

## 研究报告

## 代谢工程改造大肠杆菌合成丁二酸及发酵罐放大工艺

姚伶俐<sup>1</sup> 潘海峰<sup>2</sup> 田文娟<sup>2</sup> 惠天聪<sup>2</sup> 谢志鹏<sup>1,2\*</sup> 张建国<sup>2</sup>

(1. 浙江大学药物生物技术研究所 浙江 杭州 310058)

(2. 杭州宝晶生物股份有限公司 浙江 杭州 311106)

**摘要:**【背景】*Escherichia coli* AFP111 发酵生产丁二酸时大量副产乙酸, 丁二酸得率低。【目的】代谢工程改造 *Escherichia coli* AFP111, 提高丁二酸得率, 降低副产物乙酸的生成, 建立 100 L 规模的丁二酸发酵工艺。【方法】一步同源重组敲除乙酸合成途径关键酶基因, 改造丁二酸合成途径关键酶启动子实现过表达; 单因素优化 5 L 发酵罐培养条件。【结果】敲除乙酸产生途径编码乙酸激酶和磷酸转乙酰酶的基因 *ackA-pta*、苏氨酸脱羧酶和 2-酮丁酸甲酸裂解酶的基因 *tdcDE* 获得 SX02 菌株, 摇瓶发酵条件下其乙酸产量下降了 53.42%, 丁二酸得率提高 9.85%。在 SX02 菌株基础上, 经启动子改造过表达编码葡萄糖激酶的基因 *glk* 后获得菌株 SX03, 其 Glk 酶活性提高 3.66 倍, 乙酸产量下降了 31.62%, 丁二酸得率提高 8.28%。SX03 菌株发酵生产丁二酸在 5 L 发酵罐进行放大, 其乙酸产量为 3.97 g/L, 丁二酸得率为 1.62 mol/mol 葡萄糖, 相比出发菌株的乙酸产量下降了 75.76%, 丁二酸得率提高 19.12%。在 5 L 发酵罐上对比研究了中和剂 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaOH 混合液替换碱式 MgCO<sub>3</sub> 的发酵效果, 并优化了发酵 pH、搅拌转速和葡萄糖浓度, 获得如下最适发酵条件: pH 6.8, 搅拌转速 250 r/min, 葡萄糖 100 g/L, 发酵结束时乙酸产量为 2.24 g/L, 丁二酸得率为 1.66 mol/mol 葡萄糖。中和剂替换优化后乙酸产量下降了 20.65%, 丁二酸得率提高 2.47%。菌株 SX03 发酵工艺进一步在 100 L 发酵罐上实现放大, 其乙酸产量为 1.91 g/L, 丁二酸得率为 1.30 mol/mol 葡萄糖。【结论】通过代谢工程改造的大肠杆菌, 其副产物乙酸含量显著下降, 丁二酸得率提高, 并在 5 L 和 100 L 发酵罐上实现了工艺放大, 展现出较大的工业化利用潜力。

**关键词:** 大肠杆菌, 丁二酸, 乙酸, 葡萄糖激酶, 工艺优化, 中试发酵

## Production of succinate by a metabolic engineered *Escherichia coli* and its scale-up process in fermentor

YAO Ling-Li<sup>1</sup> PAN Hai-Feng<sup>2</sup> TIAN Wen-Juan<sup>2</sup> HUI Tian-Cong<sup>2</sup> XIE Zhi-Peng<sup>1,2\*</sup>  
ZHANG Jian-Guo<sup>2</sup>

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(2. Hangzhou Bioking Biology Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 311106, China)

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* AFP111 produces succinate with low yield from glucose

\*Corresponding author: Tel: 86-571-88206983; E-mail: xzp@zju.edu.cn

Received: February 05, 2018; Accepted: April 19, 2018; Published online (www.cnki.net): May 30, 2018

\*通信作者: Tel: 86-571-88206983; E-mail: xzp@zju.edu.cn

收稿日期: 2018-02-05; 接受日期: 2018-04-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-30

and with high production of acetate. **[Objective]** To reduce acetate production and improve succinate yield. A 100-L-scale fermentation process was established. **[Methods]** One-step homologous recombination was used for knocking out the key enzyme gene of acetate synthesis pathway and modifying key enzyme promoter of succinate synthesis pathway. The culture conditions were optimized by using single factor design in a 5-L fermentor. **[Results]** The resulting strain of SX02, deletion of *ackA-pta* and *tdcDE*, reduced acetate production by 53.42%, and increased succinate yield by 9.85% as compared to the original strain. The glucokinase activity of SX03, obtained after over-expressing *glk*, was 3.66 times high than SX02. Its acetate production reduced by 31.62% and its succinate yield increased by 8.28% as compared to SX02. SX03 produced 3.97 g/L acetate, and 1.62 mol of succinate per mol glucose in a 5-L fermentor with a decrease of acetate production by 75.76% and an increase of succinate yield by 19.12% as compared to the original strain. The fermentation conditions including various neutralizers pH values, agitation speed, glucose concentrations were optimized in a 5-L fermentor. The optimal fermentation conditions were pH 6.8, agitation speed of 250 r/min, glucose concentration of 100 g/L. Under the optimal conditions, SX03 produced 2.24 g/L acetate and 1.66 mol of succinate per mol glucose with a decrease of acetate production by 20.65% and an increase of succinate yield by 2.47%. The fermentation using the strain SX03 was scaled up in a 100-L fermentor, which produced 1.91 g/L acetate and 1.30 mol of succinate per mol glucose. **[Conclusion]** The metabolic engineered *Escherichia coli* shows great industrial potential for the commercial production of succinate.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Succinate, Acetate, Glucose kinase, Fermentation process optimization, Pilot-scale fermentation

丁二酸, 又称琥珀酸, 是三羧酸循环的重要中间产物。丁二酸是优良的 C4 平台化合物, 可广泛用于复杂化学药物、精细化工加工及可降解的聚合物前体物质, 同时被美国能源部列为未来最有潜力的生物基大宗化学药品之一<sup>[1]</sup>。现今工业化生产方式主要通过电解法及催化加氢法。其中电解法是在电解槽中以顺酐或马来酸为原料电解生成丁二酸, 此法工业化生产具有电耗大、电解槽易腐蚀且维修困难、污水排放量等缺点; 而催化加氢法则是采用丁烷为底物生成马来酸酐, 然后在催化剂的作用下进行加氢反应生成丁二酸, 存在催化剂价格昂贵、设备要求高、以不可再生资源为原料等缺点<sup>[2]</sup>。因此, 为避免不可再生资源的使用, 解决资源短缺及减少能耗, 研究微生物发酵法制备丁二酸成为解决问题的关键, 该方法以可再生且价格低廉的糖为原料, 利用高产丁二酸菌株可实现大规模生产。

微生物合成丁二酸目前研究最多的菌株为琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes*、产琥珀酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*、

谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 和大肠杆菌 *Escherichia coli*<sup>[3-4]</sup>。但大多数菌株代谢复杂、发酵培养时营养要求高, 从而增加了发酵成本, 给工业化生产造成障碍。由于大肠杆菌培养条件简单、发酵周期短、代谢网络研究清晰、基因改造简单等优势, 成为工业化研究的主要对象。大肠杆菌好氧发酵过程中, 丁二酸为三羧酸循环(TCA)途径的中间产物, 积累较少, 因此多数研究采用好氧培养、厌氧发酵产酸的两阶段发酵模式, 即好氧发酵增加菌体浓度, 厌氧阶段则生产丁二酸及产生乙酸、乳酸等副产物<sup>[5]</sup>。副产物的产生影响丁二酸的得率, 因此对菌株进行代谢工程改造, 减少副产物生成、强化丁二酸产生途径成为代谢改造的主要手段。大肠杆菌 NZN111 同时缺失编码乳酸脱氢酶的基因 *ldhA* 和丙酮酸甲酸裂解酶的基因 *pflB*, 在含葡萄糖培养基中生长受抑制<sup>[6]</sup>。Donnelly 等对 NZN111 进行葡萄糖耐受筛选, 成功筛选到编码葡萄糖磷酸转移酶基因 *ptsG* 的突变菌株 AFP111, 解除了葡萄糖对菌体的生长代谢抑制<sup>[7]</sup>。Vemuri 等改造 AFP111, 质粒过表达大肠杆菌本身没有而来源于枯

草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的催化丙酮酸合成草酰乙酸的丙酮酸羧化酶基因 *pyc*, 通过 5 L 发酵罐发酵和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH, 丁二酸得率达到 1.68 mol/mol 葡萄糖<sup>[8]</sup>, 为迄今为止丁二酸最高得率。但由于需要 IPTG 诱导表达, 成本较高且工艺控制难度大, 而且质粒容易丢失导致菌株性能不稳定, 限制了其工业化应用。

本研究以 AFP111 为出发菌株进行代谢工程改造, 通过敲除副产物乙酸生成的关键酶基因

*ackA-pta*、*tdcDE*, 同时过表达 *glk*, 旨在以非质粒型、无需诱导表达的方式提高丁二酸得率, 降低副产物乙酸产量, 并建立和优化 5 L 发酵罐发酵工艺, 在 100 L 发酵罐进行工艺放大。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、引物和培养基

实验所用菌株和质粒的相关信息见表 1, 引物相关信息见表 2。

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| 菌株和质粒<br>Strains and plasmids | 相关特性<br>Characteristics  | 来源<br>Sources  |
|-------------------------------|--|----------------|
| AFP111                        | <i>ΔldhA::Kan, ΔpflB::Cam, ptsG*</i>   | Lab collection |
| SX01                          | AFP111, <i>ΔackA-pta::FRT</i>  | This study     |
| SX02                          | SX01, <i>ΔtdcDE::FRT</i>   | This study     |
| SX03                          | SX02, M1-12- <i>glk::FRT</i>   | This study     |
| pKD46                         | Bla β γ exo (Red recombinase) temperature-conditional replicator, Amp                      | Lab stock      |
| pCP20                         | FLP recombinase helper plasmid, Amp  | Lab stock      |
| pIJ773                        | Template plasmid with Apramycin gene and FLP recognition target and FLP recognition target | Lab stock      |

Note: \*: with mutation.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

| Primers                | Primers sequence (5'→3')   |
|------------------------|--|
| <i>ackA-pta</i> -up    | <u>ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTGAACTGCGGTAGTTCTTCACTGAA</u> TAAGCTTGATATTCGGGGATCCG  |
| <i>ackA-pta</i> -down  | TTACTGCTGCTGTGCAGACTGAATCGCAGTCAGCGCGATGGTGTAGACGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC   |
| <i>ackA-ptajd1</i>     | ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGG   |
| <i>ackA-ptajd2</i>     | TTACTGCTGCTGTGCAGA   |
| <i>tdcDE</i> -up       | <u>TCAGAGCGCCTGGGTAAAGGTACGTGAAATAACATCCTGTTGCTGTTCACTAAGCTTGATATTCGGGGATCCG</u>   |
| <i>tdcDE</i> -down     | <u>ATGAATGAATTTCCGGTTGTTTTGGTTATTA</u> ACTGTGGTTCGCTCTCGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC   |
| <i>tdcDEjd1</i>        | ATAACATCCTGTTGCTGTTC   |
| <i>tdcDEjd2</i>        | GGTTATTAACTGTGGTTCGTC  |
| <i>aac</i> -up         | TAAGCTTGATATTCGGGGATCCG  |
| <i>aac</i> -M1-12-down | <u>AGCTGTTTCCTGGTTTAA</u> ACTGACTGACGCACCAAAAGGGCTCAATTATATCAACGTTGTTATCTCTTGTCAA<br><u>CACCGCCAGAGATA</u> AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC |
| <i>aac</i> -M1-12-1    | <u>CATCGCTGCAATTGGTGCTGAAACGATAAA</u> AGTAATTGTGTGACCCAGATCTGACCTAAGCTTGATATTCGGGGATCCG  |
| <i>aac</i> -M1-12-2    | <u>AGACGTGCGTTGGTGCCGCCACATC</u> ACCGACTAATGCATACTTTGTCATAGCTGTTTCCTGGTTTAAACTG  |
| <i>glkj1</i>           | GTAATTGTGCAGATC  |
| <i>glkj2</i>           | CGACTAATGCATACTTTGTCAT   |

注: M1-12 启动强度为 LacZ 启动强度的 0.1 倍<sup>[9]</sup>; NNNNN: 改造基因的同源臂序列(50 bp); NNNNN: M1-12 启动子序列(88 bp).  
Note: M1-12 promoter was 0.1 times that of the induced *E. coli* LacZ promoter<sup>[9]</sup>; NNNNN: The modified gene homologous arm (50 bp); NNNNN: The sequence of M1-12 promoter (88 bp).

种子培养基(LB, g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。固体培养基加入 1.5% (质量体积比)琼脂粉。

发酵培养基:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  11.6 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.1 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g/L, 葡萄糖 2.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, 玉米浆 25.0 mL/L, pH 7.0。

根据需要添加 Amp (氨苄青霉素)、Kan (卡那霉素)、Apra (阿普拉霉素)至终浓度分别为 100、50、50 mg/L。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

酵母抽提物和胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 玉米浆购自杭州宝晶生物股份有限公司; 碱式  $\text{MgCO}_3$  购自上海泗联化工厂有限公司;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  购自中盐安徽红四方股份有限公司; 其它相关试剂为国药分析纯。

胶回收试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒、抗生素、PCR 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; DL5000 Marker、2×T5 Super PCR mix (Colony), 北京擎科新业生物技术有限公司; *FastPfu* Fly DNA Polymerase、dNTPs, 北京全式金生物技术有限公司; 异柠檬酸裂解酶(ICL)、丙酮酸激酶(Pyk)、苹果酸脱氢酶(Mdh)酶活测定试剂盒, 北京索莱宝有限公司; AckA 酶活测定试剂盒, 上海大齐生物股份有限公司。

电转仪, Eppendorf公司; 发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; 超声破碎仪, 宁波海曙科生超声设备有限公司; 高效液相色谱分析仪, 安捷伦公司; SBA-40C 生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所。

## 1.2 方法

### 1.2.1 乙酸产生关键酶基因 *ackA-pta*、*tdcDE* 的敲除

一步重叠 PCR 获得同源重组片段(同源序列为目的改造基因始末各 50 bp)。

PCR 体系(500  $\mu\text{L}$ ): 无菌水 320  $\mu\text{L}$ , 5×Fly buffer 100  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 40  $\mu\text{L}$ , *ackA-pta/tdcDE*-up/down 引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 10  $\mu\text{L}$ , pIJ773 质粒 10  $\mu\text{L}$ ,

*FastPfu* Fly DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将产物使用胶回收试剂盒回收浓缩至 120  $\mu\text{L}$ , 取 40  $\mu\text{L}$  进行电转化。

利用一步同源重组法进行基因敲除<sup>[10]</sup>。利用  $\text{CaCl}_2$  法制备菌体感受态后转化 pKD46 质粒, 利用 Amp 抗性挑取转化成功菌株, 30 °C、200 r/min 培养 8 h, 制备超级感受态进行电转化(2 500 V, 3 ms), 将电转化后菌液浓缩 100  $\mu\text{L}$  涂布于 Apra 抗性平板, 30 °C 培养 36 h, 挑取平板转化子进行 PCR 验证, 分别以原始菌株基因组和菌液为模板进行验证。PCR 体系(25  $\mu\text{L}$ ): 无菌水 11  $\mu\text{L}$ , 2×T5 Super PCR mix 11  $\mu\text{L}$ , *ackA-pta/tdcDE*-jd1/jd2 引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , 菌液(无菌水稀释至 50  $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$  或 1  $\mu\text{L}$  原始菌株基因组为模板。PCR 条件: 98 °C 2 min; 98 °C 20 s, 48 °C 20 s, 72 °C 50 s, 25 个循环; 72 °C 5 min。首先挑取经过 PCR 验证改造成功的菌株于含 Apra 终浓度为 50 mg/L 的 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 8 h 后将温度调至 42 °C 培养过夜, 进行 pKD46 温敏质粒的敲除。根据抗性筛选, 可在 Kan、Apra 抗性生长而在 Amp 抗性下不生长即为成功消除 pKD46 的菌株。随后转化 pCP20 质粒, 利用 Amp 抗性挑取转化成功菌株, 30 °C、200 r/min 培养 8 h 后 42 °C 培养过夜, 利用抗性筛选挑取只在 Kan 抗性下生长而不能在 Apra、Amp 抗性下生长的菌株, 即为成功消除了 pCP20 质粒和 Apra 抗性标记(含一个 FRT 位点), 该菌株可进行下一基因改造。

### 1.2.2 丁二酸生成途径 *glk* 启动子改造

两步重叠 PCR 获得同源重组片段。

第一步 PCR 扩增含有启动子抗性片段。PCR 体系(100  $\mu\text{L}$ ): 无菌水 64  $\mu\text{L}$ , 5×Fly buffer 20  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 8  $\mu\text{L}$ , *aac-up/aac-M1-12-glK-down* 引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ , pIJ773 质粒 2  $\mu\text{L}$ , *FastPfu* Fly DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物使用胶回收

试剂盒回收浓缩至 50  $\mu\text{L}$ 。

第二步 PCR 扩增含有目的改造基因同源臂片段。PCR 反应体系(500  $\mu\text{L}$ )各成分用量与 1.2.1 中同体系用量相同, 此时引物为 *aac-M1-12-1/2*, 无菌水 320  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$ Fly buffer 100  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 40  $\mu\text{L}$ , *aac-M1-12-1/2* 引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 10  $\mu\text{L}$ , *FastPfu* Fly DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 模板为第一步回收产物 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。该扩增片段替换 *glk* 基因 ATG (起始密码子)上游 100 bp 基因序列。PCR 产物使用胶回收试剂盒浓缩至 120  $\mu\text{L}$ , 取 40  $\mu\text{L}$  进行电转化。电转化条件及验证体系同 1.2.1, 此时使用引物对 *glkjd1/2* 进行鉴定。

### 1.2.3 培养方法

一级种子: -20  $^{\circ}\text{C}$  保存的甘油菌 50  $\mu\text{L}$  接种至 5 mL LB 液体培养基中, Kan 终浓度为 50 mg/L, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 8 h。

摇瓶发酵转接一级种子 100  $\mu\text{L}$  于 50 mL 发酵培养基中, Kan 终浓度为 50 mg/L, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  至 13 左右(好氧发酵), 将全部发酵液转至 100 mL 密闭蓝盖瓶(厌氧发酵), 加 5.0 g 糖和 5.0 g 碱式  $\text{MgCO}_3$  后 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养, 取样测量至葡萄糖浓度低于 3 g/L 时结束发酵。

5 L 发酵罐发酵: 取一级种子液 100  $\mu\text{L}$  于装有 50 mL LB 的 250 mL 三角瓶中, Kan 终浓度为 50 mg/L, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 16 h 作为二级种子。转接 1.5%二级种子于 3 L 装液量的发酵罐, 两阶段发酵。好氧阶段: 初始葡萄糖 10 g/L, 通气量 0.2  $\text{m}^3/\text{h}$ , 转速 250–550 r/min 控制溶氧高于 5%, 2 mol/L NaOH 调节 pH 为 7.0,  $OD_{600}$  至 13 左右转入厌氧发酵, 温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 。厌氧阶段: 转速 300 r/min, 温度 37  $^{\circ}\text{C}$ , 直接加固态葡萄糖至终浓度为 100 g/L。碱式  $\text{MgCO}_3$  为 pH 调节剂, 直接加入等质量碱式  $\text{MgCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 NaOH 混合碱液以自动调节 pH。

100 L 发酵罐发酵: 转接 600  $\mu\text{L}$  一级种子液于装液量 300 mL 的 1 000 mL 三角瓶共 3 瓶, 作为二

级种子, 转接 1.5%二级种子液于 100 L 发酵罐, 装液量 60 L, 两阶段发酵。好氧阶段: 初始葡萄糖 10 g/L, 通气量 4.0  $\text{m}^3/\text{h}$ , 转速 180–330 r/min 控制溶氧在 5% 以上, 2 mol/L NaOH 调节 pH 为 7.0, 温度 37  $^{\circ}\text{C}$ , 菌株培养  $OD_{600}$  至 13 左右转入厌氧发酵。厌氧阶段: 关闭空气阀门, 直接加入总葡萄糖 5.0 kg, 2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 0.5 mol/L NaOH 调节 pH 6.8, 温度 37  $^{\circ}\text{C}$ , 转速 200 r/min, 残糖低于 3 g/L 时结束发酵。

### 1.2.4 发酵及代谢产物分析

细胞生长量用分光光度计于波长 600 nm 处测定吸光度值, 葡萄糖含量利用 SBA-40C 生物传感分析仪测定。采用高效液相色谱仪测定丁二酸和乙酸的浓度, 色谱条件如下: Prevail Organic Acid 色谱柱, 流动相为 25 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液(pH 2.5), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测器检测波长 215 nm。

### 1.2.5 相关酶活测定

ICL、Pyk、AckA、Mdh 酶活测定按照试剂盒进行测定; Glk 酶活按照文献[11]测定磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Pck), 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Ppc)酶活按照文献[12]测定。

蛋白浓度采用 Bradford 试剂盒测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ackA-pta*、*tdcDE* 敲除及 *glk* 启动子改造鉴定结果

按照 1.2.1 和 1.2.2 方法扩增到大小为 1 480 bp 的 *ackA-pta*、*tdcDE* 敲除片段及 1 568 bp 的 *glk* 启动子改造片段(图略)。根据转化子的验证, 分别以基因组和突变菌液为模板, 使用引物对 *ackA-pta*jd1/2 鉴定扩增产物大小分别为 3 422 bp 和 1 759 bp, 表明 *ackA-pta* 被成功敲除(图 1)。引物对 *tdcDE*jd1/2 进行敲除鉴定的扩增产物大小分别为 3 537 bp 和 1 480 bp, 表明 *tdcDE* 被成功敲除(图 1)。使用 *glkjd1/2* 为引物鉴定改造结果, 扩增产物大小分别为 142 bp 和 1 510 bp (图 1), 表明 *glk* 被成功改造。随后 Apra 抗性片段、FRT 位点及 pKD46、pCP20 温敏质粒按照 1.2.1 所示方法验证消除。

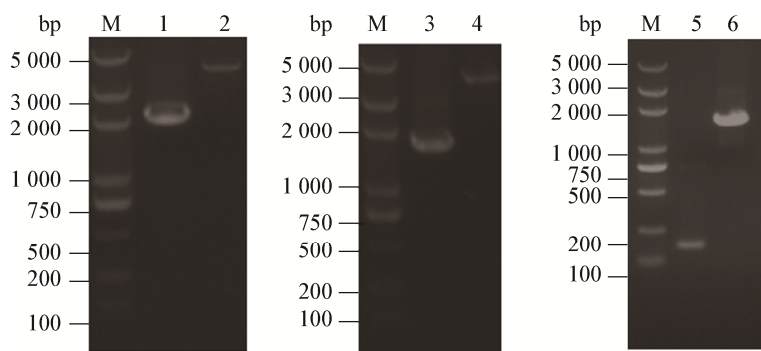


图1 *ackA-pta*、*tdcDE* 敲除和 *glk* 启动子改造电泳验证图

Figure 1 The agarose gel electrophoresis of deleting *ackA-pta*, *tdcDE* and rebuilding *glk* promoter

注: M: DL5000 标准; 1: *ackA-pta* 突变株 PCR 产物; 2: *ackA-pta* 野生型 PCR 产物; 3: *tdcDE* 突变株 PCR 产物; 4: *tdcDE* 野生型 PCR 扩增; 5: *glk* 野生型 PCR 产物; 6: *glk* 突变株 PCR 产物.

Note: M: DL5000 marker; 1: PCR product of mutation type *ackA-pta*; 2: PCR product of wild type *ackA-pta*; 3: PCR product of mutation type *tdcDE*; 4: PCR product of wild type *tdcDE*; 5: PCR product of wild type *glk*; 6: PCR product of mutation type *glk*.

## 2.2 代谢工程改造大肠杆菌对发酵结果的影响

### 2.2.1 代谢工程改造减少乙酸的形成

研究表明 *ackA-pta*、*tdcDE* 为乙酸产生途径关键基因<sup>[13]</sup>, *poxB* 对乙酸影响较小<sup>[14]</sup>, 丙酮酸氧化酶(PoxB)为膜蛋白, 保护辅酶 A 处于活化状态, 对大肠杆菌生长速率起决定性作用<sup>[15]</sup>, 因此主要敲除 *ackA-pta*、*tdcDE* 来减少乙酸生成。为进一步阐明该基因改造对丁二酸代谢途径关键酶活性的影响, 对丁二酸产生的关键酶进行酶活测定。Pyk 调节糖代谢流副产物与丁二酸之间的分配, Pck、Ppc、Mdh 酶活影响丁二酸得率, ICL 为乙醛酸途径关键酶。通过草酰乙酸-苹果酸-延胡索酸-丁二酸途径每生成 1 mol 丁二酸消耗 2 mol NADH, 而通过乙醛酸途径生成 1 mol 丁二酸消耗 1.25 mol NADH, 因此更有利于丁二酸生成<sup>[16]</sup>。酶活性的测定可初步探究基因改造对整体代谢的影响, 具体代谢途径如文献<sup>[13]</sup>所示。

### 2.2.2 乙酸关键酶基因 *ackA-pta* 敲除对发酵结果的影响

如表 3 所示, 以 AFP111 为出发菌株敲除 *ackA-pta* 获得的 SX01 菌株其乙酸产量下降了 44.86%, 丁二酸得率增加 4.55%, 丙酮酸含量下降了 39.53%, 丁二酸生产效率及葡萄糖利用速率分别下降了 2.56%、8.79%。同时, 表 4 的酶活测定结果

显示 Ack 酶活下降了 57.44%, 再次验证了 *ackA-pta* 敲除成功。ICL 酶活提高 1.36 倍, Pck、Ppc、Mdh 酶活分别较出发菌株提高 1.20、1.08、1.26 倍, Pyk 酶活下降了 97%, 从而使得磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)流向丁二酸生成加强, 因此丙酮酸含量下降。其中 Pyk 酶活下降是由于 *ackA-pta* 敲除后 acetyl-CoA 含量增加, 而 acetyl-CoA 是 Pyk 酶活的抑制剂<sup>[17]</sup>, 从而影响该酶活性。丁二酸生产效率和糖利用速率下降可能与敲除 *ackA-pta* 使得 ATP 减少而导致菌体代谢减慢有关。

### 2.2.3 乙酸关键酶基因 *tdcDE* 敲除对发酵结果的影响

虽然已敲除 *ackA-pta*, 但此时测定乙酸激酶依然具有活性, 表明菌体内存在与 Pta 功能相似的酶, TdcD 与 AckA 具有相似酶活<sup>[18]</sup>。由于 *tdcD* 和 *tdcE* 在基因组位置上紧邻, 在 SX01 菌株基础上, 敲除 *tdcDE* 获得菌株 SX02, 乙酸产量下降了 15.53%, 丁二酸得率提高 5.07% (表 3)。菌株 SX02 的 AckA 酶活测定为 0 (表 4), 再次表明 *tdcDE* 敲除成功。Pyk 酶活下降了 81%, 使得丙酮酸含量下降了 65.38%; Pck、Ppc、Mdh、ICL 酶活分别提高 1.87、1.12、1.13、1.21 倍, 增强了丁二酸生成途径。糖利用速率和丁二酸生产效率分别下降了 16.87%、13.16%, 可能与 ATP 进一步合成较少有关。

表 3 基因工程菌株摇瓶发酵结果

Table 3 The fermentation result of genetically engineered strains in flask

| 菌株<br>Strain | 糖利用速率<br>Glucose utilization rate (g/(L·h)) | 生产效率<br>Productivity (g/(L·h)) | 丁二酸得率<br>Succinate yield (mol/mol) | 丁二酸<br>Succinate (g/L) | 乙酸<br>Acetate (g/L) | 丙酮酸<br>Pyruvate (g/L) |
|--------------|---|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| AFP111       | 0.91±0.02                                   | 0.78±0.03                      | 1.32±0.06                          | 86.21±4.21             | 17.52±2.41          | 0.86±0.04             |
| SX01         | 0.83±0.01                                   | 0.76±0.08                      | 1.38±0.04                          | 90.78±1.53             | 9.66±0.98           | 0.52±0.11             |
| SX02         | 0.69±0.03                                   | 0.66±0.02                      | 1.45±0.01                          | 95.21±2.05             | 8.16±0.39           | 0.18±0.03             |
| SX03         | 1.04±0.05                                   | 1.07±0.01                      | 1.57±0.03                          | 102.76±1.59            | 5.58±0.36           | 0.05±0.08             |

表 4 基因工程菌株酶活测定结果

Table 4 The enzyme activity result of genetically engineered strains [nmol/(min·mg protein)]

| 菌株<br>Strains | 酶 Enzymes  |            |            |             |             |            |              |
|---------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|--------------|
|               | Glk        | Pck        | Ppc        | ICL         | AckA        | Pyk        | Mdh          |
| AFP111        | —          | 32.05±2.35 | 15.31±2.93 | 58.24±3.12  | 219.02±3.42 | 71.09±3.36 | 338.15±13.82 |
| SX01          | —          | 38.55±8.17 | 16.52±1.35 | 79.21±7.91  | 93.22±6.32  | 68.76±4.22 | 427.72±10.33 |
| SX02          | 21.38±3.55 | 45.75±5.39 | 18.58±2.31 | 100.74±2.53 | 0           | 55.72±2.15 | 483.72±15.13 |
| SX03          | 78.22±5.28 | 49.43±5.27 | 21.33±5.03 | 134.69±5.42 | —           | 51.09±3.36 | 525.35±8.77  |

注：—：该酶活未检测；所有酶活为好氧培养结束时测定。

Note: —: Not detected; All the enzyme activity were measured after aerobic fermentation.

2.2.4 *glk* 启动子改造对大肠杆菌发酵生产丁二酸的影响

虽然丁二酸得率在减少乙酸产量过程中得到增加，但丁二酸生产效率及葡萄糖利用速率下降，因此考虑增加葡萄糖利用速率以期提高丁二酸得率。大肠杆菌内有 2 种葡萄糖转运途径：(1) PTS 葡萄糖转运系统，以 PEP 为磷酸供体；(2) GalP/Glk 葡萄糖转运系统，以 ATP 为磷酸供体<sup>[19]</sup>。AFP111 菌株是 *ptsG* 突变菌株，*ptsG* 突变使该酶酶活下降，减弱葡萄糖抑制现象，提高 PEP 含量，减少丙酮酸积累，提高丁二酸浓度<sup>[20]</sup>。Lu 等在 PTS 突变菌株中过表达 *galP* 及 *glk*，结果发现单独过表达 *glk* 更能显著提高葡萄糖利用效率<sup>[9]</sup>。

在 SX02 菌株基础上对 *glk* 启动子改造获得菌株 SX03，较 SX02 的 Glk 酶活提高 3.66 倍，葡萄糖利用速率提高了 50.72%，丁二酸得率提高了 8.28%，生产效率提高了 62.12%，乙酸产量下降了 31.62%，丙酮酸含量下降了 72.22%。推测产生该现象的原因是：在 *ptsG* 突变菌中，由于 PTS 系统糖转运减弱，使得 GalP/Glk 葡萄糖转运系统的糖转运功能加强，而本文过表达 *glk* 后提高了 Glk 酶活，使 GalP/Glk 转运系统的糖转运效率进一步加强，更

进一步减弱了 PTS 系统糖转运效率，PEP 含量增加，丙酮酸含量降低。通过 SX03 酶活测定，Pyk 酶活下降了 92%，Pck、Ppc、Mdh、ICL 酶活分别较菌株 SX02 提高 1.19、1.15、1.09、1.34 倍，更进一步从代谢机制上解释了过表达 *glk* 使丁二酸提高的原因。

2.3 碱式  $MgCO_3$  为 pH 中和剂的 AFP111 和 SX03 菌株 5 L 发酵罐发酵结果对比

代谢工程菌株 SX03 的摇瓶发酵结果表明该菌株具有进一步发酵放大的潜质，因此将其进行 5 L 发酵罐放大发酵验证。发酵结果如图 2 所示，出发菌株 AFP111 产生乙酸 16.38 g/L，产生丁二酸 83.58 g/L (终体积 3.2 L)，生产效率为 0.91 g/(L·h)，丁二酸得率为 1.36 mol/mol 葡萄糖；菌株 SX03 产生乙酸 3.97 g/L，产生丁二酸 98.92 g/L，生产效率为 1.57 g/(L·h)，丁二酸得率为 1.62 mol/mol 葡萄糖，相比出发菌株 AFP111，乙酸产量下降了 75.76%，生产效率提高 72.52%，丁二酸得率提高 19.12%。

2.4  $Na_2CO_3$  为 pH 中和剂的 SX03 菌株 5 L 发酵罐厌氧阶段发酵条件优化

2.4.1 pH 和转速优化

$MgCO_3$  对菌体代谢具有促进作用，因为  $Mg^{2+}$



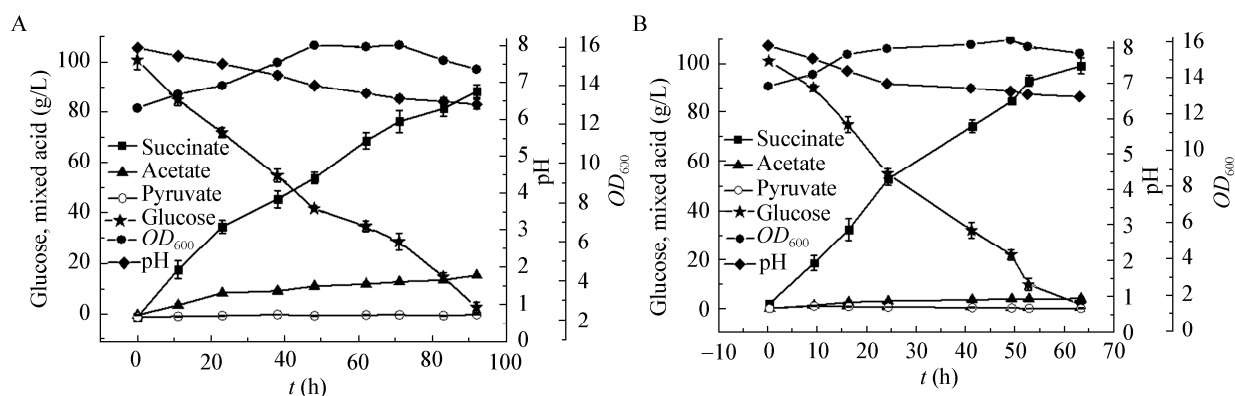


图2 菌株 AFP111 (A)和 SX03 (B)厌氧阶段发酵结果

Figure 2 The fermentation results by AFP111 (A) and SX03 (B) in anaerobic phase

是多种代谢酶的辅酶<sup>[21]</sup>,但其价格昂贵。 $\text{CaCO}_3$ 抑制菌体生长代谢,使菌体产丁二酸较困难, $\text{NaHCO}_3$ 和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 调节 pH 时糖利用率较高,但是由于两者在进行 pH 调节时对发酵液产生稀释作用,尤以 $\text{NaHCO}_3$ 稀释作用较明显<sup>[22]</sup>。各调节剂市场价格大致为 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 600 元/t、 $\text{NaHCO}_3$  1 800 元/t、 $\text{MgCO}_3$  3 600 元/t,因此选用 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 作为 pH 调节剂不仅降低发酵液的稀释,更有利于工业化降低成本。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 作为 $\text{MgCO}_3$ 的替代 pH 调节剂,碱性中和性较低,因此加入 0.5 mol/L NaOH 为混合 pH 调节剂,NaOH 可抑制 $\text{HCO}_3^-$ 水解,减少 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 加入。

相关研究表明发酵液 pH 为影响菌体生成丁二

酸的重要因素<sup>[23]</sup>,因此需要对 pH 进行梯度优化。如图 3A 所示, pH 6.8 时,丁二酸产量为 68.82 g/L,得率为 1.61 mol/mol 葡萄糖,乙酸产量为 2.67 g/L,生产效率为 0.80 g/(L·h)。

搅拌转速影响物质间接触面积,从而对发酵产物产生影响<sup>[24]</sup>。优化结果如图 3B 所示,转速 250 r/min 条件下产丁二酸得率较高,丁二酸产量为 72.33 g/L,得率为 1.66 mol/mol,达到丁二酸的最大理论得率 1.71 mol/mol 葡萄糖<sup>[25]</sup>的 96.51%,乙酸产量为 2.24 g/L,生产效率为 0.85 g/(L·h)。可能由于该转速下罐体剪切力对菌体代谢损伤较小,从而提高了丁二酸含量,减少了乙酸生成。

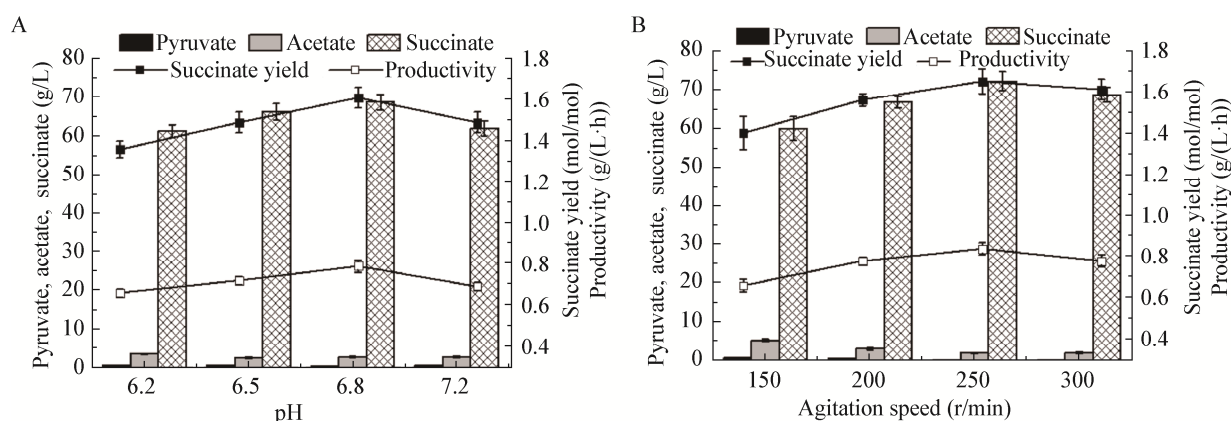


图3 菌株 SX03 厌氧阶段 pH (A)与转速(B)优化结果

Figure 3 The optimization results of pH (A) and agitation speed (B) by SX03 in anaerobic phase



### 2.4.2 葡萄糖浓度优化

不同葡萄糖浓度对菌体代谢抑制程度不同, 虽然高糖使菌体代谢缓慢, 有时甚至产生抑制现象, 但高糖浓度可使菌体更充分利用原料, 产生较高浓度丁二酸<sup>[22]</sup>。pH 6.8、转速 250 r/min 条件下, 探究厌氧阶段的初始葡萄糖浓度对发酵结果的影响。如图 4A 所示, 100 g/L 葡萄糖时丁二酸得率较高。根据以上优化结果表明在 pH 中和剂替换后, 优化后 pH 6.8、转速 250 r/min、葡萄糖浓度 100 g/L 条件下发酵生产丁二酸, 丁二酸得率为 1.66 mol/mol 葡萄糖, 乙酸产量为 2.24 g/L, 相比以碱式  $\text{MgCO}_3$  为 pH 中和剂的丁二酸得率变化不大, 但乙酸质量下降 20.65%。

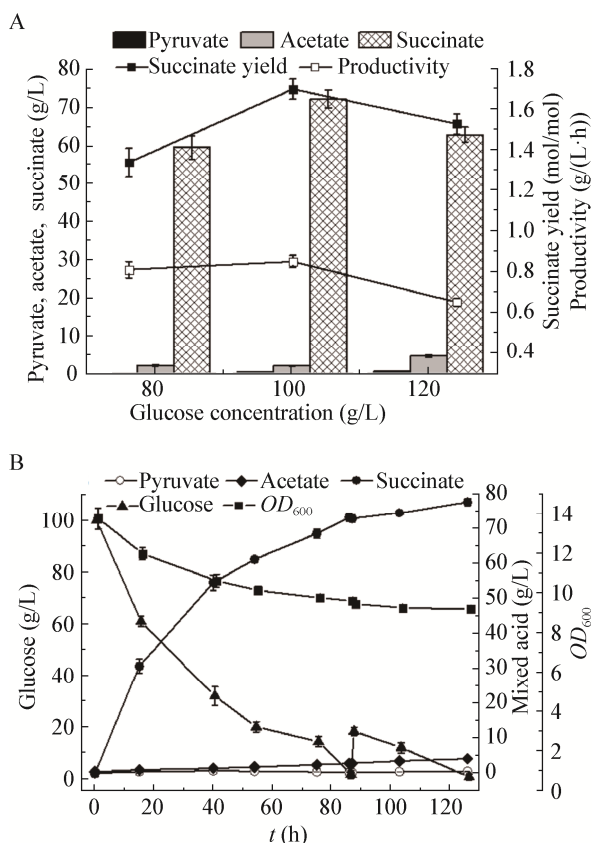


图 4 菌株 SX03 厌氧阶段葡萄糖浓度优化结果

Figure 4 The optimization results of glucose concentration by SX03 in anaerobic phase

注: A: 分批发酵; B: 分批补料发酵。

Note: A: Batch fermentation; B: Batch feeding fermentation.

利用 pH、转速、初始糖浓度优化后的条件, 探索分批补料发酵对丁二酸得率的影响。当葡萄糖消耗完全, 再次补加终浓度为 20 g/L 葡萄糖, 最终生成 77.90 g/L 丁二酸, 终体积 4.7 L, 丁二酸得率为 1.44 mol/mol 葡萄糖, 乙酸 4.13 g/L。如图 4B 所示, 补料后厌氧阶段糖耗速率下降了 20%且丁二酸得率下降了 14.46%。相关研究表明  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  调节 pH 利用 *Actinobacillus succinogenes* 发酵生产丁二酸, 中后期出现菌体絮凝现象<sup>[22]</sup>, 本文后期菌体代谢缓慢及副产物含量上升可能由于菌体絮凝引起, 因此推测采用直接分批发酵相比补料发酵可能更有利于高产丁二酸及减少副产物乙酸的生成。

### 2.5 SX03 菌株 100 L 罐发酵结果

基于以上 5 L 发酵罐工艺, 对菌株 SX03 进行 100 L 发酵罐发酵放大验证, 发酵结果如图 5 所示, 厌氧发酵 67 h, 终体积 82 L, 产丁二酸 51.95 g/L, 产乙酸 1.91 g/L, 丁二酸得率为 1.30 mol/mol 葡萄糖, 生产效率为 0.79 g/(L·h)。结果表明该改造菌株的乙酸产量始终维持在较低水平, 改造取得了较大成功。但相比 5 L 发酵罐丁二酸得率降低, 其原因主要在于放大过程中传质、装液量以及剪切力等条件发生改变, 影响菌体代谢, 从而对丁二酸得率产生影响。因此下一步可对 100 L 发酵罐工艺作调整, 以期提高丁二酸得率。

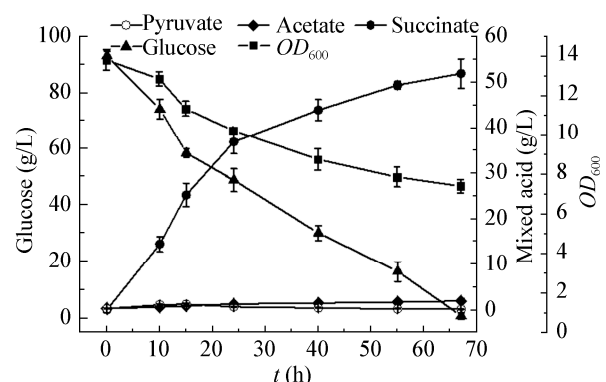


图 5 菌株 SX03 的 100 L 发酵罐厌氧阶段发酵结果

Figure 5 The fermentation results by SX03 in a 100-L fermentor in anaerobic phase

### 3 讨论与结论

微生物发酵法生产丁二酸,国外有小规模生产模式,但国内由于相关研究起步较晚,目前并未实现全面工业化生产。为推进发酵法生产丁二酸进程,同时达到节约能源的目的,构建高产丁二酸菌株及节约成本成为考虑的主要问题。本文选择 AFP111 为出发菌株进行代谢工程改造,敲除 *ackA-pta* 获得菌株 SX01,经酶活测定发现 Pck 酶活相比 Ppc 酶活提高较多,可能由于发酵培养基中含有玉米浆所致,相关研究表明当培养基中含有玉米浆时,玉米浆中的天冬氨酸和苹果酸对谷氨酸棒状杆菌中 Ppc 酶具有抑制作用<sup>[26]</sup>。同时 ICL 酶活提高,增强了乙醛酸途径,该结果与 Zhu 等敲除副产物产生基因后对菌株代谢流分析表明敲除 *ackA-pta* 可显著增强乙醛酸途径生成丁二酸的结论一致<sup>[16]</sup>。随后敲除 *tdcDE* 及过表达 *glk*,获得一株高产丁二酸菌株 SX03,5 L 罐发酵放大培养,乙酸产量为 3.97 g/L,丁二酸得率为 1.62 mol/mol 葡萄糖,相比出发菌株 AFP111 同等条件下乙酸产量下降了 75.76%,丁二酸得率提高 19.12%。Ma 等通过基因改造获得重组菌株 *E. coli* BA106,引入质粒以及使用 IPTG 诱导表达,3 L 罐发酵  $\text{MgCO}_3$  调节 pH 条件下,丁二酸得率为 1.09 mol/mol 葡萄糖<sup>[27]</sup>,本研究的丁二酸得率与其相比具有发酵竞争优势。

基于经济考虑,为进一步降低生产成本,以 NaOH 和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  混合碱液为 pH 调节剂替换  $\text{MgCO}_3$ ,优化替换 pH 中和剂后厌氧发酵条件,优化结果为 pH 6.8、转速 250 r/min、发酵 100 g/L 葡萄糖,生成乙酸 2.24 g/L,丁二酸得率为 1.66 mol/mol 葡萄糖,相比碱式  $\text{MgCO}_3$  为 pH 中和剂乙酸产量下降了 20.65%,丁二酸得率提高 2.47%。由于 pH 中和剂的替换,每生产 1 t 丁二酸可降低生产成本 2 000 元左右。丁二酸得率相比 Vemuri 等的以  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  为 pH 中和剂所获得的迄今最大丁二酸得率 1.68 mol/mol 葡萄糖相差不大<sup>[8]</sup>,但本文改造菌株发酵未引入质粒及使用诱导剂 IPTG,避免了由于质

粒在长期发酵中易丢失,以及使用 IPTG 增加生产成本的问题,具有发酵竞争优势。

本研究首次对改造高产菌株进行 100 L 发酵罐发酵初试,乙酸产量为 1.91 g/L,丁二酸得率为 1.30 mol/mol 葡萄糖。丁二酸得率高于赵锦芳等对基因改造 *Escherichia coli* 在 15 L 罐发酵,丁二酸得率的 1.16 mol/mol 葡萄糖<sup>[28]</sup>,同时高于 Li 等对基因改造 *Escherichia coli* 在 7 L 罐发酵丁二酸得率的 1.23 mol/mol 葡萄糖<sup>[29]</sup>。

本研究构建了一株高产丁二酸大肠杆菌,降低了副产物乙酸含量,提高了丁二酸得率,完成 5 L 发酵罐工艺优化,获得了制备丁二酸较优的发酵工艺,降低了发酵法制备丁二酸成本;初步 100 L 罐发酵验证表明该菌株具有工业化应用潜质。虽然相比 5 L 罐发酵丁二酸得率下降,由于此时 100 L 罐发酵为初试阶段,后期可通过进一步对发酵工艺进行优化,推动进一步发酵放大。

### REFERENCES

- [1] Chen KQ, Jiang M, Wei P, et al. Kinetic models for anaerobic fermentation of butanedioic acid[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2008, 59(11): 2819-2823 (in Chinese)  
陈可泉,姜岷,韦萍,等. 厌氧发酵生产丁二酸的动力学模型[J]. 化工学报, 2008, 59(11): 2819-2823
- [2] Yang RH, Yang XJ. Research progress of production technology on succinic acid[J]. Synthetic Technology and Application, 2015(2): 33-39 (in Chinese)  
杨如惠,杨效军. 丁二酸生产工艺技术进展[J]. 合成技术及应用, 2015(2): 33-39
- [3] Yue FF, Jiang M, Ma JF, et al. Construction of engineered *Escherichia coli* for succinate production[J]. China Brewing, 2010, 29(2): 25-29 (in Chinese)  
岳方方,姜岷,马江锋,等. 产琥珀酸大肠杆菌工程菌株的构建[J]. 中国酿造, 2010, 29(2): 25-29
- [4] Jiang M, Ma JF, Chen KQ, et al. The progress of recombinant *Escherichia coli* for production of succinic acid[J]. Microbiology China, 2008, 36(1): 120-124 (in Chinese)  
姜岷,马江锋,陈可泉,等. 重组大肠杆菌产琥珀酸研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 36(1): 120-124
- [5] Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids[J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9(3): 268-274
- [6] Stols L, Donnelly MI. Production of succinic acid through over-expression of  $\text{NAD}^+$ -dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant[J]. Applied and Environmental

- Microbiology, 1997, 63(7): 2695-2701
- [7] Donnelly MI, Millard CS, Clark DP, et al. A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998, 70-72: 187-198
- [8] 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[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, 28(6): 325-332
- [9] Lu J, Tang JL, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2455-2462
- [10] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [11] Tang JL, Zhu XN, Lu J, et al. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2513-2520
- [12] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(48): 20180-20185
- [13] Jantama K, Zhang XL, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 101(5): 881-893
- [14] Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2001, 147(6): 1483-1498
- [15] Liu ZW, Xue YP, Zhen YG. Controlling acetic acid in recombinant *Escherichia coli* fermentations[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2014, 43(2): 21-26 (in Chinese)  
刘兆巍, 薛亚平, 郑裕国. 重组大肠杆菌发酵过程中乙酸的控制[J]. 发酵科技通讯, 2014, 43(2): 21-26
- [16] Zhu LW, Li XH, Zhang L, et al. Activation of glyoxylate pathway without the activation of its related gene in succinate-producing engineered *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2013, 20: 9-19
- [17] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 79 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 79
- [18] Meng G, Wei AY, Jia HP, et al. Construction of a *tdcD* gene deletion strain of *Escherichia coli* and the study of its application in L-tryptophan fermentation process with high glucose tolerance[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2015, 44(2): 12-16 (in Chinese)  
孟刚, 魏爱英, 贾慧萍, 等. 大肠杆菌 *tdcD* 基因缺失株的构建及其用于耐高糖 L-色氨酸发酵的研究[J]. 发酵科技通讯, 2015, 44(2): 12-16
- [19] Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4: 14
- [20] 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*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005, 32(3): 87-93
- [21] Podkovyrov SM, Zeikus JG. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase, a catabolic CO<sub>2</sub>-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(2): 223-228
- [22] Yang ZN, Jiang M, Li J, et al. Effects of different neutralizing agents on succinate production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(11): 1500-1506 (in Chinese)  
杨卓娜, 姜岷, 李建, 等. 不同 pH 调节剂对产琥珀酸放线杆菌 NJ113 发酵产丁二酸的影响[J]. 生物工程学报, 2010, 26(11): 1500-1506
- [23] Zheng P, Zhou W, Ni Y, et al. Environmental factors affecting the succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(6): 1051-1055 (in Chinese)  
郑璞, 周威, 倪晔, 等. 环境因素对琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 发酵生产丁二酸的影响[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 1051-1055
- [24] Chen KQ, Jiang M, Su L, et al. CO<sub>2</sub> fixation by *Actinobacillus succinogenes* in succinic acid production[J]. Chemical Engineering, 2009, 37(1): 49-52 (in Chinese)  
陈可泉, 姜岷, 苏漂, 等. 产琥珀酸放线杆菌固定 CO<sub>2</sub> 制备丁二酸[J]. 化学工程, 2009, 37(1): 49-52
- [25] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 99(5): 1140-1153
- [26] 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*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 148-154
- [27] Ma JF, Gou DM, Liang LY, et al. Enhancement of succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli* with co-expression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase and pyruvate carboxylase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15): 6739-6747
- [28] Zhao JF, Hua BW, Wang YZ, et al. The construction and anaerobic fermentation of high yield succinic acid recombinant *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(1): 6-10 (in Chinese)  
赵锦芳, 华渤文, 王永泽, 等. 高产琥珀酸重组大肠杆菌的构建及厌氧发酵[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 6-10
- [29] Li YK, Li MJ, Zhang X, et al. A novel whole-phase succinate fermentation strategy with high volumetric productivity in engineered *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2013, 149: 333-340