGC
YZ-S-Ptraget	ACG CGG CCT TTT TAC GGT TCC TGG CCT TTT
<i>adhE</i> -500-up-F	TGC AGG CCG TGC CAG TCA TCC TTC A
<i>adhE</i> -500-up-R	AGT TTA ACA TTA TCA GGA GAG CAT TTC AGT AGC GCT GTC TGG CAA CAT AA
<i>adhE</i> -500-down-F	TTA TGT TGC CAG ACA GCG CTA CTG AAA TGC TCT CCT GAT AAT GTT AAA CT
<i>adhE</i> -500-down-R	AAA ATC AAA AAA GGT CTG AAT CAC G
<i>adhE</i> -JP-check-F	GGC GTT CTG CCG CTT AGT GG
<i>adhE</i> -JP-check-R	CTG CCG CTG TCT GAT AAC TG
<i>adhE</i> -N20-F	GGA CGC CGC GAA GAT CAT GTG TTT TAG AGC TAG AAA TAG CAA GTT
<i>adhE</i> -N20-R	ACA TGA TCT TCG CGG CGT CCA CTA GTA TTA TAC CTA GGA CTG AGC
<i>AspckA</i> -dao-F	GTA AAG AGG AGA AAA AGC TTA TGA CTG ACT TAA ACA AAC TCG TTA AAG AA
<i>AspckA</i> -dao-R	AAT GAT GAT GAT GAT GAT GGT CGA CTT ATG CTT TTG GAC CGG CGC
<i>pgm</i> -dao-F	GTA AAG AGG AGA AAA AGC TTA TGG CAA TCC ACA ATC GTG C
<i>pgm</i> -dao-R	AAT GAT GAT GAT GAT GAT GGT CGA CTT ACG CGT TTT TCA GAA CTT CGC TA
<i>Zmglf</i> -dao-F	GTA AAG AGG AGA AAA AGC TTA TGA GTT CTG AAA GTA GTC AGG GTC
<i>Zmglf</i> -dao-R	AAT GAT GAT GAT GAT GAT GGT CGA CCT ACT TCT GGG AGC GCC ACA
YZ-PJ01-F	AAA ATA GGC GTA TCA CGA GGC A
YZ-PJ01-R	AGG CCC ACC CGA AGG T
<i>gapA</i> -dao-F	GTA AAG AGG AGA AAA AGC TTA TGA CTA TCA AAG TAG GTA TCA ACG GTT TT
<i>gapA</i> -dao-R	TGA TGA TGA TGA TGG TCG ACT TAT TTG GAG ATG TGA GCG ATC AGG

表 2-2 本研究所用的引物(续表)

Table 2-2 List of primers used in this study (continued)

引物	序列(5'-3')
<i>pncB</i> -dao-F	GTA AAG AGG AGA AAA AGC TTA TGA CAC AAT TCG CTT CTC CTG TTC
<i>pncB</i> -dao-R	TGA TGA TGA TGA TGG TCG ACT TAA CTG GCT TTT TTA ATA TGC GGA AGG TC
YZ-pCDR-F	TCA TGA GCC CGA AGT GGC GA
YZ-pCDR-R	CCA AGG TAG TCG GCA AAT AA
<i>pgm</i> -dao-F-0031	GTT CAC ACA GGA AAC CAA GCT TAT GGC AAT CCA CAA TCG TGC
<i>pgm</i> -dao-F-0011	AGT AGG GAC AGG ATA AGC TTA TGG CAA TCC ACA ATC GTG C
<i>pgm</i> -glf-fp-R	TTT TTC TCC TCT TTA CTA GTT TAC GCG TTT TTC AGA ACT TCG CTA
<i>pgm</i> -glf-fp-F	CGC TCC CAG AAG TAG GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT T
<i>pgm</i> -glf-dao-F-0034	AAC TAG TAA AGA GGA GAA AAA GCT TAT GAG TTC TGA AAG TAG TCA GGG TC
<i>pgm</i> -glf-dao-F-0031	CTA GTT CAC ACA GGA AAC CAA GCT TAT GAG TTC TGA AAG TAG TCA GGG TC
<i>pgm</i> -glf-dao-F-0011	AAA CTA GTA GGG ACA GGA TAA GCT TAT GAG TTC TGA AAG TAG TCA GGG TC
<i>pgm</i> -glf-dao-R-0034	TGA TGA TGA TGA TGG TCG ACC TAC TTC TGG GAG CGC CAC A
<i>pgm</i> -glf-dao-R-0031	GGT TTC CTG TGT GAA CTA GTT TAC GCG TTT TTC AGA ACT TCG CTA
<i>pgm</i> -glf-dao-R-0011	CTT ATC CTG TCC CTA CTA GTT TAC GCG TTT TTC AGA ACT TCG CTA
pCDR- <i>pncB</i> -F-0034	CCA CGC GAT CGC TGA CGT CGG TAC CAA AGA GGA GAA ACA CGC GAT GAC AC
pCDR- <i>pncB</i> -F-0031	CCA CGC GAT CGC TGA CGT CGG TAC CTC ACA CAG GAA ACC CAC GCG ATG AC
pCDR- <i>pncB</i> -F-0011	CCA CGC GAT CGC TGA CGT CGG TAC CAG GGA CAG GAT CAC GCG ATG ACA CA



表 2-2 本研究所用的引物(续表)

Table 2-2 List of primers used in this study (continued)

引物	序列(5'-3')
pCDR- <i>pncB</i> -xhoI-R	CGC AGC AGC GGT TTC TTT ACC AGA CTC GAG TTA ACT GGC TTT TTT AAT ATG CGG AA
pCDR- <i>gapA</i> -F-0034	CCA ATT AAG CTT AAA GAG GAG AAA GAA TTC ATG ACT ATC AAA GTA GGT ATC AAC GGT T
pCDR- <i>gapA</i> -F-0031	CCA ATT AAG CTT TCA CAC AGG AAA CCG AAT TCA TGA CTA TCA AAG TAG GT
pCDR- <i>gapA</i> -F-0011	CCA ATT AAG CTT AGG GAC AGG ATG AAT TCA TGA CTA TCA AAG TAG GTA TC
<i>gapA</i> -bglii-R	GCG TGG CCG GCC GAT ATC CAA TTG AGA TCT TTA TTT GGA GAT GTG AGC GAT CAG G

## 2.2 仪器与试剂

### 2.2.1 仪器

本研究中所用仪器如表 2-3 所示:

表 2-3 所用仪器列表

Table 2-3 The list of equipments

仪器名称	公司名称
超声细胞破碎仪	济宁天华超声电子仪器有限公司
真空抽滤机	上海领德仪器有限公司
pH 计	梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司 (METTLER TOLEDO)
M-100 生物分析仪	深圳西尔曼科技有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	苏州纳美瑞电子科技有限公司
振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
恒温培养箱	上海跃进医疗器械有限公司
厌氧培养箱 YQX-II	上海跃进医疗器械有限公司
超净工作台	济南欧莱博科学仪器有限公司
电子天平	广州市怡华新电子仪器有限公司
UltiMate 3000 HPLC	赛默飞世尔科技有限公司
5888R 冷冻离心机	德国艾本德股份公司
5424 台式高速离心机	德国艾本德股份公司
高压蒸汽灭菌锅	德州高通实验仪器有限公司
恒温金属浴	杭州瑞诚仪器有限公司

表 2-3 所用仪器列表(续表)

Table 2-3 The list of equipments (continued)

5 L 发酵罐	上海保兴生物设备工程有限公司
CHB-202 恒温金属浴	日本 Bioer Technology 公司
UVmini-1240 紫外分光光度计	日本 SHIMADZU 公司
C1000 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
GelDoc 凝胶成像系统	美国 Bio-Rad 公司
琼脂糖/SDS-PAGE 电泳仪	美国 Bio-Rad 公司

### 2.2.2 试剂

本研究中所用试剂如表 2-4 所示：

表 2-4 所用试剂列表

Table 2-4 The list of agentias

试剂	来源
限制性核酸内切酶、DNAMarker	ATG
细菌基因组提取试剂盒、细菌质粒提取试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、抗生素、IPTG、阿拉伯糖	上海生工生物工程技术有限公司
ATP、NADH 检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
琥珀酸、甲酸、乙酸、乳酸标样	Sigma 公司
酵母粉、胰蛋白胨	Oxoid 公司
葡萄糖	山东西王糖业有限公司
同盛牌玉米浆	山东同盛生物科技有限公司
宏润牌玉米浆	宏润宝顺北京鸿润宝顺科技有限公司
展旭牌玉米浆	河南展旭食品有限公司
缘肽牌玉米浆	上海缘肽生物技术有限公司
碳酸镁	无锡泽辉化工有限公司
其他所用试剂	国药集团上海化学试剂公司

### 2.2.3 培养基

菌株培养所用培养基及其抗生素见表 2-5。

表 2-5 本研究所用的培养基及其抗生素

Table 2-5 Medium and antibiotics used in this study

培养基	成分
LB 培养基	蛋白胨 10 g·L <sup>-1</sup> , 酵母粉 5 g·L <sup>-1</sup> , 氯化钠 10 g·L <sup>-1</sup>
发酵培养基	葡萄糖 40 g·L <sup>-1</sup> , 玉米浆 7.5 g·L <sup>-1</sup> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3.3 g·L <sup>-1</sup> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.6 g·L <sup>-1</sup> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O 1.4 g·L <sup>-1</sup> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.3 g·L <sup>-1</sup>

表 2-5 本研究所用的培养基及其抗生素(续表)

Table 2-5 Medium and antibiotics used in this study(continued)

培养基	成分
抗生素	氨苄青霉素(Amp), 硫酸卡那霉素(Kan), 大观霉素(Spe)
诱导剂	IPTG, 阿拉伯糖

## 2.3 培养条件

种子培养方法：一级种子培养的方法是先吸取冷冻于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱里的甘油管中菌液  $100\ \mu\text{L}$ ，接种于装有  $25\ \text{mL}$  液体 LB 培养基的  $100\ \text{mL}$  锥形瓶中培养  $8.5\ \text{h}$  (培养条件为  $38^{\circ}\text{C}$ ,  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ )，得到一级种子液；二级种子培养的方法是先吸取  $100\ \mu\text{L}$  一级种子液，接种于装有  $50\ \text{mL}$  液体 LB 培养基的  $500\ \text{mL}$  锥形瓶中培养  $8\ \text{h}$  至对数生长中期(培养条件为  $38^{\circ}\text{C}$ ,  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ )，得到二级种子液。

摇瓶培养方法：有氧培养过程是先将  $8\ \text{mL}$  二级种子培养液接种于装有  $80\ \text{mL}$  液体发酵培养基的  $500\ \text{mL}$  锥形瓶中，锥形瓶用纱布封口，在  $38^{\circ}\text{C}$ ,  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的摇床中培养；厌氧培养过程是先将  $8\ \text{mL}$  二级种子培养液接种于装有  $80\ \text{mL}$  液体发酵培养基的  $100\ \text{mL}$  厌氧瓶中，在  $38^{\circ}\text{C}$ ,  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的摇床中培养；两阶段培养过程是先进行有氧培养  $12\ \text{h}$  后，迅速于无菌操作台中将锥形瓶中发酵液倒入  $100\ \text{mL}$  无菌厌氧瓶中，同时加入  $4\ \text{g}\ \text{MgCO}_3$  转入厌氧培养。三种培养方式的取样量单次不超过装液体积的  $1\%$ ，测定发酵液的 pH 值以及葡萄糖浓度，并通过补加  $800\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$  的葡萄糖维持发酵液的葡萄糖浓度为  $5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，同时添加无菌  $\text{MgCO}_3$  维持发酵液的 pH 在  $6.2$  以上，培养至  $72\ \text{h}$ 。

发酵罐培养方法： $5\ \text{L}$  发酵罐的初始装液量为  $3\ \text{L}$ ，将培养好的二级种子液转接至液体发酵培养基中，接种量为装液量的  $10\%(\text{V}/\text{V})$ ，开始两阶段补料分批发酵，发酵温度为  $38^{\circ}\text{C}$ 。有氧阶段的通气量为  $1.0\ \text{vvm}$ ，初始转速为  $500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、发酵液的初始糖浓度为  $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，通过流加纯氨水维持发酵液的 pH 值为  $7.0$ ，当发酵液的溶氧(Dissolved Oxygen, DO)降至  $15\%$ 时提高转速，最高转速为  $700\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，当 DO 与 pH 突然升高时，开始补加  $800\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$  的葡萄糖，待菌体生长至最适菌体浓度时，关闭通气，转速降至  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，补加  $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KHCO}_3$  使其短时间内产生大量  $\text{CO}_2$  转为厌氧发酵，同时降低葡萄糖补料速率转为厌氧发酵；厌氧阶段的转速为  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，通过控制不同的补料速率维持发酵液的葡萄糖浓度，并利用 pH 中和剂控制发酵液的 pH 为  $6.5$  左右，发酵至  $72\ \text{h}$  结束。 $1000\ \text{L}$  发酵罐的培养方法与  $5\ \text{L}$  发酵罐一致，装液量等比例放大。

## 2.4 分子生物学技术

### 2.4.1 细菌基因组 DNA 的提取

革兰氏阴性细胞基因组提取：将冷冻保藏的菌液经行分离划线活化，活化后挑取单菌落于培养基中培养，将摇瓶置于摇床中培养，用移液器室温吸取  $2\sim 4\ \text{mL}$  菌液，离心

机转速设置为 8000 rpm，离心时间为 5 min，离心后收集沉淀，去上清，然后根据上海捷瑞生物工程有限公司的基因组提取试剂盒购自说明书操作。

#### 2.4.2 PCR 反应及其产物回收

PCR 反应体系如表 2-6 所示。胶回收操作步骤参照胶回收试剂盒说明书进行回收备用。

表 2-6 PCR 反应体系  
Table 2-6 PCR reaction system

试剂	体积( $\mu\text{L}$ )
5×Prime STAR Buffer	40
10×Ex Taq Buffer	20
10×PCR Buffer	20
dNTPs(2.5 mmol/L)	20
上游引物(浓度 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	2
下游引物(浓度 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	2
Prime STAR <sup>®</sup> DNA 聚合酶/ExTaq 酶/rTaq 酶	2
模板	2
ddH <sub>2</sub> O	加至 200

PCR 扩增条件如表 2-7 所示。

表 2-7 PCR 扩增条件  
Table 2-7 PCR amplified condition

条件	时间
95°C 预变性	3 min
95°C 变性	30 s
55°C 退火温度	30 s
72°C 进行延伸	1000 bp/min
循环	×32
72°C 终延伸	10 min

融合 PCR 体系如表 2-8 所示。

表 2-8 融合 PCR 体系  
Table 2-8 Fusion PCR system

试剂	体积( $\mu\text{L}$ )
5×Prime STAR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	40
dNTPs (2.5 mmol·L <sup>-1</sup> )	20
片段 1	8

表 2-8 融合 PCR 体系(续表)

Table 2-8 Fusion PCR system(continued)

试剂	体积( $\mu\text{L}$ )
片段 2	8
片段 3(<500 n g)	8
Prime STAR <sup>®</sup> DNA 聚合酶	2
ddH <sub>2</sub> O	加至 200

### 2.4.3 感受态细胞的制备与转化

(1) 化学转化法: 吸取冷冻于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱里的甘油管中菌液 100  $\mu\text{L}$ , 接种至装有 25 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 在温度  $37^{\circ}\text{C}$ , 转速 200 rpm 条件下培养 12 h, 吸取 1 mL 菌液转接至装有 50 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在温度  $37^{\circ}\text{C}$ , 转速 200 rpm 条件下培养 1 h 左右待菌体  $\text{OD}_{600}$  为 0.4 至 0.6。将菌液倒入无菌 50 mL 离心管中, 冰浴 15-20 min 后, 在  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min, 倒掉上清液。利用冰浴好的 20 mL 1mM  $\text{CaCl}_2$  溶液重悬菌体, 冰浴 15 min, 在  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min, 倒掉上清液, 随后加入 200  $\mu\text{L}$  冰浴好的 30%甘油溶液, 混匀后吸取 100  $\mu\text{L}$  分装于 1.5 mL 无菌离心管中, 速冻在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。取回收产物与感受态细胞混合, 冰浴 10-15 min,  $42^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 90 s, 冰浴 3 min, 添加 800  $\mu\text{L}$  无菌 LB 液体培养基,  $37^{\circ}\text{C}$ 或  $30^{\circ}\text{C}$ 下后培养 1 h 涂布于筛选平板,  $37^{\circ}\text{C}$ 或  $30^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱过夜培养。

(2) 电击转化法: 吸取甘油管中 100  $\mu\text{L}$  菌液接种至装有 25 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中, 在温度  $37^{\circ}\text{C}$ , 转速 200 rpm 条件下培养 12 h, 吸取 1 mL 菌液转接至装有 50 mL 液体 LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在温度  $37^{\circ}\text{C}$ , 转速 200 rpm 条件下培养 1.5 h 待菌体  $\text{OD}_{600}$  为 0.6 左右。电击感受态细胞制备过程均在冰浴条件下进行: 将培养好的菌液转移至 50 mL 无菌离心管中, 冰浴 15-20 min 后, 在  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min, 倒掉上清液。用 20 mL 10%甘油洗涤菌体 2 次, 在  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min, 最后吸取 200  $\mu\text{L}$  10%甘油重悬菌体, 吸取 100  $\mu\text{L}$  分装于 1.5 mL 无菌离心管中, 直接用于电击转化实验。取回收产物与感受态细胞混合, 冰浴 10-15 min, 转移至无菌干燥的电转杯中(直径 1 mm), 置于电转槽中, 在 2200 V、4 ms 的电击条件下进行电击, 电击结束后迅速添加 800  $\mu\text{L}$  无菌 LB 液体培养基混匀后吸入 1.5 mL 离心管中,  $37^{\circ}\text{C}$ 或  $30^{\circ}\text{C}$ 下后培养 1 h 后涂布于筛选平板,  $37^{\circ}\text{C}$ 或  $30^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱过夜培养。

### 2.4.4 质粒提取

细菌质粒 DNA 提取方法参照细菌质粒提取试剂盒相关操作说明。

### 2.4.5 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>[102]</sup>。以 *poxB-N20-F*、*poxB-N20-R* 为引物对, pTargetF 为模板, 进行全质粒 PCR 并胶回收, 再经过同源重组连接并转化至 *E.coli*

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/798116016034006041>