

重组大肠杆菌产琥珀酸研究进展

姜 岷* 马江锋 陈可泉 王益娜 于 丽

(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 江苏 南京 210009)

摘 要: 琥珀酸作为一种优秀的C4 平台化合物, 广泛用于生物高分子、食品与医药等行业, 市场潜在需求量巨大。采用微生物发酵法生产琥珀酸, 可利用廉价的可再生资源, 实现石油的原料替代, 而且过程污染小, 环境友好, 且在发酵过程中可吸收固定温室气体CO₂, 开辟了其利用的新途径, 近年来引起了广泛关注。在丁二酸生产菌株中, 大肠杆菌由于其遗传背景清楚, 易操作易调控, 培养基要求简单, 生长迅速等优点, 近年来被广泛用于研究以获得产琥珀酸优秀生产菌株。本工作系统综述了产琥珀酸大肠杆菌构建中所采用的基因工程策略及代谢工程技术, 并探讨了今后研究的方向。

关键词: 琥珀酸, 大肠杆菌, 代谢工程

The Progress of Recombinant *Escherichia coli* for Production of Succinic Acid

JIANG Min* MA Jiang-Feng CHEN Ke-Quan WANG Yi-Na YU Li

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

Abstract: Succinic acid is regarded as C4 platform chemical, which has a huge potential market with wide applications in biopolymer, food, medicine, and so on. Production of succinic acid by microorganism fermentation has attracted much attention in recent times. By fermentation, succinic acid could be produced from renewable resources in place of petroleum with low cost and low pollution; especially CO₂ could be fixed by microorganism to form the product, which is a promising way to deal with the green gas. Some *E. coli* have been chosen as good succinic acid producing strains because of their clear genetic backgrounds, convenience to be modified and controlled, and good growth properties with low nutrients requirements. The progress of genetic engineering strategy and metabolic engineering technology for construction of succinic acid producing recombinant *E. coli* has been introduced in this paper with the discussion of the future research in this area.

Keywords: Succinic acid, *Escherichia coli*, Metabolic engineering

琥珀酸(succinic acid) 被广泛应用于医药、农药、染料、香料、油漆、食品和塑料等行业, 同时作为优秀的C4 平台化合物, 可用于合成 1,4-丁二醇,

四氢呋喃, γ -丁内酯等有机化学品以及聚丁二酸丁二醇酯(PBS)类生物可降解材料, 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^[1-3]。

基金项目: 国家高技术发展计划“863 计划”(No. 2006AA02Z235); 国家自然科学基金资助(No. 20606017); 江苏省高技术研究计划(No. BG2007001)

* 通讯作者: Tel: 86-25-83587330; ✉ jiangmin@njut.edu.cn

收稿日期: 2008-06-05; 接受日期: 2008-08-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

利用微生物发酵法转化可再生资源(葡萄糖, 木糖等)生产琥珀酸, 由于原料来源广泛且价格低廉, 污染小, 环境友好, 且在发酵过程中可吸收固定 CO_2 , 能有效缓解温室效应, 开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径, 近年来成为研究的热点。

琥珀酸的生产菌株很多, 目前研究的热点主要集中在 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[4]、*Actinobacillus succinogenes*^[5]、*Mannheimia succiniciproducens*^[6]和重组 *E. coli*。利用野生菌株生产琥珀酸虽然获得了较高的产物浓度, 但培养过程培养基成本较高, 且甲酸、乙酸等副产物积累较多, 阻碍了其工业化进程。*Escherichia coli*由于遗传背景清楚、易操作、易调控、培养基要求简单和生长迅速等优点, 近年来被广泛用于研究以获得产琥珀酸优秀菌株。本文对产琥珀酸大肠杆菌在基因工程、代谢工程方面的研究进行了系统的总结, 并探讨了今后的研究方向。

1 野生型大肠杆菌产琥珀酸代谢网络

一般认为, 野生型 *E. coli*在有氧环境中, 琥珀酸仅作为TCA循环中的中间产物, 没有积累; 但在厌氧环境下, 进行混合酸发酵^[7](图1), 并认为存在六条途径^[8]可以代谢生成琥珀酸(图2)。其中, 琥珀酸主要的产生途径为葡萄糖经过糖酵解途径生成磷酸烯醇式丙酮酸, 并进而代谢合成草酰乙酸、苹

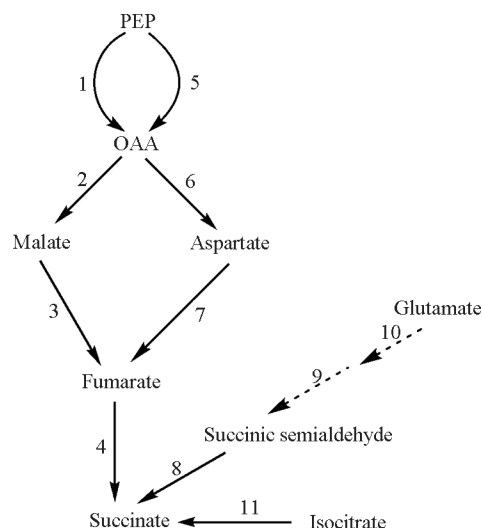


图2 大肠杆菌 K-12 发酵产丁二酸途径

Fig. 2 Pathways for the formation of the fermentation product succinate in *Escherichia coli* K-12^[8]

Note: 1: PEP carboxykinase; 2: Malate dehydrogenase; 3: Fumarase; 4: Fumarate reductase; 5: PEP carboxylase; 6: Aspartate: glutamate transaminase; 7: Aspartase; 8: Succinic semialdehyde dehydrogenase; 9: γ -aminobutyrate: glutamate transaminase; 10: Glutamate decarboxylase; 11: Isocitrate lyase

果酸、富马酸, 最终以琥珀酸的形式积累。在此合成途径中, 每1 mol葡萄糖生成2 mol NADH, 生成1 mol琥珀酸需要消耗2 mol的NADH, 而生成乳酸、甲酸和乙酸则只需消耗1 mol的NADH甚至不需要消耗NADH, 因此, 在野生大肠杆菌中, 琥珀酸由于需要更多的还原力, 积累很少^[9,10]。

2 产琥珀酸大肠杆菌基因改造策略

2.1 增强琥珀酸代谢途径中关键酶

2.1.1 超量表达内源性基因: 苹果酸酶催化苹果酸与丙酮酸之间的反应, Stols^[11]等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。

大肠杆菌中编码苹果酸酶的基因 *sfcA*, 在 *E. coli* 双突变株 NZN111 中超量表达后, 由于该菌株缺乏乳酸脱氢酶和丙酮酸甲酸裂解酶活性, 导致丙酮酸的大量积累, 使苹果酸酶逆向催化生成苹果酸^[12], 并以琥珀酸作为最终还原产物而大量积累。

PEP羧化酶基因(*ppc*)和PEP羧化激酶基因(*pck*)

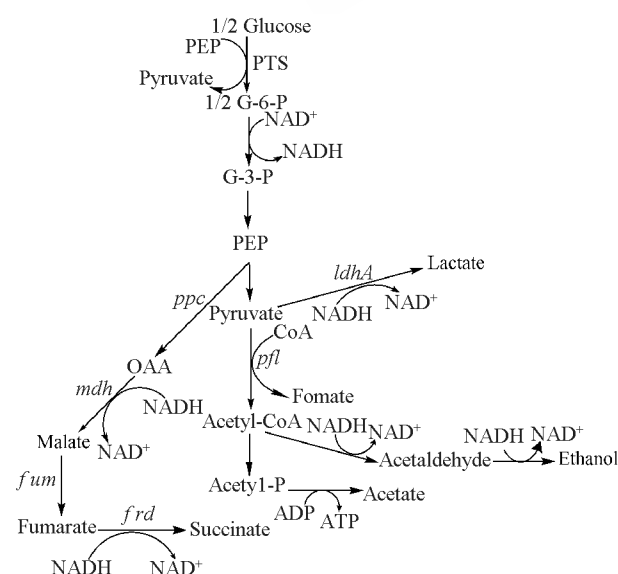


图1 大肠杆菌厌氧混合酸发酵途径

Fig. 1 Pathways of anaerobic mixed acid fermentation for *Escherichia coli*^[7]

催化PEP与草酰乙酸(OAA)之间的反应。Millard^[13]等在大肠杆菌中过量表达内源性基因 ppc 和 pck , 研究发现过量表达 ppc 可以使琥珀酸作为混合酸发酵的主要发酵产物, 且产量较出发菌株提高3.5倍, 而过量表达 pck 对发酵结果没有影响, 但在 ppc 缺陷菌株中, pck 的过量表达能够提高琥珀酸的产量, 因此, PEP羧化酶可能是大肠杆菌厌氧混合酸发酵中催化PEP至OAA最主要的酶, 而当 ppc 缺陷时, PEP羧化激酶可催化该反应。另一项研究^[14]表明在大肠杆菌中, 当培养液中 HCO_3^- 的浓度低时, 细胞中的羧化反应由PEP羧化酶完成, 相反 HCO_3^- 浓度高时, 羧化反应则由PEP羧化激酶来完成。

富马酸还原酶是厌氧琥珀酸合成途径中另外一个关键酶, 其核苷酸序列、氨基酸序列与琥珀酸脱氢酶相似^[15], 均可催化富马酸与琥珀酸之间的反应, 仅与底物之间的亲和力有所差异。Goldberg^[16]等和Wang^[17]等都曾研究过在*E. coli*中过量表达富马酸还原酶直接转化富马酸生成琥珀酸, 获得较好的结果, 富马酸转化率可达93%。

2.1.2 引入外源性基因: 在大肠杆菌中过量表达内源性基因取得了很好的效果, 且由于稀有密码子少等原因容易表达, 但发展空间较小, 目前很多研究者尝试在*E. coli*中引入外源基因, 尤其是大肠杆菌自身不含的酶基因来构建新的代谢途径(如 pyc 基因)以提高琥珀酸收率及生产强度。

考虑到PEP羧化酶、PEP羧化激酶等在厌氧混合酸发酵过程中的重要性, Kim^[18]等引入*Actinobacillus succinogenes*中PEP羧化激酶基因 pck , 发酵实验表明在 ppc 缺陷株中能够使琥珀酸得到大量积累, 较出发菌株提高了6.5倍, 与Millard等人过量表达内源 pck 相比, 效果显著。Lin^[19]等通过在*E. coli* YBS132($\Delta ackA$ - pta , $\Delta ldhA$)中引入*Sorghum vulgare*中PEP羧化酶基因 ppc 及*Lactococcus lactis*中丙酮酸羧化酶基因 pyc , 并结合敲除竞争途径中的酶, 使得琥珀酸的产量得到了极大的提高, 且副产物乙酸、乳酸含量很低。在另一项研究^[24]中, 在已敲除乙醇脱氢酶基因($adhE$), 乳酸脱氢酶基因(ldh), 乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(pta - ack)的菌株SBS990MG中过量表达*Bacillus subtilis*中柠檬酸合成酶基因(cs), 使琥珀酸产量有了显著提高, 葡萄糖摩尔收率1.58 mol/mol。王庆昭^[20]等通过引入

*Bacillus subtilis*168 中 pyc 基因, 并同时表达半乳糖透性酶基因, 使琥珀酸收率提高至1.2 mol/mol, 生产强度由0.33提高至0.6 g/L·h。Vemuri^[21]等则引入*Rhizobium etli*中 pyc 基因至大肠杆菌AFP111中, 获得菌株AFP111(pTrc99a- pyc), 其丁二酸产物浓度、相对葡萄糖的收率和生产强度分别达到99.2 g/L, 110%, 1.3 g/L·h, 是目前已报道的生物法制备琥珀酸最具工业价值的菌株。

2.2 敲除或失活琥珀酸竞争途径中的酶

野生型大肠杆菌厌氧混合酸发酵过程中主要产物为乳酸, 甲酸和乙酸, 若要获得高浓度的琥珀酸积累, 则必需减少这些副产物的生成, 使更多的代谢流流向琥珀酸。Chatterjee^[22]等通过敲除乳酸脱氢酶和丙酮酸甲酸裂解酶获得双突变株NZN111, 在自发突变 $ptsG$ 基因后, 获得高产琥珀酸的优秀菌株AFP111, 琥珀酸终浓度可达36 g/L, 收率67%, 无乳酸, 甲酸积累, 乙酸产量很低。Christian^[23]等以大肠杆菌C600(ATCC23724)为出发菌株, 先后敲除以上3个基因, 获得的菌株AFP184不仅能够同时利用五碳、六碳糖, 且琥珀酸终浓度可达48 g/L, 收率104%。

Sanchez^[24]等通过敲除乙醇脱氢酶基因($adhE$), 乳酸脱氢酶基因(ldh), 乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(pta - ack), 并敲除 $aceBAK$ 操纵子阻遏物的基因($iclR$)以激活乙醛酸途径, 获得琥珀酸生产菌株SBS550MG, 发酵结果琥珀酸收率为1.6 mol/mol, 生产强度10 mmol/L·h。

与此同时, 考虑厌氧发酵过程细胞浓度较低, 碳源利用速度较慢等缺点, 导致产物生产强度低。Lin^[25,26]等采用有氧发酵的方式来生产琥珀酸, 有氧发酵生产琥珀酸代谢的网络如图3所示, 在该项研究中, 产琥珀酸*E. coli*基因工程菌通过敲除琥珀酸脱氢酶的基因(sdh)、丙酮酸氧化酶的基因($poxB$)、乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(pta - ack)和 $aceBAK$ 操纵子阻遏物的基因($iclR$)及编码磷酸转移酶系统的基因($ptsG$), 构建出了包含乙醛酸途径和TCA循环氧化支路的琥珀酸合成途径。通过好氧分批发酵实验表明, 该菌株在59 h后琥珀酸的生成量为58.3 g/L, 琥珀酸对葡萄糖的得率系数为0.85 mol/mol, 另外, 发酵液中积累了6.1 g/L的丙酮酸和3.0 g/L的乙酸^[27]。

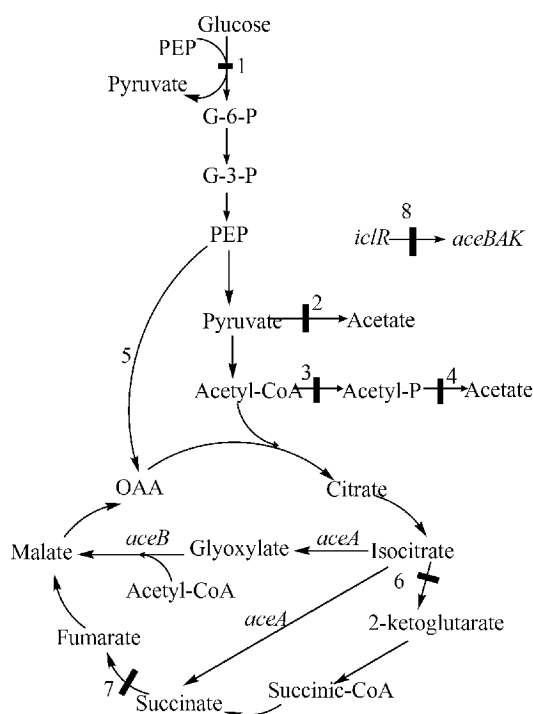


图 3 有氧丁二酸生产中对糖酵解、TCA 和乙醛酸之路的改造

Fig. 3 Genetic engineering of glycolysis, TCA cycle, and glyoxylate bypass in the development of aerobic succinate production system^[25,26]

Note: 1: *ptsG* knockout; 2: *poxB* knockout; 3–4: *ackA-pta* knockout; 5: PEP carboxylase overexpress; 6: *icd* knockout; 7: *sdhAB* knockout. 8: *iclR* knockout

3 总结和展望

目前, 大肠杆菌通过一系列基因策略, 包括增强代谢途径中关键酶、失活或敲除竞争途径中酶, 以及引入新的代谢途径等, 使琥珀酸成为厌氧发酵过程中主要产物, 且产物浓度、质量收率均达较高水平, 但较野生菌 2.8 g/L·h 的生产强度, 大肠杆菌 1.0 g/L·h 左右的发酵性能显然较差, 针对该问题, 今后研究的方向可能为以下几点:

1) 随着生物信息学的迅速发展,更多的基因组 DNA 将被破译,同时更多的蛋白质空间结构、功能将被鉴定,因此,今后将可利用该媒介,进一步优化大肠杆菌的代谢网络,提高原料的利用率及利用速率:

2) 大肠杆菌发酵过程涉及大量辅酶参与的反应, 改造辅酶系统, 加快 NADH 的生成和消耗速率, 提高产物的生产强度;

3) 菌株原料(葡萄糖等)可通过各种方式进入细胞内, 进而被利用合成一系列产物, 改造菌株原料

的运输机制,将可使原料得到有效利用;

4) 针对琥珀酸作为还原终产物的特点, 发酵过程中的氧化还原条件会影响产物分布, 通过先进的发酵调控技术, 调节氧化还原电位, 使最有利于琥珀酸的积累。

总之,今后研究中应充分利用基因工程手段,以代谢工程的基本思路为基础,同时利用代谢分析结果反馈指导基因策略,并结合传统发酵技术优化发酵过程,最终获得琥珀酸的高收率、高生产强度制备。

参考文献

- [1] 詹晓北, 朱一晖, Donghai Wang. 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场. 食品科技, 2003, 2: 44-49.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Lee PC, Lee SY, Hong SH, *et al.* Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(2): 111-114.
- [5] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6651-6656.
- [6] Lee JW, Lee SY, Song H, *et al.* The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics*, 2006, 6(12): 3550-3566.
- [7] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1989, 63(3): 223-234.
- [8] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, *et al.* Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiology*, 1997, 167(6): 332-342.
- [9] Lin H, Bennett GN, San KY. Effect of carbon sources differing in oxidation state and transport route on succinate production in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, 32(3): 87-93.
- [10] Chassagnole C, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, *et al.* Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 79(1): 53-73.
- [11] 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.

- [12] 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.
- [13] Millard CS, Chao YP, Liao JC, *et al.* Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(5): 1808–1810.
- [14] Kwon, Deok Y, Lee SY, *et al.* Influence of gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* under high bicarbonate condition. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, **16**(9): 1448–1452.
- [15] Blattner FR, Bloch CA, Perna NT, *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, **277**(5331): 1453–1474.
- [16] Goldberg I, Lonberg HK, Bagley EA, *et al.* Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, **45**(6): 1838–1847.
- [17] Wang X, Gong CS, Tsao GT. Bioconversion of fumaric acid to succinic acid by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, **70**(1): 919–928.
- [18] Kim P, Laivenieks M, Vieille C, *et al.* Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(2): 1238–1241.
- [19] Lin H, San KY, Bennett GN. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **67**(4): 515–523.
- [20] Wang Qingzhao, Wu Chanyuan, Chen Tao, *et al.* Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(3): 89–93.
- [21] 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 and Biotechnology*, 2002, **28**(6): 325–332.
- [22] 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(1): 148–154.
- [23] Christian A, David H, Kris A, *et al.* Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 2007, **23**(2): 381–388.
- [24] 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.
- [25] 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): 116–227.
- [26] 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. *Metabolic Engineering*, 2005, **7**(5): 337–352.
- [27] Lin H, Bennett GN, San KY. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **90**(66): 775–779.
- [28] Wu Hui, Li Zhimin, Zhou Li, *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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(24): 7837–7843.