

过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响

苟冬梅¹, 梁丽亚¹, 刘嵘明¹, 张常青¹, 吴明科¹, 马江锋¹, 陈可泉¹, 朱建国^{1,2}, 姜岷¹

¹ 南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

² 常茂生物化学工程股份有限公司博士后科研工作站, 江苏 常州 213034

苟冬梅, 梁丽亚, 刘嵘明, 等. 过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1059–1069.

Gou DM, Liang LY, Liu RM, et al. Effect of overexpression of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1059–1069.

摘 要: 大肠杆菌 NZN111 是敲除了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*) 和丙酮酸-甲酸裂解酶的编码基因 (*pflB*) 的发酵生产丁二酸的潜力菌株。厌氧条件下 NADH 不能及时再生为 NAD⁺, 引起胞内辅酶 NAD(H) 的不平衡, 最终导致厌氧条件下菌株不能利用葡萄糖生长代谢。*nadD* 为催化 NAD(H) 合成途径中烟酸单核苷酸 (NaMN) 生成烟酸腺嘌呤二核苷酸 (NaAD) 的烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶 (Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, NAMNAT) 的编码基因, 通过过量表达 *nadD* 基因能够提高 NAD(H) 总量与维持合适的 NADH/NAD⁺ 比例。文中构建了重组菌 *E. coli* NZN111/pTrc99a-*nadD*, 在厌氧摇瓶发酵过程中通过添加终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 重组菌 *E. coli* NZN111/pTrc99a-*nadD* 中 NAD⁺ 和 NADH 的浓度分别比宿主菌 *E. coli* NZN111 提高了 3.21 倍和 1.67 倍, NAD(H) 总量提高了 2.63 倍, NADH/NAD⁺ 从 0.64 降低为 0.41, 使重组菌株恢复了厌氧条件下生长和代谢葡萄糖的能力。重组菌与对照菌相比, 72 h 内可以消耗 14.0 g/L 的葡萄糖产 6.23 g/L 的丁二酸, 丁二酸产量增加了 19 倍。

关键词: 丁二酸, 烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶, 厌氧发酵, 大肠杆菌 NZN111, NADH/NAD⁺

Received: March 5, 2012; **Accepted:** May 11, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076105), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-84172062; E-mail: bioengine@njut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21076105), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701), 江苏高校优势学科建设工程项目资助。

Effect of overexpression of nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111

Dongmei Gou¹, Liya Liang¹, Rongming Liu¹, Changqing Zhang¹, Mingke Wu¹, Jiangfeng Ma¹, Kequan Chen¹, Jianguo Zhu^{1,2}, and Min Jiang¹

¹ State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, Jiangsu, China

² Post-Doctoral Research Working Station, Changmao Biochemical Engineering Company Limited, Changzhou 213034, Jiangsu, China

Abstract: *Escherichia coli* NZN111 is a promising strain with *ldhA* and *pflB* genes inactivated for the production of succinic acid. However, with these mutations, NAD^+ could not be regenerated from NADH, and an unbalanced NADH/ NAD^+ ratio eliminated cell growth and glucose utilization under anaerobic conditions. Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase (NAMNAT), encoded by the *nadD* gene, catalyzes the reaction from nicotinic acid mononucleotide (NaMN) to nicotinic acid adenine dinucleotide (NaAD) during the synthetic pathway of NAD(H). Overexpression of the *nadD* gene could enhance the concentration of NAD(H) and maintain a suitable NADH/ NAD^+ ratio. In this study, we constructed a recombinant strain *E. coli* NZN111/pTrc99a-*nadD*, and overexpressed NAMNAT with 1.0 mmol/L of IPTG under anaerobic conditions in sealed bottles. Compared to *E. coli* NZN111, the concentrations of NAD^+ and NADH in the recombinant strain increased by 3.21-fold and 1.67-fold, respectively. The total concentration of NAD(H) was increased by 2.63-fold, and the ratio of NADH/ NAD^+ decreased from 0.64 to 0.42. The recombinant strain restored the cell growth and glucose utilization under anaerobic conditions. After 72 h, the recombinant strain could consume 14.0 g/L of glucose to produce 6.23 g/L of succinic acid, and the concentration of succinic acid was 19-fold higher than in *E. coli* NZN111.

Keywords: succinic acid, nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, anaerobic fermentation, *Escherichia coli* NZN111, NADH/ NAD^+

丁二酸 (又称琥珀酸) 作为一种 C4 平台化合物, 广泛应用于医药、农药、染料、香料、油漆、食品、塑料、合成有机化学品以及聚丁二酸丁二醇酯 (PBS) 类生物可降解材料等行业, 被美国能源部认为是未来 12 种最有价值的生物炼制产品之一^[1-4]。利用微生物发酵法转化可再生资源生产丁二酸, 价格低廉、污染小、且在发酵过程中可吸收固定 CO_2 , 开辟了温室气体利用的新途径, 工艺过程具有绿色、能耗低、原子经济性高的优点, 成为近年来的研究热点^[5-9]。

大肠杆菌 NZN111 由于缺乏了乳酸脱氢酶的编码基因 (*ldhA*) 和丙酮酸-甲酸裂解酶的编码基因 (*pflB*) 而使副产物乳酸和甲酸的生产途径阻断, 具有潜在生产丁二酸的能力。但同时由于 NADH 依赖的乳酸脱氢酶 (LDH) 无法合成而限制了糖酵解过程中形成的 NADH 再生为 NAD^+ 的过程, 造成辅酶不平衡, 导致该菌株厌氧条件下不能利用葡萄糖进行生长^[10-13]。Hong 和 Lee^[14] 选择还原性糖山梨醇作为碳源, 当以 CO_2 为气相时, 20 g/L 山梨醇发酵产生 10 g/L 丁二酸, 转化

率达到 50%。Boernke 等^[15]在 *E. coli* NZN111 中克隆表达苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*) 后, 能使其在厌氧条件下生长。同时, Stols 等^[16-17]将猪蛔虫 *Ascaris suum* 中的苹果酸酶基因转入到 *E. coli* NZN111 后, 丁二酸的产率和生产强度分别为 0.39 g/g 和 0.29 g/(L·h)。Goldberg 等^[18]和 Wang 等^[19]都曾研究过在 *E. coli* 中过量表达富马酸还原酶基因 (*frd*) 直接转化富马酸生成丁二酸, 获得较好的结果, 富马酸转化率可达 93%。以上 3 种酶都是丁二酸生成途径中的关键酶, 并且在反应时都能使 NADH 被氧化为 NAD⁺, 缓解 NZN111 中辅酶系统的不平衡, 使其能在厌氧的条件下生长并能产生一定量的丁二酸。由此可知, 在构建高产丁二酸大肠杆菌菌株过程中, 确保还原力的供给和胞内辅酶 NAD(H) 的平衡是重组大肠杆菌高产丁二酸的关键因素。图 1 显示了大肠杆菌的厌氧混合酸发酵途径^[20]。

大肠杆菌中 NAD(H) 的生物合成途径如图 2 所示。San 等^[21-22]通过在大肠杆菌中过量表达鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 中的烟酸转磷酸核糖激酶基因 (*pncB*), 使 NAD 的总量

增加, NADH/NAD⁺的比例降低, 从而使其代谢流发生改变。Heuser 等^[23]通过在大肠杆菌中过量表达烟酸转磷酸核糖激酶基因 (*pncB*) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成酶基因 (*nadE*) 后, 均使细胞中 NAD(H) 的总量增加了两倍多, 通过将这两个基因共表达后, 使胞内的 NAD(H) 的总量增加了 7 倍多。

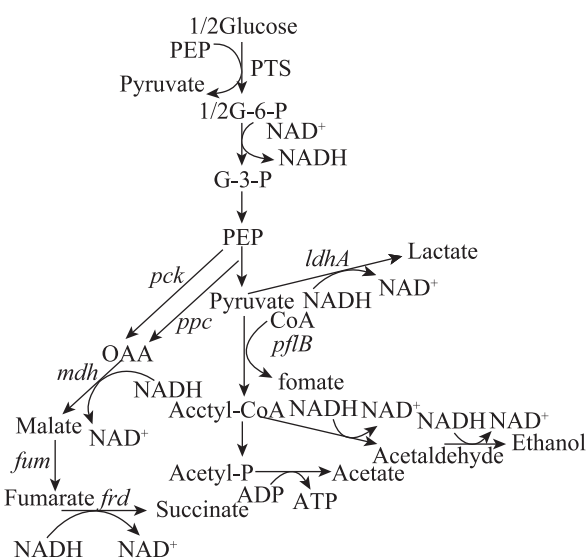


图 1 大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径^[20]

Fig. 1 Pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *Escherichia coli*^[20].

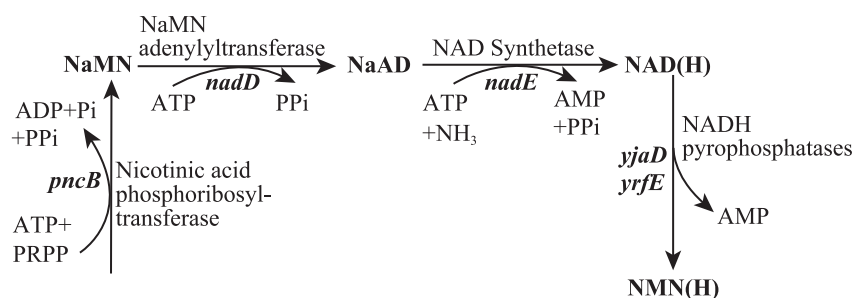


图 2 NAD(H) 在大肠杆菌中的生物合成途径^[23]

Fig. 2 NAD(H) metabolism in *Escherichia coli*^[23]. NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NaAD: nicotinic acid adenine dinucleotide; NAD: nicotinamide adenine dinucleotide; PRPP: Phosphoribosyl pyrophosphate; NMN: nicotinamide mononucleotide.

本研究通过过量表达 NAD(H) 生物合成途径中的烟酸单核苷酸腺苷转移酶, 构建了重组菌 *E. coli* NZN111/pTrc99a-*nadD*, 增加 NAD(H) 的总量, 降低 NADH/NAD⁺ 比例, 从而维持该菌株胞内的辅酶平衡, 恢复了其在厌氧条件下的生长及耗糖能力, 减少了副产物丙酮酸的积累并促进了丁二酸的合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保藏; 质粒 pTrc99a 由南京师范大学邵蔚蓝教授惠赠; *E. coli* NZN111 (*ldhA*::Kan *pflB*::Cam) 由南伊利诺伊卡本代尔大学 Clark 教授惠赠, 作为宿主菌和对照菌。

1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素, 购自上海生工生物工程有限公司; 基因组提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品; DNA 片段回收试剂盒、限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶为大连宝生物有限公司产品; 酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; CO₂ 气体购自南京上元工业气体厂。

1.2 方法

1.2.1 *nadD* 基因的克隆

引物设计: 参照 *nadD* 基因序列 (来源于 *E. coli* K12 基因组, GenBank Accession No. 0009435) 设计, 由上海申能博彩生物科技有限公司合成。分别在上下游引物的 5' 端引入了 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切位点 (下划线标示), 引物序列如表 1 所示。

PCR 反应体系: ddH₂O 37.5 μ L, 10 \times pyrobest buffer II 5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 4 μ L, 模板 DNA (100 μ g/L) 0.5 μ L, 上下游引物 (50 μ mol/L) 各 1 μ L, Pyrobest DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 1 μ L。总体积 50 μ L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 72 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 重组质粒的构建

将纯化后的 *nadD* 基因片段以及质粒 pTrc99a 进行 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 把双酶切后得到的片段在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建得到重组质粒 pTrc99a-*nadD* 并转化于 *E. coli* NZN111 感受态。涂布于含氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后挑选抗性克隆, 提取质粒后进行 *Hind* III 单酶切及 *Nco* I 和 *Hind* III 的双酶切鉴定。菌体转化采用 CaCl₂ 法^[24]。

表 1 研究中所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Forward	CATG <u>CCATGGG</u> GCGGACGTATT TATCGACGGTTGA	35
Reverse	CCCA <u>AAGCTT</u> CAGATTTTGCCTTGCTCAAT ACCG	34

The underlined part is the restriction site of *Nco* I and *Hind* III.

1.2.3 重组烟酸单核苷酸先苷转移酶的诱导表达

有氧诱导: 37 °C、200 r/min 培养菌体到 OD_{600} 约 0.6 左右, IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 30 °C、170 r/min 诱导 8 h。

样品处理: 采取超 3 s 停 5 s 的策略共超声破碎 3 min, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清即粗酶液, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 辅酶 NADH 与 NAD^+ 浓度的测定^[25]

反应时依次添加 150 μ L 上述的细胞提取液、0.9 mL 的纯水、1.8 mL 的混合反应液 (等体积的 1.0 mol/L 甘氨酸二肽/烟酸缓冲液、纯乙醇、40 mmol/L EDTA、4.2 mmol/L 噻吩兰和双倍体积的 16.6 mmol/L PES 混合, 30 °C 水浴 10 min) 和 150 μ L 的乙醇脱氢酶 (500 U/mL), 迅速混匀后, 测定波长 570 nm 处的吸光度值 A_{570} , 做出测定得到的吸光度值 A_{570} 随时间变化曲线, 并将所得到的斜率带到标准曲线中去, 得到待测样品中 NADH 与 NAD^+ 的浓度。

1.2.5 培养基及培养条件

有氧摇瓶培养基: LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 7.0, 氯霉素、硫酸卡那霉素和氨苄青霉素的终浓度分别为 25 μ g/mL、30 μ g/mL 和 100 μ g/mL。

纯厌氧血清瓶发酵及两阶段发酵用培养基: 30 mL LB 液体培养基, 添加 0.48 g 碱式碳酸镁, 20 g/L 葡萄糖, 抗生素添加同有氧培养, 添加终浓度为 1.0 mmol/L 的诱导剂 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 以诱导表达 NAMNAT。

1.2.6 培养方法

有氧摇瓶培养: 将保存于-80 °C 的菌种在加有相应抗生素的平板上活化, 挑单菌落到 5 mL

LB 试管, 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 1% 接种量接种到好氧培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 5 h。

纯厌氧血清瓶发酵: 转接 10% 的菌液到血清瓶中, 通入过滤除菌后的 CO_2 气体 2 min, 保证血清瓶中为厌氧环境, 加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、170 r/min 发酵 72 h。

两阶段发酵: 将 100 mL 有氧摇瓶培养至对数期末期的菌液, 8 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清, 加入 3~4 mL 培养液, 进行混匀, 然后加入含有 30 mL LB 加碳酸镁的血清瓶中, 通入过滤除菌后的 CO_2 气体 2 min, 保证血清瓶中为厌氧环境, 加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、170 r/min 发酵 24 h。

1.2.7 最佳生长条件的确定

1) IPTG 诱导最佳浓度的确定: 厌氧血清瓶发酵时, 在初始 OD_{600} 值为 0.7 的培养液中加入 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.2、1.5 mmol/L, 30 °C、170 r/min 厌氧发酵, 发酵周期 72 h, 留样测定 OD_{600} , 残糖和丁二酸含量。不同 IPTG 浓度的摇瓶分别有 3 个平行样。

2) 烟酸最佳浓度的确定: 厌氧血清瓶发酵时, 在初始 OD_{600} 值为 0.7 的培养液中加入终浓度分别为 0、0.1、0.3 mmol/L 的烟酸和 1.0 mmol/L 的 IPTG, 厌氧发酵 30 °C、170 r/min, 发酵周期 72 h, 留样测定 OD_{600} , 残糖和丁二酸含量。不同烟酸浓度的摇瓶分别有 3 个平行样。

1.2.8 发酵及代谢物分析

细胞生长用紫外可见分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值, 细胞干重 (Dry cell weight, DCW) 是由 DCW 与 OD_{600} 测定的标准

曲线换算得到, 换算公式为: $DCW\ (g/L) = 0.4 \times OD_{600}$ 。培养基中的葡萄糖用生物传感仪 (SBA40C, 生产厂家是山东省科学院生物研究所) 检测, 有机酸用高效液相色谱法 (HPLC) 检测, 色谱柱为 Prevail Organic Acid, 流动相为 25 mmol/L KH_2PO_4 , pH 2.5, 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 215 nm。

2 结果与分析

2.1 烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶基因的克隆与表达

用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 扩增后的目的基因片段 *nadD* 和载体 pTrc99a, 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建表达载体 pTrc99a-*nadD*, 构建流程如图 3 所示。

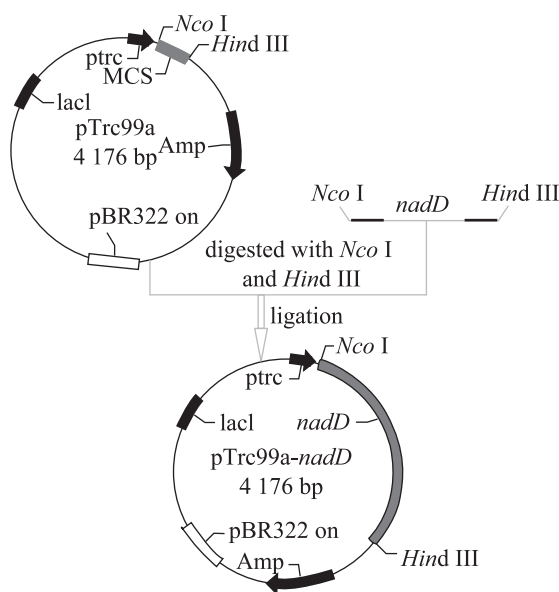


图 3 pTrc99a-*nadD* 表达载体的构建图谱

Fig.3 Map of construction of pTrc99a-*nadD* expression vector.

重组质粒 pTrc99a-*nadD* 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切的条带大小为 4 925 bp, 经限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切的条带大小分别为 805 bp 和 4 120 bp。重组质粒经单、双酶切鉴定 (图 4), 结果与预期一致, 并经测序后目的基因序列与公布的序列 100% 匹配。

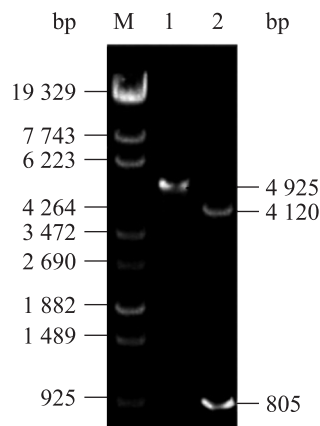


图 4 重组质粒 pTrc99a-*nadD* 的单酶切和双酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pTrc99a-*nadD* by restriction endonuclease digestion. M: λ -EcoT 14 I digest marker; 1: pTrc99a-*nadD* digested with *Hind* III; 2: pTrc99a-*nadD* digested with *Nco* I and *Hind* III.

2.2 NAMNAT 酶活的诱导表达

37 °C、200 r/min 培养菌体到 OD_{600} 为 0.7 左右, 加入 IPTG 至终浓度分别为 1.0 mmol/L, 30 °C、170 r/min 诱导 8 h 后, 对 *E. coli* NZN111/pTrc99a 和构建的重组菌株进行粗酶液的 SDS-PAGE 电泳以及 NADH 和 NAD^+ 测定, 结果如图 5 和表 2 所示。

由图 5 全菌体蛋白电泳可见 25 kDa 左右的目的条带, 这与预期的大肠杆菌 24 kDa 的 *nadD* 基因表达蛋白的相对分子量一致。表明在 IPTG 的诱导下, NAMNAT 得到了表达。

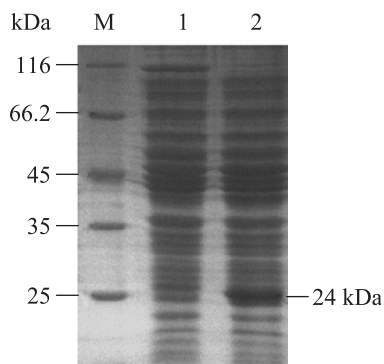


图 5 过量表达 *nadD* 基因后细胞提取物的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of pTrc99a-*nadD* expression. M: protein molecular weight marker; 1: *E. coli* NZN111/pTrc99a; 2: *E. coli* NZN111/pTrc99a-*nadD*.

由表 2 可知: 重组菌中的烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶基因得到了过量表达, NADH 的浓度提高了 0.49 倍, NAD^+ 的浓度提高了 2.33 倍,

NAD(H) 的总量提高了 2.02 倍, 可见烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶的过量表达可以使 NAD(H) 总量得到很大的提高。

2.3 最佳生长条件的优化

2.3.1 IPTG 浓度的优化

图 6 表明, 当 IPTG 添加终浓度为 1.0 mmol/L 时, 生物量、耗糖和丁二酸的值最高。实验结果显示, 在一定范围内, IPTG 浓度越高, 生物量和丁二酸的值越高, 当超过 1.0 mmol/L 以后, 生物量和丁二酸的值不仅没有提高, 反而减少, 出现这种现象的原因可能是 IPTG 本身具有细胞毒性, 浓度过高, 不利于菌体的生长代谢; 另外, 过高浓度的 IPTG 也可能会诱导外源基因的高表达, 过高的酶活会加重菌体生长和基础代谢负担, 不利于目标代谢物的生产。

表 2 对照菌与重组菌的 NADH、 NAD^+ 以及 NAD(H) 的浓度

Table 2 The concentration of NADH, NAD^+ and NAD(H) in the control strain and in the recombinant strain

Strains	NADH ($\mu\text{mol/g}$)	NAD^+ ($\mu\text{mol/g}$)	NAD(H) ($\mu\text{mol/g}$)
<i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a	0.593 \pm 0.012	2.912 \pm 0.102	3.505 \pm 0.121
<i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a- <i>nadD</i>	0.887 \pm 0.026	9.703 \pm 0.124	10.591 \pm 0.232

2.3.2 烟酸浓度的优化

烟酸作为 NAD(H) 补给合成途径中的底物, 在优化 IPTG 浓度之后, 分别考察添加不同烟酸浓度对重组菌生长、耗糖及产酸的影响。实验结果表明 (图 7), 添加不同的烟酸浓度后, 对菌体的生长、耗糖和产酸都有一定的影响, 当烟酸添加终浓度为 0 mmol/L 时, 丁二酸的产量为最高, 当烟酸的添加终浓度超过 0 mmol/L 时, 丁二酸的浓度都有所降低。

2.4 厌氧血清瓶发酵

有氧培养结束后, 按 10% 的接种量转接到厌

氧血清瓶, 使初始 OD_{600} 值约为 0.7 左右, 添加终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 发酵 72 h 后测定细胞干重、辅酶 NAD^+ 和 NADH 的量, 并测定残糖及丁二酸的含量。结果见表 3。

由表 3 可知, 重组菌与对照菌相比, 72 h 内可以消耗 14.0 g/L 的葡萄糖产 6.23 g/L 的丁二酸, 而对照菌几乎没有丁二酸生成, 重组菌细胞干重是对照菌的 5.5 倍, NAD^+ 增加了 3.21 倍, NADH 增加了 1.67 倍, 表明过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶基因后, 在一定程度上, 恢复了大肠杆菌 NZN111 在厌氧条件下的

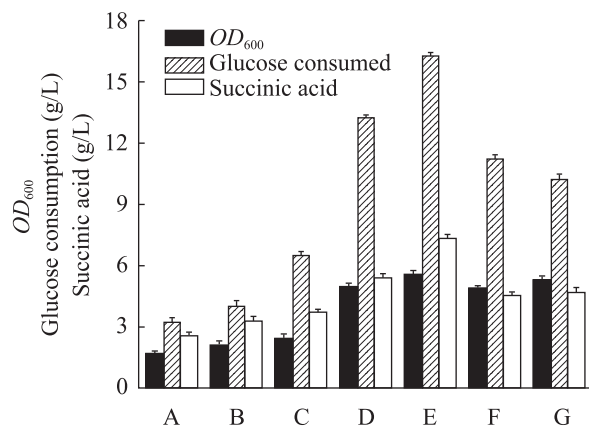


图6 加入不同浓度IPTG进行诱导对重组菌株生长、耗糖及产丁二酸的影响

Fig. 6 Effect of different concentrations of IPTG on the cell mass, glucose consumed and succinic acid concentration at the end of the fermentation in NZN111/pTrc99a-nadD. Note: A-G: NZN111/pTrc99a-nadD induced with different IPTG. A: 0.1 mmol/L; B: 0.3 mmol/L; C: 0.5 mmol/L; D: 0.7 mmol/L; E: 1.0 mmol/L; F: 1.2 mmol/L; G: 1.5 mmol/L.

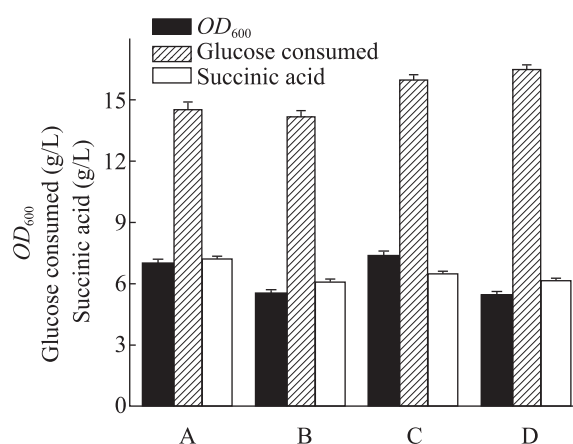


图7 加入不同浓度烟酸进行诱导对重组菌株生长、耗糖及产丁二酸的影响

Fig. 7 Effect of different concentrations of nicotinic acid on the cell mass, glucose consumed and succinic acid concentration at the end of the fermentation in NZN111/pTrc99a-nadD. Note: A-D: NZN111/pTrc99a-nadD with different NA. A: 0 mmol/L; B: 0.1 mmol/L; C: 0.3 mmol/L; D: 0.5 mmol/L.

表3 厌氧血清瓶培养后各种参数的测定结果

Table 3 Results of these parameters on anaerobic fermentation in sealed bottles

Strains	Time (h)	DCW (g/L)	NAD ⁺ (μmol/g)	NADH (μmol/g)	NAD(H) (μmol/g)	NADH/NAD ⁺	Glucose consumed (g/L)	Succinic acid (g/L)	Pyruvic acid (g/L)
<i>E. coli</i> NZN111	72	0.44±0.02	3.01±0.10	1.92±0.06	4.93±0.11	0.64±0.04	0.5±0.1	0.31±0.01	0.4±0.05
<i>E. coli</i> NZN111/pTrc99a-nadD	72	2.45±0.06	12.64±0.14	5.32±0.12	17.8±0.13	0.41±0.03	14.0±0.5	6.23±0.11	5.7±0.14

生长和耗糖能力。NAD(H) 的总量增加了 2.63 倍, NADH/NAD⁺ 的比例由 0.64 降到 0.41, 该现象说明增加 NAD(H) 的总量和维持合适的 NADH/NAD⁺ 的比例对于 NZN111 产生还原性末端产物丁二酸是有利的。若能将二者结合起来, 可改变代谢流的方向, 减少其他副产物的产生, 从而很大程度地提高丁二酸的产率和生

产强度。

2.5 两阶段发酵

有氧培养 6 h 后, 将 100 mL 的菌液 8 000 r/min 离心 10 min, 将菌泥接入血清瓶, 添加终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 发酵 24 h 后, 测其 OD₆₀₀、残糖、丁二酸、丙酮酸、乙酸等不同产物的含量。结果见表 4。

表 4 两阶段血清瓶培养后各种参数的测定

Table 4 Results of these parameters on dual-phase fermentation in sealed bottles

Strains	Time (h)	DCW (g/L)	Glucose consumed (g/L)	Succinic acid (g/L)	Pyruvic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))
<i>E. coli</i> NZN111	24	7.11±0.02	18.0±0.5	10.46±0.12	0.20±0.01	1.39±0.05	0.58±0.03	0.44±0.01
<i>E. coli</i> NZN111 /pTrc99a- <i>nadD</i>	24	7.11±0.04	20.0±0.5	17.06±0.16	0.27±0.02	2.90±0.04	0.85±0.06	0.71±0.02

由表 4 可知,重组菌发酵 24 h 后,消耗 20 g/L 的葡萄糖,产生 17.06 g/L 的丁二酸,丁二酸产量是对照菌的 1.63 倍,其得率和生产强度分别为 0.85 g/g 和 0.71 g/(L·h),而对照菌的得率和生产强度分别为 0.58 g/g 和 0.44 g/(L·h),进一步说明过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶,有利于厌氧条件下丁二酸的生成。

3 结论

文中构建重组大肠杆菌 NZN111/pTrc99a-*nadD*, 过量表达了烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶,与对照菌 NZN111 相比,有氧条件下 NAD^+ 的浓度提高了 2.33 倍, NADH 的浓度提高了 0.49 倍, NAD(H) 的总量增加了 2.02 倍,这表明过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶,能提高胞内的 NAD(H) 的总量,有利于丁二酸的生产。进一步在厌氧血清瓶中进行发酵,通过对其诱导条件进行优化,提供菌体生长代谢的良好条件和合适的表达基因的酶活,使其耗糖和丁二酸产量都有很大的提高。通过加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,使烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶得到了过量表达,辅酶 NAD(H) 的总量增加了 2.63 倍, NADH/NAD^+ 的比例由 0.64 降到 0.41,特别是 NAD^+ 的浓度增加了 3.21 倍,提供了充足的 NAD^+

来进行葡萄糖的氧化,在厌氧条件下,使菌株能够利用葡萄糖代谢生长,重组菌细胞干重是对照菌的 5.5 倍,使丁二酸的产量大大提高。Liu 等^[26]报道了在大肠杆菌 NZN111 过量表达 NAD(H) 合成途径中的烟酸转磷酸核糖激酶,使 NAD(H) 恢复平衡,也恢复了 NZN111 厌氧条件下生长和产酸能力。文中通过在 NZN111 中过量表达烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶,再次证实增加 NAD(H) 的总量和维持合适的 NADH/NAD^+ 的比例是重组大肠杆菌生产还原性末端产物的关键因素,这为提高丁二酸的产量及确定基于 NAD(H) 调控丁二酸高收率、高生产强度的生物合成策略提供了依据。

REFERENCES

- [1] Wang QZ, Wu W, Zhao XM. Market analysis for bioconversion of succinic acid and its derivatives. *Chem Ind Eng Prog*, 2004, 23(7): 794–798.
王庆昭, 吴巍, 赵学明. 生物转化法制取琥珀酸及其衍生物的前景分析. *化工进展*, 2004, 23(7): 794–798.
- [2] Zhan XB, Zhu YH, Wang DH. Succinic acid production and potential market. *Food Sci Technol*, 2003(2): 44–49.
詹晓北, 朱一晖, 王东海. 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场. *食品科技*, 2003(2): 44–49.

- [3] Wang DX, Ma TN. Preparation of succinic acid from highly oxidized paraffin. *Chemical Engineer*, 2003, 96(3):15–16.
王大勋, 马铁宁. 从深度氧化石蜡中提取琥珀酸. *化学工程师*, 2003, 96(3):15–16.
- [4] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus GJ. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(4): 727–740.
- [5] Zeikus JG, Jain M K, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biot*, 1999, 51(5): 545–552.
- [6] Lee PC, Lee SY, Hong SH, et al. Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(2): 111–114.
- [7] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 6651–6656.
- [8] Lee JW, Lee SY, Song H, et al. The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics*, 2006, 6(12): 3550–3556.
- [9] Jiang M, Liu SW, Ma JF, et al. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *E. coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1298–1300.
- [10] Wu H, Li ZM, Zhou L, et al. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(24): 7837–7843.
- [11] Wang W, Z Li. Production of succinate by a *pflB ldhA* double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32(6): 737–745.
- [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] Singh A, Lynch MD, Gill RT. Genes restoring redox balance in fermentation-deficient *E. coli* NZN111. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 347–354.
- [14] Hong S, Lee S. Importance of redox balance on the production of succinic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(3): 286–290.
- [15] Boernke WE, Millard CS, Stevens PW, et al. Stringency of substrate-specificity of *Escherichia coli* malate-dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322(1): 43–52.
- [16] Stols L, Kulkarni G, Harris BG, et al. Expression of *Ascaris suum* malic enzyme in a mutant *Escherichia coli* allows production of succinic acid from glucose. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, 63–65 (1): 153–158.
- [17] 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.
- [18] Goldberg I, Lonberg-Holm K, Bagley EA, et al. Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45(6): 1838–1847.
- [19] Wang XH, Gong CS, Tsao GT. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1998, 70–72(1): 919–928.
- [20] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 63(3): 223–234.
- [21] Berrios- Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD, the NADH/NAD⁺ ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 238–247.
- [22] San KY, Bennett GN, Berríos-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux

- redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 182-192.
- [23] Heuser F, Schroer K, Ltüz S, et al. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci*, 2007, 7(4): 343-353.
- [24] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 24-25.
- [25] Li J, Chen KQ, Huang XM, et al. Establishment of the determination of NAD⁺ and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids. *Food Sci Technol*, 2008, 33(12): 254-257.
- 李建, 陈可泉, 黄秀梅, 等. 厌氧发酵有机酸体系中 NAD⁺和 NADH 测定方法的建立. *食品科技*, 2008, 33(12): 254-257.
- [26] Liu RM, Ma JF, Liang LY, et al. Effect of overexpression of nicotinic acid phosphoribosyl transferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. *Chin J Biotech*, 2011, 27(10): 1438-1447.
- 刘嵘明, 马江锋, 梁丽亚, 等. 过量表达烟酸转磷酸核糖激酶对大肠杆菌 NZN111 产丁二酸的影响. *生物工程学报*, 2011, 27(10): 1438-1447.