DOI:10.12441/spyswjs.20240223004 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0066-12

大肠杆菌耐受性改造提高琥珀酸产量

潘静宇[1] 唐永圣[1] 刘 佳[1] 高 聪[1] 李晓敏[1] 宋 伟[2] 魏婉清[1]
胡贵鹏[2] 吴 静[2] 刘立明[1] 陈修来[1*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生命科学与健康工程学院,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】提高大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的高渗透压耐受性,实现琥珀酸的高效生产。【方法】通过适应性进化、转录组学分析、反向代谢工程改造和发酵优化等策略,筛选具有高渗透压耐受能力的*E. coli*。【结果】通过分析琥珀酸发酵生产的关键影响因素,确定了渗透压是导致琥珀酸生产效率降低的关键因素。通过适应性进化策略,筛选获得了一株能够耐受高渗透压的突变菌株*E.coli* FN-6。借助转录组学分析,获得了与渗透压耐受性相关的关键靶点基因*cusC*,并通过优化*cusC*基因表达水平,构建了高渗透压耐受菌株*E. coli* FN-20。在 5 L 发酵罐中,菌株*E. coli* FN-20 的琥珀酸产量、产率和生产强度分别达到了 145.27 g/L、90.0% 和 2.01 g/(L·h)。【结论】筛选的高渗透压耐受性*E. coli* FN-20 实现了琥珀酸的高效生产,这为推动琥珀酸的工业化生产提供了新的思路,同时为发酵法生产其他高附加值化学品提供了借鉴。

关键词:大肠杆菌;琥珀酸;渗透压;适应性进化;细胞活力

Engineering *Escherichia coli* Tolerance to Improve Succinic Acid Production

PAN Jingyu[1] *TANG Yongsheng*[1] *LIU Jia*[1] *GAO Cong*[1] *LI Xiaomin*[1] *SONG Wei*[2]
WEI Wanqing[1] *HU Guipeng*[2] *WU Jing*[2] *LIU Liming*[1] *CHEN Xiulai*[1*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to enhance the high osmotic pressure tolerance of *Escherichia coli* (*E. coli*) for the efficient production of succinic acid. [**Method**] Adaptive evolution, transcriptomic analysis, reverse metabolic engineering, and fermentation optimization were employed for improving *E. coli* tolerance to high osmotic pressure. [**Result**] By analyzing the key factors influencing succinic acid production by fermentation, osmotic pressure was identified as the critical factor reducing succinic acid production efficiency . A mutant strain, *E. coli* FN-6, with tolerance to high osmotic pressure was obtained through adaptive evolution. The key gene *cusC* responsible for osmotic pressure tolerance was identified by transcriptomic analysis. After optimization of the expression level of *cusC*, the engineered strain *E. coli* FN-20 showed strong tolerance to high osmotic pressure. In a 5 L fermenter with *E. coli* FN-20, the succinic acid titer, yield, and productivity were up to 145.27 g/L, 90.0%, and 2.01 g/(L·h), respectively. [**Conclusion**] The obtained *E. coli* FN-20 strain with tolerance to high osmotic pressure enabled efficient production of succinic acid. This provides a new approach for the industrial production of succinic acid and provides the reference for producing other high value-added chemicals by fermentation.

Keywords: *Escherichia coli*; succinic acid; osmotic pressure; adaptive evolution; cell viability

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK20211529);江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(23)2005)。

通信作者:陈修来(1985—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事系统代谢工程与合成生物学研究。E-mail:xlchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-02-23 **修回日期:**2024-03-17

琥珀酸作为一种四碳二羧酸，主要应用于农业、食品、化学等领域[1]。琥珀酸因其良好的应用价值，在2010年被美国能源部列为5种最有前景的生物基平台化学品之一[2]。由于传统的化学合成法生产琥珀酸具有操作复杂、高能耗和反应条件苛刻等弊端[3]，因此生物法合成琥珀酸引起了越来越多的关注。目前，琥珀酸生产菌株主要包括产琥珀酸放线杆菌、产琥珀酸曼氏杆菌、酿酒酵母和*E. coli*等[4-5]。其中，*E. coli*能够在厌氧条件下积累琥珀酸[6]，且具有清晰的遗传背景以及成熟的基因操作手段[7]，因此成为生产琥珀酸的关键菌种之一。

目前，多种代谢工程策略已经用于改造*E. coli*以提高琥珀酸的产量、产率以及生产强度，主要策略包括5个方面。第一，阻断冗余路径。*E. coli*在进行厌氧发酵时，会产生甲酸、乙酸和乳酸等副产物，严重影响了琥珀酸的产量和产率[8]。因此，通过阻断冗余路径能够有效提高琥珀酸的积累。例如，在*E. coli* NZN111中敲除*pflB*和*ldhA*并过表达苹果酸脱氢酶（MDH），琥珀酸产量和产率分别达到31.9 g/L和78.0%[9]。第二，提高代谢通量。磷酸烯醇式丙酮酸通过固定一分子的CO_2合成草酰乙酸是琥珀酸合成路径中的关键步骤[7]。通过过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PPC）能够加强羧化反应，提高草酰乙酸的积累[10]。例如，在*E. coli* JCL1208中过表达内源PPC，琥珀酸的产量和产率分别提高了3.75倍和3.50倍[11]。第三，调控NADH/NAD^+比例。适当的NADH/NAD^+比例对许多生物合成过程至关重要，也是*E. coli*合成琥珀酸的关键[12]。在*E. coli* SBS550MG中引入假丝酵母中的NAD^+依赖型甲酸脱氢酶（FDH1），琥珀酸生产强度从1.4 g/（L·h）提高到2.0 g/（L·h）[13]。第四，强化琥珀酸外排能力。发酵过程中，外排能力不足会影响琥珀酸最终的产量和产率[14]。通过在*E. coli* Suc-T110中优化转运蛋白DcuB和DcuC的表达，琥珀酸产量和产率分别提高至43.19 g/L和92.0%[15]。第五，提高胞内ATP含量。通过在*E. coli*中异源表达产琥珀酸放线杆菌的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶，促进ATP积累，使琥珀酸产量提高了5.5倍[16]。尽管上述策略有效提高了*E. coli*生产琥珀酸的产量和产率，但是发酵过程中琥珀酸的积累使发酵体系的渗透压逐渐增加，严重影响*E. coli*的生长和生存[17]，从而导致发酵后期生产性能降低。

作者拟利用适应性进化、转录组学分析、反向代谢工程以及发酵优化等策略，筛选一株耐高渗菌株，以实现琥珀酸的高效生产，进而为琥珀酸的工业化生产提供新的思路，同时为发酵法生产其他高附加值化学品提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

E.coli BL21用于表达载体的构建，*E.coli* N-26用作代谢工程改造的底盘，*E.coli* MG1655的基因组用作扩增目标基因的模板，其中*E. coli* N-26为保藏的琥珀酸生产菌株[16]。所使用的重组质粒见表1，基因工程菌株见表2，引物见表3。

1.1.2 仪器和试剂

PCR扩增仪：S1000型，美国Bio-Rad公司；核酸电泳仪：Mini-Sub Cell GT System型，美国Bio-Rad公司；凝胶成像仪：ChemiDoc MP型，美国Bio-Rad公司；电转仪：Criterion型，美国Bio-Rad公司；恒温培养箱：HWJ-3-160型，上海跃进医疗器械有限公司；分光光度计：UV1800型，日本岛津公司；生物传感器分析仪：M-100型，山东省科学院生物研究所；渗透压仪：SMC-30D型，天津天河分析仪器有限公司；pH计：Inpro4010型，美国METTLER公司；高速离心机：Centrifuge 5425型，德国Eppendorf公司；高效液相色谱（HPLC）仪：Ulti Mate 3000型，美国赛默飞世尔科技公司；生物分析仪：Agilent 2100型，美国安捷伦科技公司；多功能板读数器：SpectraMax M3型，美国伯腾仪器有限公司；5 L全自动搅拌式发酵罐：Biotech-JG型，上海保兴生物设备工程有限公司；50 L迪必尔全自动搅拌式发酵罐：Intelli-Ferm A G2型，迪必尔生物工程（上海）有限公司。

限制性内切酶、Prime Star Max高保真酶、T4 DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶、DNA marker、MiniBEST通用RNA提取试剂盒：宝生物工程（大连）有限公司；一步同源重组酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、基因组提取试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；氯霉素、异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷、碘化丙啶（PI）：生工生物工程（上海）股份有限公

表 1 质粒

Table 1 Plasmids

质粒	相关特征	来源
pTet-1	氯霉素抗性（Cm^r）	保藏质粒
pTet-1-*cusC*	Cm^r，携带 *cusC* 的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1-*ycgV*	Cm^r，携带 *ycgV* 的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1-*ydcO*	Cm^r，携带 *ydcO* 的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1-*menI*	Cm^r，携带 *menI* 的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1-*caiD*	Cm^r，携带 *caiD* 的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1-*ubiT*	Cm^r，携带 *ubiT* 的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1- mKate	Cm^r，携带 mKate 对应基因的 pTet-1 质粒	作者构建
pTet-1-RBS33-mKate	Cm^r，携带 RBS33 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS31-mKate	Cm^r，携带 RBS31 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS32-mKate	Cm^r，携带 RBS32 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS30-mKate	Cm^r，携带 RBS30 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS29-mKate	Cm^r，携带 RBS29 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS34-mKate	Cm^r，携带 RBS34 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS35-mKate	Cm^r，携带 RBS35 的 pTet-1-mKate 质粒	作者构建
pTet-1-RBS33-*cusC*	Cm^r，携带 RBS33 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建
pTet-1-RBS31-*cusC*	Cm^r，携带 RBS31 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建
pTet-1-RBS32-*cusC*	Cm^r，携带 RBS32 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建
pTet-1-RBS30-*cusC*	Cm^r，携带 RBS30 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建
pTet-1-RBS29-*cusC*	Cm^r，携带 RBS29 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建
pTet-1-RBS34-*cusC*	Cm^r，携带 RBS34 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建
pTet-1-RBS35-*cusC*	Cm^r，携带 RBS35 的 pTet-1-*cusC* 质粒	作者构建

表 2 菌株

Table 2 Strains

菌株	相关特征	来源
E. coli BL21	表达载体宿主	保藏菌株
E. coli MG1655	提供基因组模板	保藏菌株
E. coli N-26	*E. coli* N-2Δ*ldhA*Δ*pflB*Δ*pta-ackA*Δ*tdcD*Δ*tdcE*	保藏菌株
E. coli FN-1	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-2	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-3	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-4	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-5	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-6	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-7	*E. coli* N-26 经适应性进化后筛选得到的菌株	作者构建
E. coli FN-8	含有 pTet-1 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-9	含有 pTet-1-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-10	含有 pTet-1-*ycgV* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-11	含有 pTet-1-*ydcO* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-12	含有 pTet-1-*menI* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-13	含有 pTet-1-*caiD* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-14	含有 pTet-1-*ubiT* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-15	含有 pTet-1-RBS33-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-16	含有 pTet-1-RBS31-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-17	含有 pTet-1-RBS32-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-18	含有 pTet-1-RBS30-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-19	含有 pTet-1-RBS29-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-20	含有 pTet-1-RBS34-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建
E. coli FN-21	含有 pTet-1-RBS35-*cusC* 的 *E. coli* FN-6	作者构建

表3 引物

Table 3 Primers

引物	序列（5′—3′）
pTet-F	AAGCTTGCGGCCGCACTCGA
pTet-R	TTTCCCCTCTTTGTCGACGGA
cusC-F	TCCGTCGACAAAGAGGGGAAAATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCAT
cusC-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAACCGCCACCAAGTGCGG
ycgV-F	TCCGTCGACAAAGAGGGGAAAATGGGCATCAAACAACACAATGGG
ycgV-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAAAAGCTGAAGCGATATCCTCCGT
ydcO-F	TCCGTCGACAAAGAGGGGAAAATGCGTCTGTTTTCTATTCCTCC
ydcO-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAATATCGGTTTCTGTCAGCGA
menI-F	TCCGTCGACAAAGAGGGGAAAATGATATGGAAACGGAAAATCACCC
menI-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCACAAAATGGCGGTCGTCAAT
caiD-F	TCCGTCGACAAAGAGGGGAAAATGAGTGAATCATTACATCTGACCC
caiD-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAACGTCCTTTCCACACCGG
ubiT-F	TCCGTCGACAAAGAGGGGAAAGTGTTGGATAAACTGCGTTCCCG
ubiT-R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGCATGGTTCACCTACCGA
RBS33-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACTCACACAGGACAAGCTT
RBS31-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACTCACACAGGAAACCAAGCTT
RBS32-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACTCACACAGGAAAGAAGCTT
RBS30-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACATTAAAGAGGAGAAAAAGCTT
RBS29-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACTTCACACAGGAAACCAAGCTT
RBS34-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACAAAGAGGAGAAAAAGCTT
RBS35-mKate-F	AGAATTCGAGCTCCGTCGACATTAAAGAGGAGAAAAGCTT
RBS-mKate-R	GTCGACGGAGCTCGAATTCTTTTC
RBS33-*cusC*-F	TCCGTCGACTCACACAGGACAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA
RBS31-*cusC*-F	TCCGTCGACTCACACAGGAAACCAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA
RBS32-*cusC*-F	TCCGTCGACTCACACAGGAAAGAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA
RBS30-*cusC*-F	TCCGTCGACATTAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA
RBS29-*cusC*-F	TCCGTCGACTTCACACAGGAAACCAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA
RBS34-*cusC*-F	TCCGTCGACAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA
RBS35-*cusC*-F	TCCGTCGACATTAAAGAGGAGAAAAGCTTATGTCTCCTTGTAAACTTCTGCCA

司；琥珀酸、乳酸、乙酸：美国Sigma公司；PCR引物：亦欣生物科技（上海）有限公司；其他试剂：国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB培养基：10 g/L NaC1、5 g/L酵母提取物、10 g/L蛋白胨。

发酵培养基：40.0 g/L葡萄糖、5.0 g/L玉米浆、3.3 g/L $(NH_4)_2SO_4$、0.6 g/L KH_2PO_4、1.4 g/L $K_2HPO_4{\cdot}3H_2O$、0.4 g/L $MgSO_4{\cdot}7H_2O$。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

采用吉布森（Gibson）组装法构建重组质粒[18]。利用设计的上下游引物从*E.coli* MG1655基因组扩增*cusC*、*ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD*和*ubiT*基因片段，将它们分别连接到线性化载体pTet-1上，得到质粒pTet-1-*cusC*、pTet-1-*ycgV*、pTet-1-*ydcO*、pTet-1-*menI*、pTet-1-*caiD*和pTet-1-*ubiT*；借助RBS Calculator软件设计了7个不同强度的核糖体结合位点（RBS），即RBS29、RBS30、RBS31、

RBS32、RBS33、RBS34 和 RBS35；利用设计的上下游引物，从 pTet-1-mKate 质粒上扩增得到分别含有上述 7 个 RBS 序列的线性化载体，同源重组后得到质粒 pTet-1-RBS29-mKate、pTet-1-RBS30-mKate、pTet-1-RBS31-mKate、pTet-1-RBS32-mKate、pTet-1-RBS33-mKate、pTet-1-RBS34-mKate 和 pTet-1-RBS35-mKate；利用设计的上下游引物，从 pTet-1-*cusC* 质粒上扩增得到分别含有上述 7 个 RBS 序列的线性化载体，同源重组后得到质粒 pTet-1-RBS29-*cusC*、pTet-1-RBS30-*cusC*、pTet-1-RBS31-*cusC*、pTet-1-RBS32-*cusC*、pTet-1-RBS33-*cusC*、pTet-1-RBS34-*cusC* 和 pTet-1-RBS35-*cusC*。

1.2.2 发酵条件

平板培养：将保存于−80 ℃甘油管的菌液，接种于装有 25 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中，200 r/min、37 ℃培养 8.5 h；然后划线于固体 LB 培养基上，37 ℃恒温箱中培养 16 h，得到大小相近且分布均匀的单菌落。

一级种子培养：挑取单菌落接种于装有 25 mL 液体 LB 培养基的 100 mL 锥形瓶中，200 r/min、37 ℃培养 8.5 h。

二级种子培养：转接 100 μL 一级种子液至装有 50 mL 液体 LB 培养基的 500 mL 锥形瓶中，200 r/min、37 ℃培养 8.5 h。

摇瓶发酵：按 10% 的接种体积分数将二级种子液转接到 80 mL 发酵培养基中，37 ℃、200 r/min 培养 12 h。当 OD_{600} 值达到 0.8 时，加入终质量浓度 0.1 g/L 的 IPTG 进行诱导。随后，将培养物转移到 100 mL 的厌氧瓶中，在 37 ℃、200 r/min 的条件下厌氧发酵 60 h。葡萄糖质量浓度控制在 5~10 g/L，通过加入重质碳酸镁来维持 pH 在 6.6~7.2，72 h 结束发酵。

发酵罐发酵：采用 5 L 发酵罐，进行两阶段分批补料发酵。在好氧发酵阶段，按 10% 的接种体积分数将二级种子液转接到 3 L 发酵培养基中，在 37 ℃、500 r/min 条件下培养 9 h。当 OD_{600} 值达到 12 时，加入终质量浓度 0.1 g/L 的 IPTG 进行诱导，再培养 9 h，之后进入厌氧发酵阶段。在厌氧发酵阶段，通气速率调整为 0，保持 37 ℃、200 r/min 条件下厌氧发酵 63 h。在发酵过程中，通过添加重质碳酸镁维持 pH 在 6.6~7.2。当发酵培养基中的葡萄糖耗尽时，补充 800 g/L 葡萄糖以维持葡萄糖质量浓度在 0~2 g/L，72 h 结束发酵。

1.2.3 适应性进化

测定 *E. coli* N-26 在不同渗透压下的生长曲线，计算该菌株在不同渗透压下的菌体浓度在单位时间内的最大相对增长速度，即最大比生长速率。随后，对最大比生长速率进行数据拟合，通过拟合曲线得出 *E. coli* N-26 的半抑制渗透压。通过在发酵培养基中添加琥珀酸镁以维持渗透压处于半抑制渗透压水平，进行适应性进化。适应性进化开始前，通过平板培养、一级种子培养和二级种子培养对出发菌株 *E. coli* N-26 进行活化。将活化后的种子接种至装有 50 mL 适应性进化培养基的 250 mL 锥形瓶中，控制初始 OD_{600} 值为 0.6，200 r/min、37 ℃培养 24 h；然后，将培养物转移至装有 50 mL 适应性进化培养基的 250 mL 锥形瓶中（初始 OD_{600} 值控制在 0.6），200 r/min、37 ℃培养 24 h。按照上述方法，连续转移 58 代后，OD_{600} 值不再变化，进化结束。

1.2.4 转录组学分析

取适量的细胞培养物用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，然后在 4 ℃以 4 000 r/min 离心 10 min，收集沉淀。使用 MiniBEST 通用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。使用生物分析仪利用微量分光光度法测定总 RNA 质量浓度和质量。收集的样品使用液氮冷冻并送至 AZENTA 公司进行转录组学分析。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞浓度测定

取适量发酵液进行适当稀释，使用紫外分光光度计在波长 600 nm 条件下测定光密度，用 OD_{600} 值表示。

1.3.2 葡萄糖质量浓度测定

取适量发酵液进行适当稀释，使用生物传感器分析仪进行葡萄糖质量浓度测定。

1.3.3 渗透压测定

取适量发酵液，12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液，使用渗透压仪进行渗透压测定。

1.3.4 细胞活力测定

取适量发酵液用 PBS 洗涤 2 次，重悬后使用 PBS 将样品稀释到 OD_{600} 值为 0.4。然后，向细胞悬浮液中加入 5 μL PI，在 37 ℃的黑暗条件下孵育 30 min。细胞活力通过流式细胞术进行评估[19]。

1.3.5 荧光密度测定

取适量细胞培养物进行适当稀释，使用多功

能板读数器在96孔板中检测细胞培养物的荧光信号。红色荧光蛋白mKate的激发波长和发射波长分别为588 nm和645 nm。然后，测量细胞培养物的OD_{600}值，对检测到的荧光值进行归一化处理。

1.3.6 *有机酸质量浓度测定*

取适量发酵液于12 000 r/min离心10 min，取上清液进行适当稀释，用HPLC测定琥珀酸、乳酸和乙酸的质量浓度。HPLC的检测条件：色谱柱为Aminex HPX-87H（300 mm×7.8 mm），柱温52 ℃，流动相为5 mmol/L硫酸溶液，检测器为紫外检测器，波长为210 nm，进样量为10 μL，流量为0.6 mL/min。

1.3.7 *琥珀酸产率计算方法*

在*E. coli*以葡萄糖为底物发酵生产琥珀酸的过程中，琥珀酸的产率计算方式为：发酵过程中消耗单位质量葡萄糖所生成琥珀酸的质量占比，以百分比表示。

1.3.8 *琥珀酸生产强度计算方法*

在*E. coli*发酵生产琥珀酸的过程中，琥珀酸的生产强度计算方式为：在单位时间内，单位体积发酵液所生产的琥珀酸质量，单位为g/(L·h)。

2 结果与讨论

2.1 琥珀酸发酵生产的关键影响因素分析

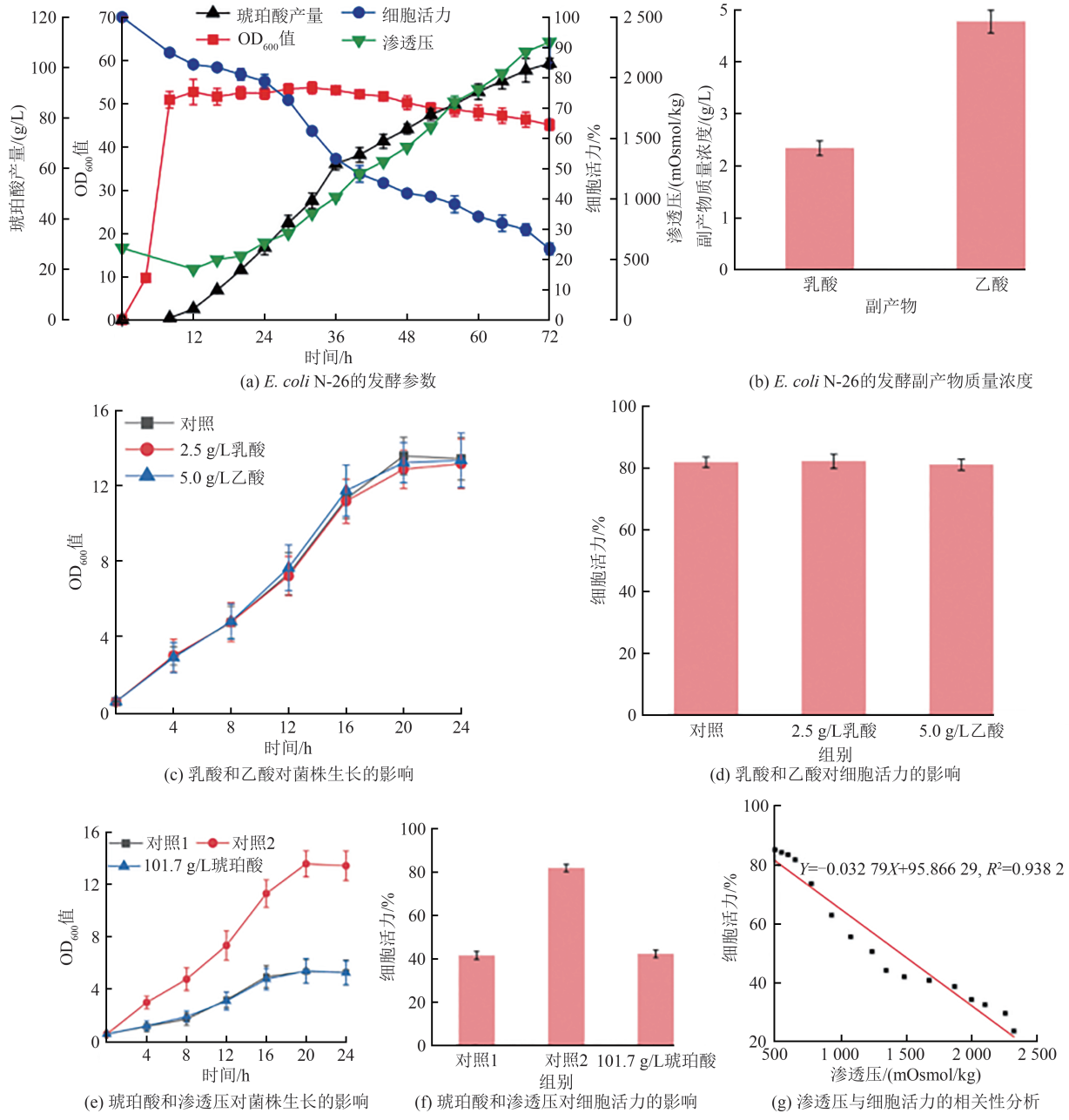
*E. coli*在发酵生产琥珀酸的过程中，不仅会逐渐积累少量的副产物——乳酸和乙酸，而且发酵体系中的渗透压也逐渐升高，与此同时，*E. coli*细胞活力也会逐渐降低，见图1(a)~(b)。由于细胞活力是维持工业菌株生产性能的关键[20]，因此为了确定影响细胞活力的关键因素，分析了发酵过程中有机酸积累和高渗环境对细胞活力的影响[21-22]。如图1(a)~(b)所示，*E.coli* N-26在发酵过程中会产生2.3 g/L乳酸、4.8 g/L乙酸和101.7 g/L琥珀酸。首先，分析了2.5 g/L乳酸和5.0 g/L乙酸对菌体细胞生长和细胞活力的影响。如图1(c)~(d)所示，2.5 g/L乳酸和5.0 g/L乙酸对菌体细胞生长和细胞活力没有显著影响。其次，分析了101.7 g/L琥珀酸和渗透压对菌体细胞生长和细胞活力的影响。如图1(e)~(f)所示，当添加101.7 g/L琥珀酸维持渗透压时，菌株的细胞生长和细胞活力与添加51 g/L NaCl维持渗透压(对照1，添加NaCl的渗透压与添加琥珀酸的渗透压保持一致)相比，分别提高了0.57%和0.70%，没有明显差异；但相比于未添加琥珀酸和NaCl维持渗透压(对照2)的组别，两者细胞生长速率明显降低，最大OD_{600}值分别降低了60.43%和60.65%，细胞活力分别降低了48.35%和49.21%。最后，分析了渗透压与细胞活力之间的关系。如图1(g)所示，渗透压与细胞活力密切相关。细胞活力随着渗透压的增加而逐渐降低，因此渗透压与细胞活力呈负相关。上述结果表明，高渗条件是导致发酵过程中菌株细胞活力下降的关键因素。

2.2 适应性进化筛选耐高渗透压菌株

为了提高菌株的耐高渗能力，采用适应性进化策略筛选耐高渗透压菌株。首先，测定了*E.coli* N-26的半抑制渗透压，用于确定适应性进化的起始渗透压。如图2(a)~(b)所示，通过测定*E.coli* N-26在不同渗透压下的生长曲线，并拟合最大比生长速率，确定了*E.coli* N-26的半抑制渗透压为1 400 mOsmol/kg。其次，以渗透压1 400 mOsmol/kg为起点，以菌株生长情况(OD_{600}值)为指标，进行适应性进化。如图2(c)所示，进化58代后，菌株的最大OD_{600}值趋于稳定，因此停止进化，并进行耐高渗菌株的筛选。在高渗平板上分离菌株后，以最大OD_{600}值为指标，在渗透压为1 400 mOsmol/kg的培养基中进行摇瓶初筛。如图2(d)所示，初步筛选获得了7株具有耐高渗能力的菌株。最后，以细胞活力和琥珀酸产量为指标，对上述7株菌株进行摇瓶复筛。如图2(e)~(f)所示，与出发菌株*E.coli* N-26相比，进化菌株*E.coli* FN-6的琥珀酸产量提高了12.08%，细胞活力提高了63.28%。上述结果表明，*E.coli* FN-6的耐高渗能力得到了显著提高，并且具有高产琥珀酸的潜力。因此，选择*E.coli* FN-6进行下一步研究。

2.3 转录组学分析耐高渗菌株的关键靶点基因

为了分析与渗透压耐受性相关的关键基因，对菌株*E.coli* N-26和*E.coli* FN-6进行了转录组学分析。首先评估了*E.coli* N-26和*E.coli* FN-6中转录水平发生显著变化的基因(变化≥2.0倍；P≤0.05)。与出发菌株*E.coli* N-26相比，耐高渗菌株*E.coli* FN-6中993个基因的转录水平发生了显著变化，其中，431个基因发生了显著上调，562个基因发生了显著下调。在此基础上，使用NCBI中的COG数据



(a) *E. coli* N-26的发酵参数　(b) *E. coli* N-26的发酵副产物质量浓度

(c) 乳酸和乙酸对菌株生长的影响　(d) 乳酸和乙酸对细胞活力的影响

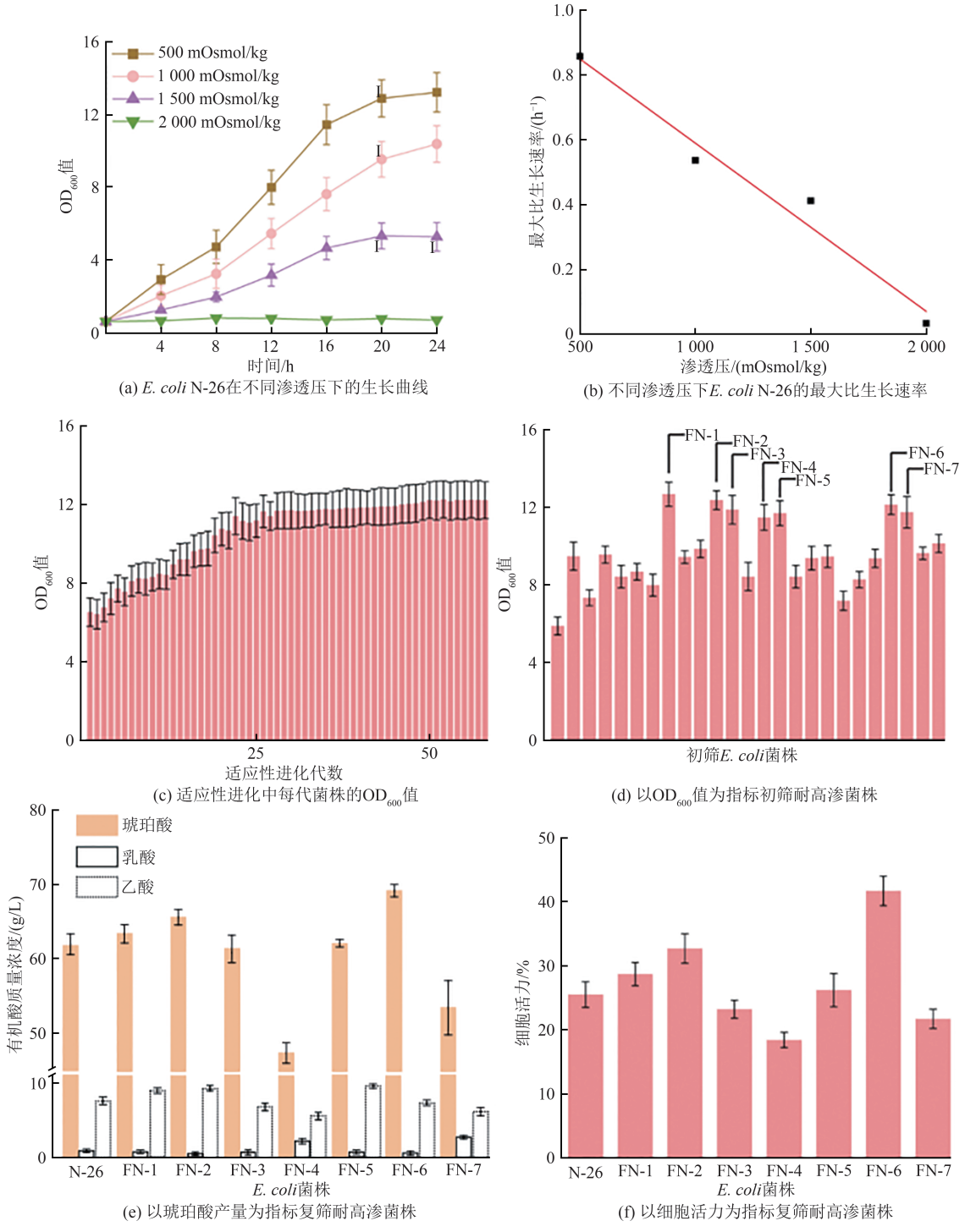
(e) 琥珀酸和渗透压对菌株生长的影响　(f) 琥珀酸和渗透压对细胞活力的影响　(g) 渗透压与细胞活力的相关性分析

图 1　琥珀酸发酵生产的关键影响因素分析

Fig. 1　Analysis of key factors affecting succinic acid production by fermentation

库对 993 个差异基因进行注释和分析。在图 3(a)的所有蛋白质功能中，与渗透压耐受性相关的蛋白质功能主要包括：细胞膜/细胞壁/细胞被膜生物合成、次级代谢产物生物合成、脂质转运与代谢等。

为了筛选菌株耐高渗能力的潜在靶点基因，进一步分析了渗透压耐受性相关功能涉及的关键基因。细胞膜、细胞壁或细胞被膜为菌株提供渗透保护[23]。在细胞膜、细胞壁或细胞被膜生物合成相关的基因中，*cusC* 和 *ycgV* 的转录水平分别上调了 3.34 倍和 2.95 倍。次级代谢产物(如甜菜碱)的生物合成可以保护菌株抵御渗透胁迫[24]。在次级代谢产物生物合成相关的基因中，*ydcO* 和 *menI* 的转录水平分别上调了 2.11 倍和 2.33 倍。脂质转运与代谢(如不饱和脂肪酸的合成)能够有效提高菌株在高渗环境下的存活率和代谢性能[25]。在脂质转运与代谢相关的基因中，*caiD* 和 *ubiT* 的转录水平分别上调了 2.76 倍和 2.95 倍。如图 3(b)所示，基因 *cusC*、*ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD* 和 *ubiT* 是提



(a) *E. coli* N-26在不同渗透压下的生长曲线

(b) 不同渗透压下*E. coli* N-26的最大比生长速率

(c) 适应性进化中每代菌株的OD_{600}值

(d) 以OD_{600}值为指标初筛耐高渗菌株

(e) 以琥珀酸产量为指标复筛耐高渗菌株

(f) 以细胞活力为指标复筛耐高渗菌株

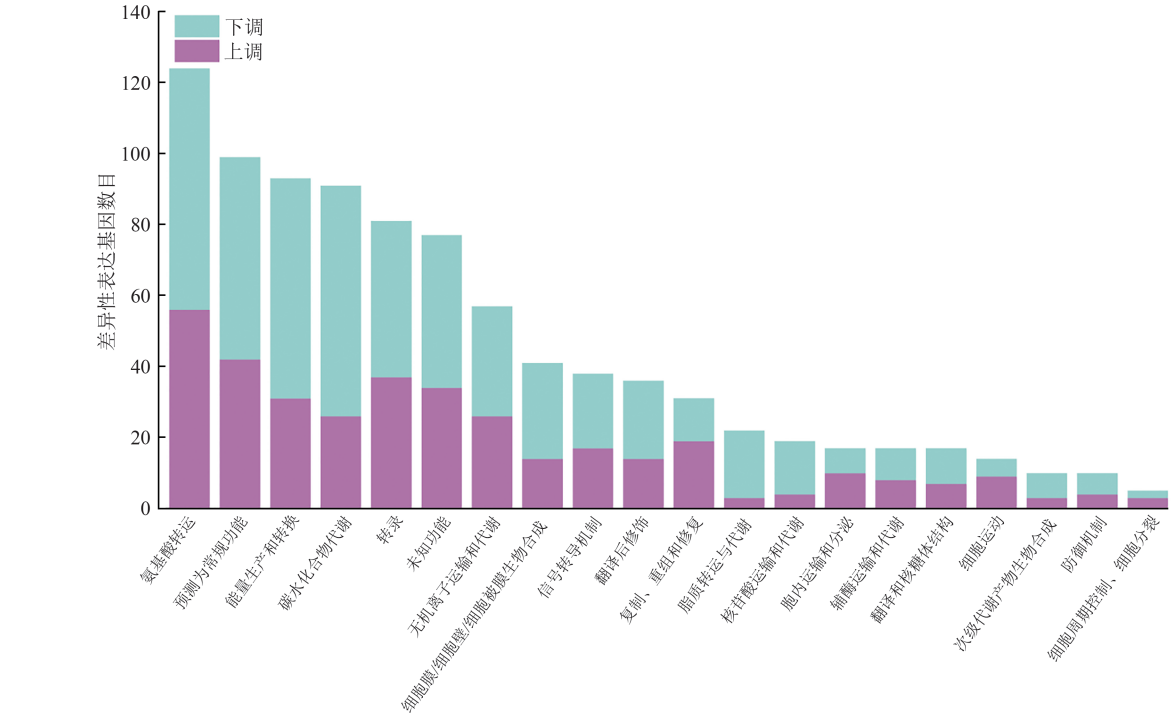
图 2　适应性进化筛选耐高渗透压菌株

Fig. 2　Adaptive evolution screening for strains tolerant to high osmotic pressure

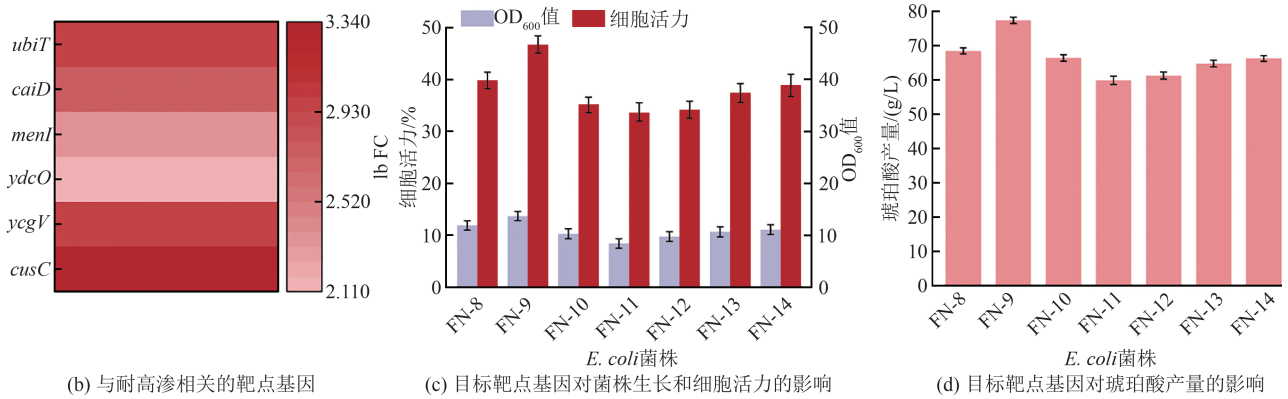
高菌株耐高渗能力的潜在靶点基因。

为了筛选提高菌株耐高渗能力的靶点基因，在 *E. coli* FN-6 中分别过表达 *cusC*、*ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD* 和 *ubiT*。如图 3(c)所示，当渗透压为 1 400 mOsmol/kg 时，菌株 *E. coli* FN-9（过表达 *cusC*）的菌株生长情况(OD_{600}值)和细胞活力比对照菌株 *E.coli* FN-8 分别提高了 15.05% 和 17.34%；而过表达 *ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD* 和 *ubiT* 的菌株，其菌株生长情况(OD_{600}值)却比对照菌株 *E.coli* FN-8 分别降低了 13.62%、29.18%、18.16%、10.43% 和 6.89%，与此同时，细胞活力分别降低了 11.56%、15.58%、14.07%、6.03% 和 2.26%。随后，进一步采

用摇瓶发酵法验证了过表达 *cusC*、*ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD* 和 *ubiT* 的菌株对琥珀酸生产的影响。如图 3(d)所示，菌株 *E.coli* FN-9（过表达 *cusC*）的琥珀酸产量比对照菌株 *E.coli* FN-8 提高了 13.04%，而过表达 *ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD* 和 *ubiT* 的菌株，其琥珀酸产量却分别降低了 2.99%、12.54%、10.51%、5.38% 和 3.21%。综上所述，过表达 *cusC* 能够有效提高生产菌株的耐高渗能力和琥珀酸生产性能。



(a) 利用COG数据库对差异表达基因进行功能分类



(b) 与耐高渗相关的靶点基因　(c) 目标靶点基因对菌株生长和细胞活力的影响　(d) 目标靶点基因对琥珀酸产量的影响

图(c)~(d)中，FN-8 为携带空质粒的 *E. coli* 菌株（对照菌株），FN-9、FN-10、FN-11、FN-12、FN-13、FN-14 分别为过表达 *cusC*、*ycgV*、*ydcO*、*menI*、*caiD* 和 *ubiT* 的 *E. coli* 菌株。

图 3　转录组学分析耐高渗透压的关键靶点基因

Fig. 3　Transcriptomic analysis of key target genes for tolerance to high osmotic pressure

2.4　优化 *cusC* 表达水平以强化菌株的渗透压耐受性

为了进一步强化菌株的渗透压耐受性，基于 RBS 优化了基因 *cusC* 的表达水平。首先，设计了 7 个不同强度的 RBS，见 1.2.1 部分；其次，以 mKate 为报告蛋白质，进一步测试了 7 个 RBS 以及对照 RBS64 的表达强度，由弱到强的顺序依次为 RBS33、RBS31、RBS64、RBS32、RBS30、RBS29、RBS34 和 RBS35，如图 4(a)所示；最后，以 *E.coli* FN-6 为底盘菌株，采用上述 7 个不同强度的 RBS，构建了 7 株具有不同 *cusC* 基因表达水平的重组菌株，并进行摇瓶测试，构建方案见图 4(b)。如图 4(c)所

示，当采用RBS34调控*cusC*基因表达时，重组菌株*E.coli* FN-20的琥珀酸产量和细胞活力比对照菌株*E. coli* FN-9分别提高了11.61%和9.85%。上述结果表明，优化*cusC*的基因表达水平，能够有效提高菌株的高渗透压耐受能力，从而进一步提高琥珀酸产量。

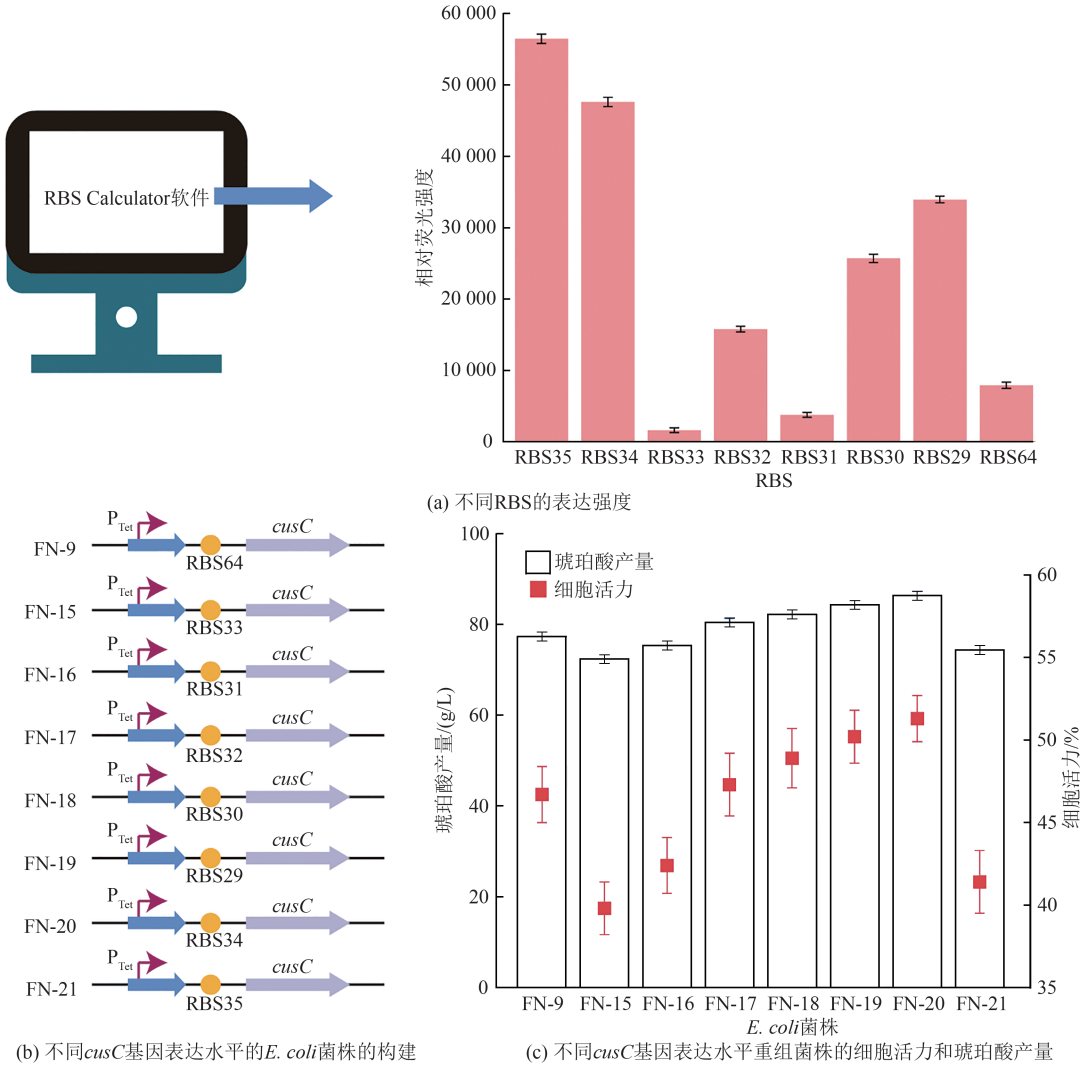


图4　优化*cusC*基因表达水平促进琥珀酸生产

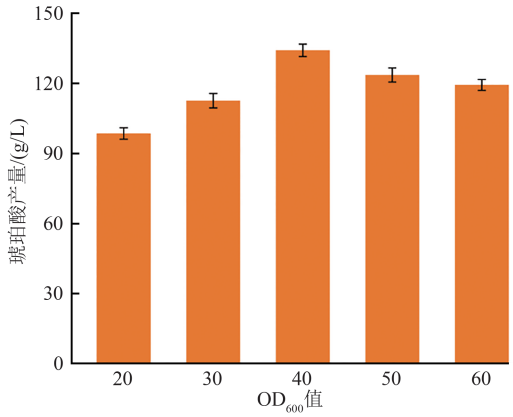
Fig. 4　Optimization of *cusC* expression levels enhances succinic acid production

2.5　发酵条件优化

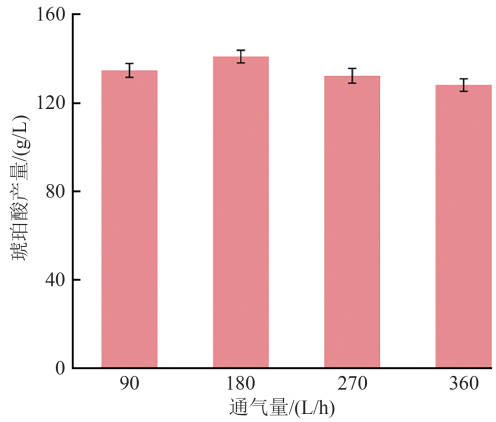
为了提高琥珀酸的生产效率，在5 L发酵罐中优化了菌株*E. coli* FN-20生产琥珀酸的发酵条件。首先，评价了厌氧发酵阶段的起始菌体浓度对*E. coli* FN-20生产琥珀酸的影响。如图5(a)所示，随着厌氧发酵阶段起始OD_{600}值的增加，琥珀酸的产量呈现先增加后降低的趋势。当OD_{600}值控制在40时，琥珀酸的产量达到最高，为134.27 g/L，计算可得产率为86.0%，相比于起始OD_{600}值为50的试验组，分别提高了8.6%和10.2%。其次，分析了好氧发酵阶段的通气量对*E. coli* FN-20生产琥珀酸的影响。如图5(b)所示，当好氧发酵阶段的通气量控制在180 L/h时，琥珀酸的产量达到最高，为141.13 g/L，计算可得产率为88.0%，相比于通气量为90 L/h的试验组分别提高了5.11%和2.32%。综上所述，厌氧发酵阶段的起始OD_{600}值为40、好氧发酵阶段的通气量为180 L/h时，有利于琥珀酸的生产。

最后，基于上述最优发酵条件，在5 L发酵罐中评估了菌株*E. coli* FN-20发酵生产琥珀酸的能力。如图5(c)~(d)所示，菌株*E. coli* FN-20的细胞活力在72 h时达到了56.7%，琥珀酸产量、产率和生产

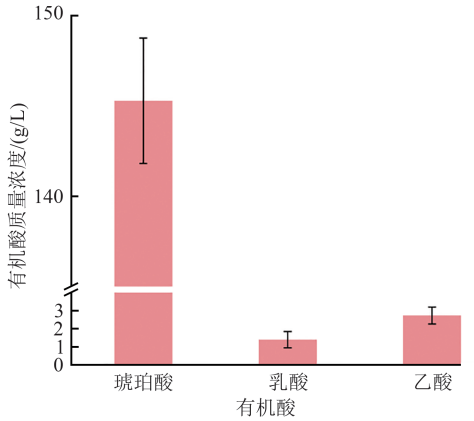
强度分别为145.27 g/L、90.0%和2.01 g/(L·h)，相比于出发菌株*E. coli* N-26分别提高了42.84%、28.57%和42.55%。上述结果表明，在5 L发酵罐中，菌株*E. coli* FN-20实现了琥珀酸的高效生产。



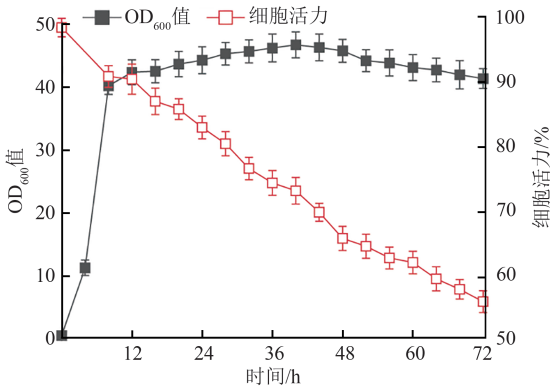
(a) 厌氧发酵阶段的起始OD_{600}值对琥珀酸生产的影响



(b) 好氧发酵阶段通气量对琥珀酸生产的影响



(c) 菌株*E. coli* FN-20的琥珀酸和副产物质量浓度



(d) 菌株*E. coli* FN-20发酵过程中OD_{600}值与细胞活力变化

图5　发酵条件优化生产琥珀酸

Fig. 5　Optimization of fermentation conditions for succinic acid production

3　结论

渗透压是影响琥珀酸生产效率的关键因素之一[26]。为了提高生产菌株在高渗透压胁迫下的生产性能，采用适应性进化策略，筛选获得了一株能够耐受高渗透压的突变菌株*E.coli* FN-6，使琥珀酸的产量提高了12.08%，细胞活力提高了23.49%。随后，对菌株*E.coli* N-26和*E.coli* FN-6进行了转录组学分析，并利用反向代谢工程手段，筛选得到了渗透压耐受性相关靶点基因*cusC*。在此基础上，利用RBS优化策略提升了*cusC*的表达水平，有效提高了工业菌株的生产性能。最后，通过控制好氧阶段的通气量为180 L/h以及厌氧阶段的起始OD_{600}值为40，琥珀酸的产量、产率和生产强度分别达到了145.27 g/L、90.0%和2.01 g/(L·h)。这为琥珀酸的工业化生产奠定了基础，同时为开发*E. coli*生产其他高附加值化学品提供了一个新的选择。

参考文献

[1] LIU X T，ZHAO G，SUN S J，et al. Biosynthetic pathway and metabolic engineering of succinic acid[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology，2022，10：843887.

[2] AHN J H，JANG Y S，LEE S Y. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms [J]. Current Opinion in Biotechnology，2016，42：54-66.

[3] LOUASTÉ B，ELOUTASSI N. Succinic acid production from whey and lactose by *Actinobacillus succinogenes* 130Z in batch fermentation[J]. Biotechnology Reports，2020，27：e00481.

[4] CHEN K Q，JIANG M，WEI P，et al. Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2010，160(2)：477-485.

[5] ITO Y，HIRASAWA T，SHIMIZU H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve succinic acid production based on metabolic profiling[J]. Bioscience，Biotechnology，and Biochemistry，2014，78(1)：151-159.

[6] SONG H，LEE S Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology，2006，39(3)：352-361.

[7] ZHU L W，TANG Y J. Current advances of succinate biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Advances，2017，35(8)：1040-1048.

[8] FERONE M，RAGANATI F，OLIVIERI G，et al. Bioreactors for succinic acid production processes [J]. Critical Reviews in Biotechnology，2019，39(4)：571-586.

[9] WANG W，LI Z M，XIE J L，et al. Production of succinate by a *pflB ldhA* double mutant of *Escherichia coli* overexpressing malate dehydrogenase[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering，2009，32：737-745.

[10] TAN Z G，ZHU X N，CHEN J，et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improvement of succinate production[J]. Applied and Environmental Microbiology，2013，79(16)：4838-4844.

[11] MILLARD C S，CHAO Y P，LIAO J C，et al. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology，1996，62(5)：1808-1810.

[12] ZHANG Y P，HUANG Z H，DU C Y，et al. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol[J]. Metabolic Engineering，2009，11(2)：101-106.

[13] BALZER G J，THAKKER C，BENNETT G N，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to minimize byproduct formate and improving succinate productivity through increasing NADH availability by heterologous expression of NAD^+-dependent formate dehydrogenase [J]. Metabolic Engineering，2013，20：1-8.

[14] LI X Z，ZHANG W M，WU M K，et al. Performance and mechanism analysis of succinate production under different transporters in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering，2017，22(5)：529-538.

[15] CHEN J，ZHU X N，TAN Z G，et al. Activating C_4-dicarboxylate transporters DcuB and DcuC for improving succinate production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2014，98(5)：2197-2205.

[16] 王学明，潘静宇，吴静，等. 调控大肠杆菌胞内ATP和NADH水平促进琥珀酸生产[J]. 生物工程学报，2023，39(8)：3236-3252.
WANG X M，PAN J Y，WU J，et al. Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2023，39(8)：3236-3252.(in Chinese)

[17] DIAMANT S，ELIAHU N，ROSENTHAL D，et al. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses[J]. Journal of Biological Chemistry，2001，276(43)：39586-39591.

[18] GIBSON D G，YOUNG L，CHUANG R Y，et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods，2009，6(5)：343-345.

[19] DIAO W W，GUO L，DING Q，et al. Reprogramming microbial populations using a programmed lysis system to improve chemical production[J]. Nature Communications，2021，12：6886.

[20] GUO L，QI M Y，GAO C，et al. Engineering microbial cell viability for enhancing chemical production by second codon engineering[J]. Metabolic Engineering，2022，73：235-246.

[21] PINHAL S，ROPERS D，GEISELMANN J，et al. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate[J]. Journal of Bacteriology，2019，201(13)：e00147-19.

[22] CHEN Y R，YANG Y L，CAI W Q，et al. Research progress of anti-environmental factor stress mechanism and anti-stress tolerance way of *Saccharomyces cerevisiae* during the brewing process[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2023，63(33)：12308-12323.

[23] DELHAYE A，COLLET J F，LALOUX G. Fine-tuning of the Cpx envelope stress response is required for cell wall homeostasis in *Escherichia coli*[J]. mBio，2016，7(1)：e00047-16.

[24] ZOU H B，CHEN N N，SHI M X，et al. The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2016，100(9)：3865-3876.

[25] JIANG Y J，PAN R Z，TAO Y X，et al. Improvement of environmental tolerance of *E. coli* through biological membrane engineering to boost succinic acid conversion [J]. Biochemical Engineering Journal，2023，198：109026.

[26] KWON Y D，KIM S，LEE S Y，et al. Long-term continuous adaptation of *Escherichia coli* to high succinate stress and transcriptome analysis of the tolerant strain [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2011，111(1)：26-30.

（责任编辑：周玥）