

摘要

己二酸是合成尼龙 6,6 的关键前体。利用微生物生产己二酸的方法相较于化学合成法具有环境友好、条件温和的优势,然而,目前微生物法合成己二酸的生产工艺存在路径瓶颈多、合成前体不平衡的问题,降低了己二酸的生产效率。本研究选择一株高产琥珀酸的大肠杆菌作为底盘菌株,通过解除路径限速步骤、菌株重测序比较、平衡前体供给、发酵条件优化等策略,有效提高了己二酸的产量与得率。主要研究结果如下:

(1) 己二酸生产菌株的构建:首先,本研究基于文献重新构建了一条以葡萄糖为底物,乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 为前体,5 种路径酶参与的己二酸合成途径。其次,以胞内己二酸合成前体浓度为筛选指标,从 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* JM109 (DE3)、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* MG1655、*E. coli* FMME N-2 和 *E. coli* W3110 菌株中确定 *E. coli* FMME N-2 为最佳底盘菌株。最后,以重组质粒 pTrcHisA-0875-2399-0067 和 pTet-1647-2576-7 为载体构建己二酸合成路径,并将路径引入到底盘菌株中,获得菌株 *E. coli* JL00。经 72 h 的摇瓶发酵,菌株 *E. coli* JL00 的己二酸产量为 0.34 g·L⁻¹,得率为 0.08 g·g⁻¹。

(2) 己二酸生产菌株的比较基因组分析:首先,将 *E. coli* FMME N-2 菌株与对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株进行比较基因组重测序分析发现:差异基因主要分布在葡萄糖转运系统、中心代谢途径、氨基酸代谢途径和转录调控代谢途径,其中 40% 的差异基因集中在中心代谢途径。其次,在与中心代谢途径有关的差异基因中,*E. coli* FMME N-2 菌株的 *acs*、*pank* 和 *btsT* 等基因的转录水平均高于对照菌株,其中 *acs* 和 *pank* 基因与前体乙酰辅酶 A 的合成密切相关。最后,*E. coli* FMME N-2 菌株中乙酰辅酶 A 合成酶和泛酸激酶的酶活力均高于 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株。因此,可通过强化 *acs* 和 *pank* 基因的表达以增加前体的供应,从而提高己二酸的产量。

(3) 己二酸合成路径的优化:首先,通过体外实验对合成路径中的关键限速酶进行鉴定,确定了 Tfu_1647 是路径中的关键限速酶。其次,利用高强度的 RBS03 调节限速酶 Tfu_1647 的表达量,构建了菌株 *E. coli* JL01,己二酸产量为 0.87 g·L⁻¹,得率为 0.12 g·g⁻¹,较对照菌株 *E. coli* JL00 分别提高 2.6 倍和 1.5 倍。最后,通过过表达乙酰辅酶 A 合成酶 *acs* 基因、将 *lpd* 基因第 354 位谷氨酸突变为赖氨酸以及敲除编码琥珀酰辅酶 A 的 β 亚基 *sucD* 基因相组合的策略,平衡己二酸的前体供应,获得 *E. coli* JL12 菌株。在摇瓶水平上,*E. coli* JL12 菌株己二酸产量达到 1.51 g·L⁻¹,得率为 0.25 g·g⁻¹。

(4) 己二酸生产菌株的发酵优化与测试:首先,对摇瓶发酵体系中的诱导温度和诱导时间进行优化,确定最佳发酵条件为:诱导温度 37°C 和诱导剂浓度 3.0 mmol·L⁻¹,己二酸产量达 1.69 g·L⁻¹,得率为 0.15 g·g⁻¹;其次,在 2.4-L 发酵罐中对发酵工艺(接种量、残糖浓度、转速、通气量以及溶解氧)进行优化,在接种量为 10%、残糖浓度为 2.5-5 g·L⁻¹、转速为 600 r·min⁻¹、通气量为 0.5 vvm 且不控制溶解氧时,己二酸产量最高为 22.31 g·L⁻¹,得率为 0.21 g·g⁻¹。最后,将发酵体系放大至 5-L 发酵罐,己二酸的产量达到 25.50 g·L⁻¹,得率为 0.27 g·g⁻¹,生产强度为 0.85 g·L⁻¹·h⁻¹。

关键词: 己二酸; 代谢工程; 大肠杆菌; 发酵优化

Abstract

Adipic acid, a key precursor for the synthesis of nylon 6, 6. At present, due to the long production cycle and low production efficiency of adipic acid produced by biological method, it is difficult for microbial synthesis of adipic acid to meet the needs of industrial production. Therefore, a strain of *Escherichia coli* suitable for adipic acid production was developed in this study as a chassis strain, which significantly improved the titer and yield of adipic acid by removing the path rate-limiting steps, metabolite spectrum analysis and regulating precursor balance. The main research results are as follows:

(1) Construction of adipic acid production strain: Firstly, based on the literature, this study reconstructed an adipate synthesis pathway with glucose as substrate, acetyl-coA and succinyl-CoA as precursors, and five pathway enzymes involved. Secondly, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* MG1655, *E. coli* FMME N-2, *E. coli* W3110 were selected as the optimal chassis strain based on the concentration of intra-cell adipic acid synthetic precursor. Finally, the recombinant plasmids pTrcHisA-0875-2399-0067 and pTet-1647-2576-7 were used to construct the adipic acid synthesis pathway, and then introduced into the chassis strain to obtain *E. coli* JL00. After 72 h shaking fermentation, adipic acid production was up to 0.34 g·L⁻¹ and 0.08 g·g⁻¹ glucose in strain *E. coli* JL00.

(2) Comparative Genomic Analysis of adipic acid producing strains: First, *E. coli* FMME N-2 and *E. coli* BL21 (DE3) were compared by genome resequencing. The differential genes were mainly distributed in the glucose transport system, central metabolic pathway, amino acid metabolic pathway and transcriptional regulatory metabolic pathway, and 40% of the differential genes were concentrated in the central metabolic pathway. Secondly, among the differential genes related to the central metabolic pathway, *E. coli* FMME N-2 had higher transcription levels of *acs*, *pank*, and *btsT* genes than the control strains, and the *acs* and *pank* genes were closely related to the synthesis of the precursor acetyl-coA. Finally, the activity of acetyl-coA synthetase and pantothenic acid kinase in *E. coli* FMME N-2 was higher than that in *E. coli* BL21 (DE3). Therefore, it is possible to enhance the expression of *acs* and *pank* genes to increase the supply of precursors, so as to improve the production of adipic acid.

(3) Optimization of adipic acid synthesis path: Firstly, the key rate-limiting enzyme in the synthesis path was identified through *in vitro* experiments, and Tfu_1647 was identified as the key rate-limiting enzyme in the pathway. Secondly, strain *E. coli* JL01 was constructed by regulating the expression of rate-limiting enzyme Tfu_1647 with high intensity of RBS03. The titer of adipic acid was 0.87 g·L⁻¹, and the yield of glucose was 0.12 g·g⁻¹, which was 2.56 and 1.5 times higher than that of control strain *E. coli* JL00, respectively. Finally, *E. coli* JL12 strain was obtained by a combination strategy of overexpression of acetyl-CoA synthetase *acs* gene, mutation of glutamate at *lpd* gene 354 to lysine, and knockout of β -subunit *sucD* gene encoding succinyl-CoA to balance the precursor supply of adipic acid. At the shaking flask level, *E. coli* JL12 obtained 1.51 g·L⁻¹ adipic acid and 0.25 g·g⁻¹ glucose.

(4) Fermentation optimization and test of adipic acid producing strain: Firstly, the induction temperature and induction time in shaking flask fermentation system were

optimized, and the optimum fermentation conditions were determined as follows: induction temperature 37°C and concentration of inducer 3.0 mmol·L⁻¹, the titer of adipic acid was 1.69 g·L⁻¹, and the yield of glucose was 0.15 g·g⁻¹. Secondly, the fermentation process (inoculation amount, residual sugar concentration, rotational speed, ventilation and dissolved oxygen) was optimized in a 2.4-L bioreactor. When inoculation amount was 10%, residual sugar concentration was 2.5-5 g·L⁻¹, rotational speed was 600 r·min⁻¹, ventilation was 0.5 vvm and dissolved oxygen was not controlled, the highest yield of adipic acid was 22.31 g·L⁻¹, and the yield was 0.21 g·g⁻¹. Finally, by enlarging the fermentation system to a 5-L fermenter, the yield of adiponic acid reached 25.50 g·L⁻¹, the yield was 0.27 g·g⁻¹, and the production intensity was 0.85 g·L⁻¹·h⁻¹.

Keywords: *E. coli*; metabolic engineering; adipic acid; fermentation optimization

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 己二酸概述.....	1
1.1.1 己二酸的理化性质.....	1
1.1.2 己二酸的应用价值.....	1
1.2 己二酸的生产概况.....	1
1.2.1 化学合成.....	1
1.2.2 酶法合成.....	3
1.2.3 微生物发酵.....	3
1.3 微生物生产己二酸的代谢工程改造.....	5
1.3.1 基于脂肪酸代谢途径的代谢工程改造.....	6
1.3.2 基于中心代谢途径的代谢工程改造.....	7
1.4 立题依据及研究意义.....	9
1.4.1 立题依据.....	9
1.4.2 研究意义.....	10
1.5 主要内容.....	10
第二章 材料与amp;方法.....	12
2.1 实验所需的材料.....	12
2.1.1 菌株和质粒.....	12
2.1.2 引物.....	13
2.1.3 试剂与培养基.....	14
2.1.4 主要仪器.....	15
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 分子生物学实验方法.....	16
2.2.2 己二酸的发酵测试.....	18
2.2.3 其他实验方法.....	18
第三章 结果与amp;讨论.....	20
3.1 己二酸合成路径的构建和底盘菌株的筛选.....	20
3.1.1 己二酸合成路径的构建.....	20
3.1.2 己二酸生产底盘菌株的筛选.....	21
3.1.3 己二酸生产菌株的构建.....	22
3.1.4 小结.....	23
3.2 己二酸底盘菌株的比较基因组分析.....	23
3.2.1 底盘菌株的基因组差异比较.....	23
3.2.2 底盘菌株的比较基因组分析.....	25

3.2.3 小结.....	27
3.3 己二酸合成路径的优化.....	27
3.3.1 己二酸合成路径瓶颈的鉴定.....	27
3.3.2 不同 RBS 优化限速酶的表达水平.....	29
3.3.3 提高乙酰辅酶 A 的供应.....	30
3.3.4 提高琥珀酰辅酶 A 的供应.....	32
3.3.5 组合优化平衡双前体物质供应.....	33
3.3.6 小结.....	34
3.4 己二酸生产菌株的发酵优化与测试.....	34
3.4.1 发酵工艺的优化.....	34
3.4.2 5-L 发酵罐放大生产己二酸.....	38
3.4.3 小结.....	39
主要结论与展望.....	40
主要结论.....	40
展望.....	40
参考文献.....	42

第一章 绪论

1.1 己二酸概述

1.1.1 己二酸的理化性质

己二酸别名肥酸(图 1-1), 是一种重要的有机二元酸。白色晶体, 结构式为 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ^[1]。能够发生成盐反应、酯化反应、酰胺化反应等, 特别是能与二元胺或二元醇缩聚形成高分子聚合物^[2]。

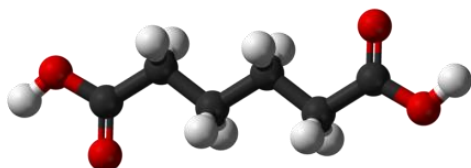


图 1-1 己二酸的球棍模型

Fig. 1-1 Ball-and-stick model of adipic acid

1.1.2 己二酸的应用价值

己二酸的用途主要包括: (1) 工程塑料的前体物质; (2) 酯类产品的原料, 例如用作增塑剂和高级润滑剂的生产材料; (3) 聚氨基甲酸酯弹性体的生产主料, 例如用作食品酸化剂, 其产生的酸化效果优于酒石酸与柠檬酸^[3]。作为一种具有重要工业应用价值的大宗化学品, 己二酸的产量在所有工业应用的二元羧酸中位居第二。在 2004 年美国能源部将己二酸列为可再生生物质原料生产和着重发展的高附加值化学品之一^[4]。

己二酸最重要的应用价值主要体现在其可作为尼龙 6,6 的关键前体^[5]。例如, 尼龙 6,6 纤维和树脂的生产是由己二酸与乙二胺缩合反应而成; 聚氨酯类树脂和发泡塑料的化学生产需要己二酸作为前体与多元醇缩合而成^[6]。此外, 己二酸也可作为化工原料和中间体, 用于杀虫剂、粘合剂、增塑剂、润滑剂、合成革、合成染料、香料以及食品添加剂等的生产^[7]。

巨大的市场需求, 使得己二酸的产量持续增长^[8]。2020 年至今, 己二酸的全球年产能能为 457.9 万吨。中国是世界上最大的己二酸生产国, 近年来己二酸的出口量占据国内己二酸产量的 67%^[9]。截止目前, 己二酸的全球市场价值已经超过 75 亿美元, 且呈现持续增值的态势^[10]。

1.2 己二酸的生产概况

1.2.1 化学合成

利用化学合成法是当前工业生产己二酸的主要方法。化学生产己二酸的方法由美国杜邦公司首创, 并逐步改进^[11]。1937 年, 杜邦公司首创环己醇氧化法生产己二酸, 开启了工业化生产己二酸的历程^[12]。上世纪 60 年代后, 杜邦公司又在原有生产工艺的基础上进一步改进, 逐步用环己烷氧化法取代原有生产方法进行己二酸的大规模生产^[13]。

环己烷分步氧化法是己二酸的主流生产方法，该方法共有三步。

第一步，环己烷的制备(图 1-2)：该步骤是以苯为原料通过氢化反应生成环己烷^[14]。

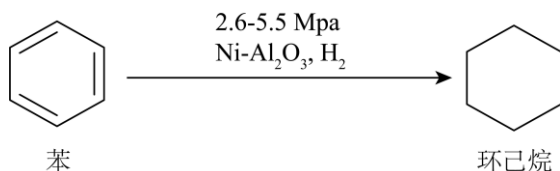


图 1-2 环己烷的制备

Fig. 1-2 Preparation of cyclohexane

第二步，KA 油的制备：该步骤是以环己烷为原料通过氧化反应生成环己酮和环己醇的混合物(即 KA 油，又名醇酮油)^[15]。该步骤根据工艺不同又可以分为直接氧化法和偏硼酸催化法两种^[16]。直接氧化法生产工艺简单，经空气氧化生成 KA 油可直接用于己二酸的生产，但是收率仅为理论值的 70%-75% (图 1-3)^[7]。偏硼酸催化法是以偏硼酸作为催化剂，经空气氧化生成 KA 油，回收率可达到理论值的 90%，醇酮比可以稳定在 10:1^[17] (图 1-4)。然而，偏硼酸催化法的工艺较为复杂，反应后需要通过有机溶剂萃取分离催化剂和产物。萃取后，水相回收硼酸，经脱水成偏硼酸循环使用；有机相用苛性钠皂化有机酯，并除去酸，蒸馏回收环己烷后可以得到醇酮混合物^[18]。

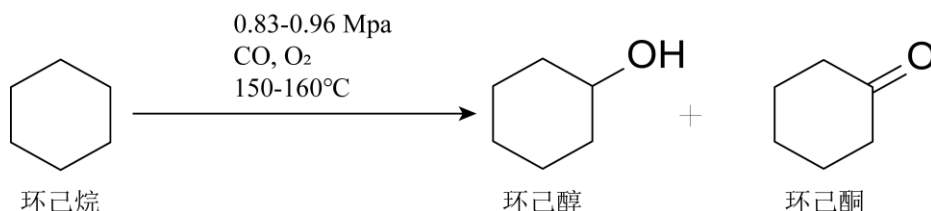


图 1-3 直接氧化法生产 KA 油

Fig. 1-3 Production of mixtures of cyclohexanone and cyclohexanol by direct oxidation reaction

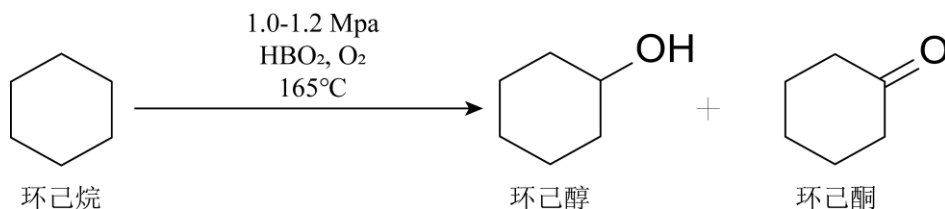


图 1-4 偏硼酸催化法生产 KA 油

Fig. 1-4 Production of mixtures of cyclohexanone and cyclohexanol by metaborate catalysis method

第三步，己二酸的合成(图 1-5)：该步骤是以环己酮和环己醇的混合物为原料，以 50%-60%的硝酸在两级串联的反应器中，通过第二次氧化反应生成己二酸。

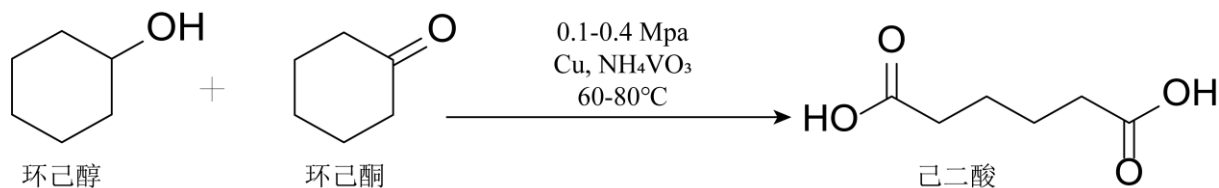


图 1-5 己二酸的合成

Fig. 1-5 Synthesis of adipic acid

由于己二酸是一种大宗化学品,通过化学法合成己二酸在工业大规模量产和生产成本上具有明显的优势^[12]。经醇酮油二次氧化后合成的己二酸,其收率可达到理论收率的92%-96%^[19]。上述三步反应完成后,产物的分离纯化较为简单,仅需要将硝酸蒸馏后去除,再经两次结晶精制,便可以得到高纯度的己二酸^[20]。尽管如此,化学合成法也存在明显的缺点^[21]。首先,己二酸化学合成的反应条件为高温加压以及强酸强碱,反应过程较为恶劣^[22]。同时,生产原料和中间产物不够安全环保,对人体有明显的危害^[23]。最后,生产过程中的一氧化氮和二氧化氮等气体会造成严重的环境污染^[24]。在日益重视环境保护的时代背景下,利用苯或环己烷等传统化工原料生产己二酸已经不能完全满足时代发展对环保经济的需要^[25]。因此,探索一种己二酸的绿色生产方法具有重要的研究意义。

在现有的研究中,研究人员已经初步尝试将生物法和化学合成法相结合生产己二酸,其具体步骤分为两步:第一步,利用微生物发酵法生产顺,顺-粘康酸或葡糖二酸^[26];第二步,通过化学合成法将上述前体物质转化为己二酸^[27]。这一方法的优点在于:(1) 顺,顺-粘康酸或葡糖二酸高产菌株发酵生产己二酸的工艺相对成熟,已经在多种不同的底盘菌株中实现代谢工程改造和小规模发酵的验证^[28]。(2) 利用半生物法合成前体物质顺,顺-粘康酸或葡糖二酸可减少己二酸生产过程中的环境污染^[29]。然而,这一方法在实际应用中依然面临诸多问题,其中最为关键的问题就是己二酸的得率偏低^[30]。这使该方法无法满足工业化大规模生产的需要。同时,在化学合成阶段该方法同样也面临环境污染的问题。

1.2.2 酶法合成

利用酶法合成己二酸是利用全生物法绿色生产己二酸的有益尝试^[31]。在现有的研究中,加利福尼亚大学伯克利分校的 Keasling 课题组通过分离纯化获得聚酮合成酶(PKS),并进行己二酸的体外合成实验。该课题组以琥珀酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 为前体,通过在体外反应体系中加入酮合成酶、酰基转移酶、酮还原酶和酰基载体蛋白,实现了己二酸的合成,产量为 $0.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[32]。

虽然通过体外反应验证了己二酸的酶法合成,但是这一研究不具备工业应用的价值^[33]。主要有以下两点原因:第一,酶促合成反应不具有经济性。整个反应以琥珀酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 作为底物通过酶转化法合成己二酸,在经济实用性上无法与化学合成所用的廉价原料相比拟^[34]。第二,酶促反应体系过于复杂。反应需要多种酶协同作用,系统的复杂性使得产物的合成效率明显偏低^[35]。需要指出的是,体外酶促反应虽然尚不具有工业应用前景,但是可以为己二酸合成路径的体内构建和优化提供研究的理论基础。基于上述多酶级联体外合成己二酸的方法,研究人员尝试通过微生物发酵法在体内进行己二酸的生产^[36]。

1.2.3 微生物发酵

微生物发酵法是实现己二酸绿色生产的潜在方式^[37]。然而,目前在自然界中发现唯一能够天然产生己二酸的微生物来源于褐色嗜热裂孢菌,通过补料分批发酵验证能够合成 $2.23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的己二酸^[38]。但是目前缺乏合适的代谢工程和合成生物学手段对其进行改

造,无法调控己二酸合成路径的相关靶点和代谢流向,从而难以在褐色嗜热裂孢菌中提高己二酸的产量,因此在适宜宿主中构建己二酸生物合成路径是实现己二酸发酵生产的首要问题。在现有的研究中,人工构建的己二酸合成路径主要有以下三种:逆向 β 氧化途径^[39]、碳链衍生途径^[40]和逆己二酸降解(RADP)途径。同时依托于不同的己二酸合成路径和底盘菌株,目前能够完成己二酸的小规模发酵生产,具备一定的工业应用前景^[41]。例如,Zhao 等在大肠杆菌中重新构建了 RADP 途径,实现了己二酸的从头合成,并且在此基础上,对己二酸的上游合成路径进行代谢工程改造,加强了己二酸相关的代谢流量,从而提高了己二酸的产量和得率。最终在 5-L 发酵罐中,以葡萄糖和甘油为底物进行 96 h 的“两阶段”发酵(葡萄糖用于细胞生长,待葡萄糖耗尽后,添加甘油用于生产)^[42]。己二酸的产量和得率分别为 $68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.43 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 甘油,为目前已报道全生物法生产己二酸的最高水平。

需要指出的是,尽管己二酸在产量上有了突破,但是仍然无法达到大规模工业生产的水平,因此,为了实现发酵法高效生产己二酸依然有以下三个问题需要考虑:

(1) 路径的构建问题。目前己二酸的合成路径普遍存在路径过长的问题。第一,较长的路径加大工程菌株构建的难度^[43]。由于涉及多步路径酶催化反应,不同路径酶的表达需要借助多个载体,因此不可避免要使用多种抗生素或诱导剂来维持质粒的稳定性并且诱导基因的表达^[40]。这不仅会影响工程菌株的遗传稳定性,而且抗生素或诱导剂的使用也在一定程度上增加微生物发酵生产的成本^[44]。第二,不同于受到多层次代谢调控的天然代谢途径,人工合成路径调控手段相对单一^[45]。特别是对于涉及多步反应的人工合成路径来说,路径越长、反应越多,则对相关基因表达调控的难度以及对宿主菌株的代谢扰动也越大^[46]。第三,路径的复杂性在一定程度上也会影响产物的合成效率^[47]。在人工构建的路径中,由于基因表达的非同步性或者路径酶的催化效率不同,往往会出现中间代谢物积累的情况^[18]。这不仅会影响产物的合成,抑制细胞活力,严重时甚至会导致某些代谢物产生细胞毒性从而使宿主菌株死亡^[48]。最终,较低的产物合成效率会使发酵时间延长,生产成本增加^[49]。

因此,为了进一步改善己二酸生产路径的效率,首先,需要探索更加先进和广泛的合成生物学工具,以突破褐色嗜热裂孢菌难以代谢改造的瓶颈,提高己二酸的天然生产效率;其次,将异源路径中的基因整合至染色体,从而减少抗生素和诱导剂的使用,以降低己二酸的生产成本;接着,开发多种高效的基因编辑技术,用于调控己二酸合成路径中的代谢流向,加强目的产物己二酸的代谢积累;最后,运用基因组网络代谢模型,在自然界中寻找更短的己二酸合成路径,以提高己二酸的转化率,从而实现己二酸产量的提升。

(2) 路径酶的活性问题。路径酶的活性直接影响产物的合成效率^[37]。由于合成路径涉及多个不同的酶,因此对于路径中的关键限速酶的鉴定和改造就显得至关重要^[50]。但是,受到技术手段的限制,关键限速酶的鉴定会遇到诸多挑战^[51]。如反应物难以获取、没有适合的检测手段等^[37]。即使成功鉴定了路径中的关键限速酶,仅仅依靠酶工程对限速酶进行改造有时也不能有效提高产物的合成效率,这其中往往还涉及路径酶表达的平

衡性、酶的空间分布等问题^[52]。

因此，为了进一步改善己二酸的合成效率，首先，需要开发更为精确和普适的蛋白质改造工具，通过精准鉴定蛋白质的技术手段，确定己二酸合成的关键限速步骤并且进行合理地改造，获得更高转化率的己二酸；其次，探索更加广泛的蛋白质工程应用技术，解决蛋白表达的平衡性和空间分布的相关问题，从而解除限速酶对己二酸合成的限制，提高己二酸的产量；最后，可以结合蛋白组学技术，在蛋白质层面对限速酶进行深入研究，解析路径酶的机理，从而在理论水平寻找提高己二酸合成效率的方法。

(3) 底物的选择问题。较高的理论得率是代谢路径设计时需要考虑的关键因素^[53]。目前常用的做法是基于化学计量法设计合适的代谢路径^[54]。但是，仅从生物催化的角度对所设计路径进行评估是不够的^[9]。因为目标产物高效合成的前提是宿主菌株对底物(如：葡萄糖、木糖、甘油等发酵常用底物)的高效利用^[55]。如果所设计路径中的底物是宿主难以利用的，需要通过多种策略对宿主进行改造以使其能高效利用底物，这必然增加了工程菌株构建的难度^[56]。

因此，为了增强己二酸的合成，首先，可以增加产物对不同底物的耐受性，以提高底物的利用率，从而加强己二酸的生产；其次，通过代谢工程改造手段，激活己二酸合成路径的关键基因，抑制己二酸合成的竞争途径，从而强化己二酸合成的代谢流，以提高己二酸的产量；同时，可以利用生物传感器动态调控细胞生长和产物合成之间的平衡；最后，可以将路径进行模块划分，以缓解多基因带来的细胞负荷。

1.3 微生物生产己二酸的代谢工程改造

代谢工程和合成生物学的发展使得微生物代谢工程可以用于生产先进的生物燃料、大宗化学品和生物医药中间体。在过去的两年中，许多不同的代谢工程策略已被应用于己二酸及其直接前体粘康酸和葡萄糖二酸的微生物合成。特别是，基于前体物质的可再生原料的开发，以及为微生物合成相关化合物而设计的代谢途径和底盘菌株的数量也有所增加，目前己二酸生产的宿主菌株包括但不限于大肠杆菌和酿酒酵母，一些新型的底盘菌株包括能够生产天然芳香化合物的恶臭假单胞菌，纤维素分解细菌褐色嗜热裂孢菌和肺炎克雷伯菌，这些微生物能够代谢多种不同的底物，使得己二酸的微生物发酵生产有更加广泛和多样化的生产(表 1-1)。

表 1-1 微生物生产己二酸的代谢工程研究进展

Table 1-1 Progress in metabolic engineering of adipic acid production by microorganisms

路径种类	底物	合成路径	生产菌株	产 量 (g·L ⁻¹)	发酵模式
	木质素	芳香族化合物合成路径	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	2.50	发酵罐；补料-分批发酵
	甘油	己二酸合成路径	<i>E. Coli</i> MG1655	2.50	摇瓶；分批发酵

表 1-1 微生物生产己二酸的代谢工程研究进展 (续表)

Table 1-1 Progress in metabolic engineering of adipic acid production by microorganisms (continued)

路径种类	底物	合成路径	生产菌株	产量 (g·L ⁻¹)	发酵模式
基于脂肪酸代谢途径	棕榈油	先 β 氧化路径, 后 ω 氧化路径	<i>E. Coli</i> ATCC 8739	1.32	摇瓶; 补料-分批发酵
	葡萄糖	先 ω 氧化路径, 后 β 氧化路径	<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7212	12.10	发酵罐; 补料-分批发酵
基于中心代谢途径	甘油	逆己二酸降解途径	<i>E. coli</i> BL21	68	发酵罐; 补料-分批发酵
	葡萄糖	顺, 顺粘康酸合成路径	<i>E. coli</i> ATCC 31884	0.03	摇瓶; 分批发酵

1.3.1 基于脂肪酸代谢途径的代谢工程改造

己二酸是一种脂肪族的二元羧酸, 因此, 通过脂肪酸代谢途径生产己二酸具有天然的优势。脂肪酸的代谢路径主要包括 α 氧化途径、 β 氧化途径、 ω 氧化途径和拜耳-威利格(Baeyer-Villiger)氧化途径。目前, 应用较多的途径是将 β 氧化路径与 ω 氧化路径相结合, 将脂肪酸进一步转变为具有应用价值的己二酸。同时, 逆向 β 氧化途径和碳链衍生途径同属于脂肪酸代谢途径的部分衍生途径, 目前已有的相关研究基于上述路径成功构建己二酸的合成代谢途径(图 1-6)。其中, 逆向 β 氧化途径是最早用于己二酸生物合成研究的代谢途径^[57]。Yu 等基于逆向 β 氧化途径首次在大肠杆菌中实现了己二酸的从头合成。经发酵验证, 己二酸的产量达到 $639 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[58]。同时, Kallscheuer 等基于逆向 β 氧化途径构建己二酸生物合成的新路径。采用过表达路径酶基因 *PaaJ*、*PaaH*、*PaaF*、*DcaA* 和 *TesB*, 重组大肠杆菌的己二酸产量达到 $150 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[59]。此外, Cheong 等同样以逆向 β 氧化途径为基础对大肠杆菌进行代谢工程改造, 使己二酸在发酵罐中的产量达到 $2.50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[60]。碳链衍生途径是在逆向 β 氧化途径的基础上, 结合 ω -氧化途径来实现己二酸的生物合成^[61]。

碳链衍生途径通过将长链脂肪酸不断缩短的方式生成己二酸, 同时释放乙酰辅酶 A 用于细胞生长^[62]。这一路径可实现碳原子的有效利用, 使理论碳回收率达到 100%, 符合原子经济性的原则^[63]。基于此, Li 等选择棕榈酸和葡萄糖作为底物, 依托碳链衍生途径在大肠杆菌中对己二酸合成路径进行组装。最终在 5-L 发酵罐中经 96 h 的分批补料发酵, 己二酸的产量和得率分别为 $4.66 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.23 \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[64]。

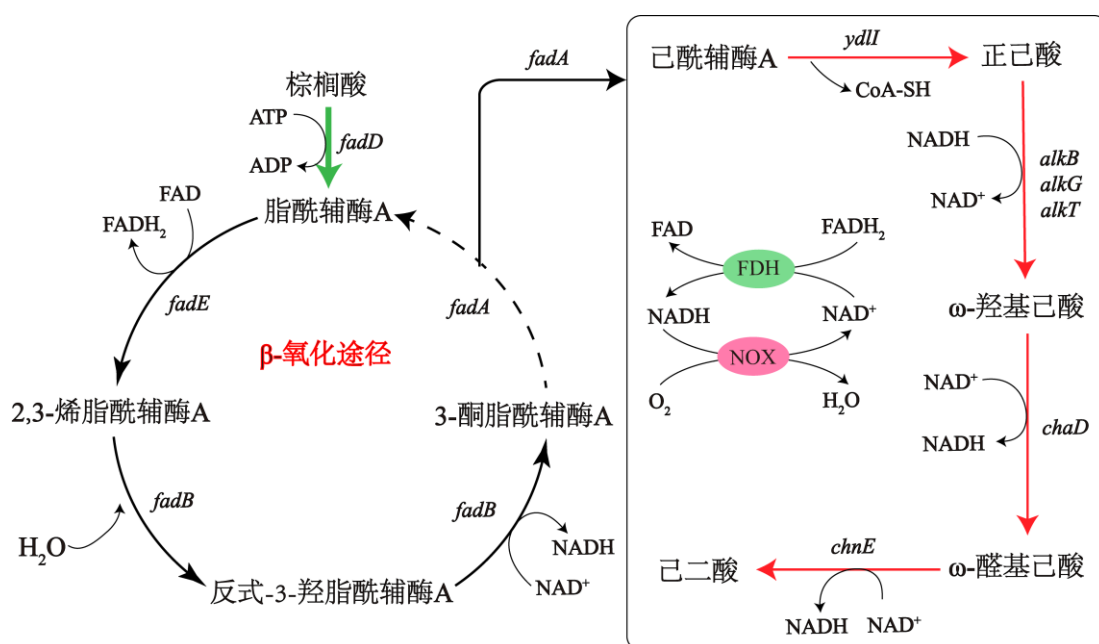


图 1-6 脂肪酸代谢途径合成己二酸

Fig. 1-6 Fatty acid metabolism pathway for synthesizing adipic acid

FadA: 脂肪酸氧化酶复合体 β 亚基; *FadB*: 脂肪酸氧化酶复合体 α 亚基; *FadD*: 脂酰 CoA 合成酶; *FadE*: 脂酰 CoA 脱氢酶; *FadL*: 长链脂肪酸转运蛋白; *YdiI*: 1,4-二羟基-2-萘甲酰 CoA 水解酶; *AlkB*: 烷烃-1-单加氧酶; *AlkG*: 红素氧还蛋白-1; *AlkT*: 红素氧还蛋白-NAD⁺还原酶; *ChnD*: 6-羟基己酸脱氢酶; *ChnE*: 醛脱氢酶; *FDH*: 甲酸脱氢酶; *NOX*: NADH 氧化酶。

基于脂肪酸代谢途径构建的己二酸生物合成路径虽然可以在宿主中实现己二酸的从头合成,但是所构建路径的实际得率远低于理论得率,从而无法实现己二酸的高效生产。这可能是因为基于化学计量法选择的代谢路径仅从生物催化的角度对路径进行评估,但是生物高效合成己二酸的前提是对底物的高效利用。显然,基于脂肪酸代谢途径构建的己二酸生物合成路径所用底物(如甘油、脂肪酸)无法被宿主高效利用,从而抑制了细胞生长。同时,生物体内的脂肪酸代谢途径的代谢效率远低于中心代谢途径,致使基于脂肪酸代谢途径构建的己二酸生物合成路径在实际生产中产量和得率均偏低。

1.3.2 基于中心代谢途径的代谢工程改造

基于中心代谢途径合成己二酸的路径主要包括逆己二酸合成途径,顺,顺-粘康酸途径和芳香族化合物路径。

顺,顺-粘康酸作为芳香族化合物代谢的中间体已经为多种微生物所利用。顺,顺-粘康酸的生物法生产目前正在进行深入的研究,葡萄糖和芳香族化合物是生产顺,顺-粘康酸的两种主要原料。莽草酸途径是目前研究较为集中的顺,顺-粘康酸合成途径。葡萄糖首先代谢生成 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸,然后缩合催化生成 3-脱氢莽草酸(DHS),这是莽草酸途径的重要中间体。接着,DHS 转化为儿茶酚,随后,儿茶酚转化为顺,顺-粘康酸。以莽草酸途径的多种中间体为基础,探索了多条分支代谢途径,从而获得了高产量的顺,顺-粘康酸^[60]。

由于顺,顺-粘康酸与己二酸具有相似的化学结构,有相关研究提出通过消除不饱

和双键将顺, 顺-粘康酸转化为己二酸。因此, 基于这个研究思路开发了化学-生物结合生产己二酸的方法, 该方法首先由微生物发酵产生顺, 顺-粘康酸, 然后通过化学加氢消除顺, 顺-粘康酸中的双键, 最终制备得到己二酸。Frost 和 Draths 等利用大肠杆菌通过初级代谢将葡萄糖转化为 DHS, 首次实现了己二酸的生物法生产, 并利用三种异源途径酶生产原儿茶酸(PCA), 接着转化为儿茶酚, 最终生成顺, 顺-粘康酸, 随后经化学加氢转化为己二酸, 收率达到 90%。这为己二酸的生产提供了一种可持续发展的方法^[56]。

在过去的 20 年里, 越来越多的研究表明, 利用工程微生物来提高己二酸的产量是半生物法合成己二酸的唯一可行途径。然而, 通过对该方法的深入研究, 发现该方法的化学转化能耗较大, 生产成本偏高, 从而影响了该方法合成己二酸的效率。因此, 亟需通过确定关键酶来建立完整的全生物学方法以替代顺, 顺-粘康酸到己二酸的化学加氢步骤。据报道, Enoate 还原酶具有广泛的底物谱, 可以利用 NAD(P)H 作为辅助因子还原不饱和化学物质的 C=C 键^[65]。Joo 等筛选了不同微生物的醋酸还原酶, 发现来自菌株 *Clostridium acetobutylicum* 的天然路径酶可以氢化顺, 顺-粘康酸^[66]。在此基础上, Sun 等在工程大肠杆菌中过表达该酶, 将顺, 顺-粘康酸转化为己二酸^[67]。同时, 研究发现 Enoate 还原酶对氧气很敏感, 这与细胞生长所依赖的有氧环境相矛盾。为了解决这一难题, 作者通过共表达玻璃体振荡菌的血红蛋白来增强氧气的传递, 并开发了一套共培养菌株的体系, 最终在微氧条件下获得了 27.6 mg·L⁻¹ 的己二酸。虽然该研究成功利用大肠杆菌构建全生物法合成己二酸的途径, 但是产物合成效率较低。因此, 研究尝试在酵母中进行同样的工作来提高 Enoate 还原酶的活性, 但是转化率仍然很不理想。因此, Enoate 还原酶的催化效率仍然是这一途径的限速瓶颈, 需要采用更加先进的合成生物学技术来改善这一问题, 包括了解 Enoate 还原酶的表达和催化机制, 使用定向进化技术筛选高氧耐受性的 Enoate 还原酶, 以及结合计算机模拟技术对 Enoate 还原酶进行合理设计^[67]。

此外, 有研究报道肺炎克雷伯菌以木质素为原料, 利用芳香氨基酸生物合成途径, 同时外源引入恶臭假单胞菌的儿茶酚-1,2-双加氧酶, 并且敲除编码 β -酮基己二酸硫解酶 (*pcaF*) 的基因, 通过一系列的基因整合技术, 最终在发酵罐中通过补料分批发酵获得产生 2.50 g·L⁻¹ 的己二酸^[55]。

然而, 微生物发酵法普遍存在生产周期长、生产成本高以及合成效率低的缺点, 本研究选取产量最高的逆己二酸降解途径, 旨在缩短发酵时长, 降低原料成本, 优化路径效率。其中, 逆己二酸降解(RADP)途径最早发现于野生型褐色嗜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)中(图 1-7)。2014 年, Yu 等首次在大肠杆菌中发现了能够异源合成己二酸的路径, 并且实现己二酸的从头生物合成^[58]。2015 年, Deng 等在向 *T. fusca* 菌株的细胞破碎液中添加 Tfu_1647 (5-羧基-2-烯戊酰-CoA 还原酶)的纯酶液后可检测到少量己二酸的积累。在进一步的研究中, 通过对菌株进行突变和代谢组学分析, 研究人员成功发现了该菌株的中存在一条天然的逆己二酸降解途径, 并对路径中涉及的酶和基因进行了鉴定^[68]。

基于中心代谢途径的 RADP 途径虽然在理论得率(1 mol 葡萄糖产生 2/3 mol 己二酸)上和原子经济性上相比于逆向 β 氧化途径和碳链衍生途径(1 mol 脂肪酸产生 1 mol 己二

酸)并无明显优势,然而在己二酸生物合成路径的构建方面却拥有底物利用强和代谢效率高的优势。目前,依托 RADP 途径已实现了己二酸的最高产量。2018 年, Zhao 等基于 RADP 途径,设计并构建了己二酸合成代谢途径^[42]。该路径以中心代谢途径上的乙酰-CoA 和琥珀酰-CoA 为前体,经四步反应合成己二酸。在对大肠杆菌进行代谢工程改造后,成功构建了能高效合成己二酸的大肠杆菌工程菌株,最终在 5-L 发酵罐经 96 h 的发酵,己二酸的产量达到 68 g·L⁻¹。

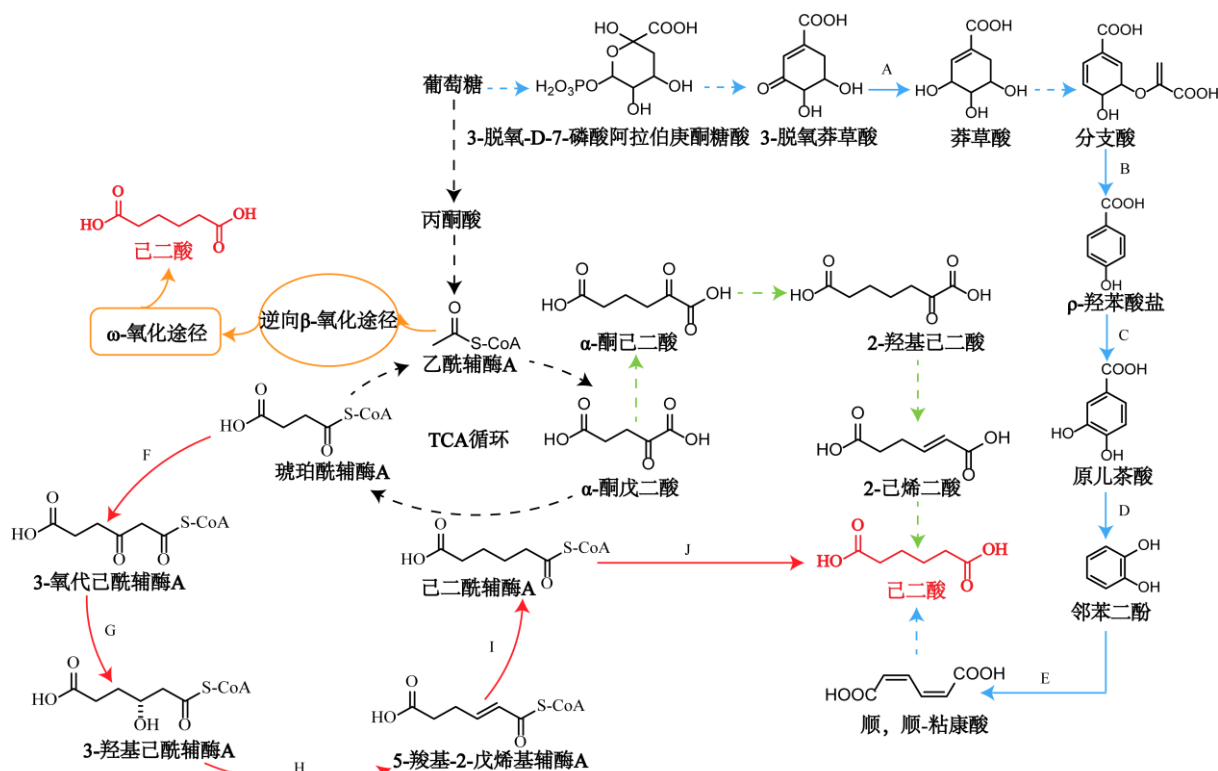


图 1-7 基于中心代谢的己二酸合成途径

Fig. 1-7 Reverse adipic acid degradation pathway

中心碳代谢途径(黑色);反向己二酸降解途径(红色);反向 β - ω -氧化途径(黄色);顺,顺-粘康酸途径(蓝色);2-氧代己二酸衍生途径(绿色);用全线表示的酶促步骤证明了酶促活性,而用虚线表示的酶促步骤没有证明酶促活性;A:莽草酸脱氢酶;B:异分支酸丙酮酸裂合酶;C:对羟基苯甲酸水解酶;D:原儿茶酸脱羧酶;E:邻苯二酚-1,2-二加氧酶;F:硫解酶;G:3-羟酰基-辅酶 A 脱氢酶;H:巴豆酸酶;I:酰基辅酶 a 脱氢酶;J:琥珀酰辅酶 a 合成酶。

1.4 立题依据及研究意义

1.4.1 立题依据

作为国家重点研发计划课题 2021YFC2100700 研究任务的一部分,本研究可为包括己二酸在内的生物基材料单体的生产提供一定的理论依据和技术基础。己二酸是一种具有广阔工业应用价值的二元羧酸^[69]。作为一种重要的大宗化学品,己二酸已被美国能源部列为 12 种最有市场价值的生物基化学品^[70]。己二酸的应用价值主要体现在其可作为关键前体用于合成尼龙 6,6^[10]。此外,己二酸还在医药、化工和材料等领域中有着广泛的应用^[71]。目前,化学合成法是己二酸主要生产方法,但由于生产过程中使用的原料和中间产物有较大的毒性,且对环境污染较大,因此,开发一种环保经济的己二酸生产方

法具有重要研究意义^[72]。

近年来，随着以代谢工程、系统生物学、合成生物学以及进化工程为代表的系统代谢工程的应用，多种高值化合物的微生物细胞工厂成功构建^[4]。这为己二酸的生物合成奠定了坚实的技术基础^[73]。同时在路径设计方面，多种己二酸合成路径的成功构建，为己二酸合成路径优化提供了经验和策略上的指导^[74]。特别是基于 RADP 途径构建己二酸合成路径的成功，更为己二酸的生物合成提供了一个有益的范例^[75]。相对于其他途径而言，RADP 途径能够天然合成己二酸，并且产量较高，基因表达相对协调，有着明显的优势。但是天然的宿主褐色嗜热裂胞菌由于缺乏合适的遗传改造手段，无法直接进行有效的基因编辑。大肠杆菌因其生长迅速，遗传背景清晰并且基因操作技术成熟等优势，被选为合适的底盘菌株。基于上述分析，本研究基于 RADP 途径在大肠杆菌中构建了一条己二酸合成路径。接着，利用代谢工程和发酵工程的一系列手段，使生产菌株具备了一定的应用潜力。

1.4.2 研究意义

本研究在对已报道己二酸生物合成路径进行比较分析的前提上，选择了 RADP 途径用于生物合成己二酸。区别于以往研究，本论文在对合成路径中限速酶进行鉴定的基础上，对合成路径进行强化，成功提高了己二酸的产量。最后，本论文运用组合优化策略平衡胞内乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 前体的供应，进一步提高了己二酸合成效率。本论文为生物法合成己二酸提供一定的研究价值，一方面为其他二元羧酸的绿色生产提供了有益的借鉴，另一方面有利于在生物基材料单体领域推进更加经济环保的生产方式。

1.5 主要内容

本研究首先通过菌株的筛选工作，确定一株能够高效合成己二酸的底盘细胞，随后通过在底盘菌株中引入逆己二酸降解途径的关键酶，在大肠杆菌中构建一条异源的己二酸合成代谢途径。接着，利用代谢改造手段对己二酸合成路径的碳代谢流进行调控，以提高己二酸的合成效率。最后，通过一系列发酵条件和发酵工艺优化的策略，在大幅提高己二酸产量的同时，使工程菌株具备了工业应用的潜力。主要研究内容如下：

(1) 己二酸合成路径的构建和底盘菌株的筛选。主要通过基于从头合成己二酸的路径构建，基于胞内前体浓度的菌株筛选以确定最佳底盘菌株。最后，以双质粒为载体表达己二酸合成路径酶并且组装至最佳底盘菌株中，以实现己二酸在大肠杆菌中的异源代谢合成；

(2) 己二酸底盘菌株的比较基因组分析。运用基因组比较分析工具对底盘菌株进行重测序分析，通过代谢路径和数据库比对等手段，在基因组水平比较了底盘菌株中的差异，寻找影响己二酸合成的关键基因，以进一步改善己二酸合成路径的效率；

(3) 己二酸限速瓶颈的解除和前体平衡的优化。首先，本研究主要运用体外代谢重构策略对己二酸合成路径进行限速步骤的鉴定，其次，通过引入 RBS 工程调控限速酶的蛋白表达，从而解除己二酸合成路径的限速瓶颈。随后，通过抑制副产物基因表达或者激活前体代谢靶点的相关基因，使得己二酸前体物质含量得以提高。最后，通过途径

优化和代谢重组策略使己二酸的前体供应得以平衡；

(4) 己二酸发酵工艺的优化和生产菌株的评价。首先，通过单因素实验对摇瓶发酵体系中的诱导条件进行优化，确定发酵最佳诱导温度和诱导时间。其次，在2.4-L发酵罐上对发酵工艺进行优化，确定最佳发酵工艺，包括接种量、残糖浓度、转速、通气量和溶解氧。最后，基于发酵工艺优化的最佳条件，将反应体系放大至5-L发酵罐，以测定 *E. coli* JL-12生产己二酸的能力。

第二章 材料与方法

2.1 实验所需的材料

2.1.1 菌株和质粒

本研究所使用的菌株和质粒分别如表 2-1 和表 2-2 所示。

表 2-1 研究所使用的菌种
Table 2-1 Strains used in this study

菌株	特征	来源
<i>E. coli</i> JM109	用于底盘菌株构建	实验室保藏
<i>E. coli</i> MG1655	用于底盘菌株构建	实验室保藏
<i>E. coli</i> DH5 α	用于底盘菌株构建	实验室保藏
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	用于蛋白表达和底盘菌株构建	实验室保藏
<i>E. coli</i> W3110	用于底盘菌株构建	实验室保藏
<i>E. coli</i> FMME N-2	对 <i>E. coli</i> FMME-N (CCTCC M2018568 ^[76])进行 ARTP 突变获得	实验室保藏
<i>E. coli</i> JL00	<i>E. coli</i> FMME N-2 带有质粒 pTR-0 和 pTE-0, Amp ^R , Cm ^R	本研究构建
<i>E. coli</i> JL01	<i>E. coli</i> FMME N-2 带有质粒 pTR-0 和 pTE-1, Amp ^R , Cm ^R	本研究构建
<i>E. coli</i> JL02	<i>E. coli</i> FMME N-2 带有质粒 pTR-0 和 pTE-2, Amp ^R , Cm ^R	本研究构建
<i>E. coli</i> JL03	<i>E. coli</i> FMME N-2 带有质粒 pTR-0 和 pTE-3, Amp ^R , Cm ^R	本研究构建
<i>E. coli</i> JL04	<i>E. coli</i> JL01 带有 <i>acs</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子	本研究构建
<i>E. coli</i> JL05	<i>E. coli</i> JL01 带有 <i>pank</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子	本研究构建
<i>E. coli</i> JL06	<i>E. coli</i> JL01 带有 <i>lpd</i> 基因组定点突变	本研究构建
<i>E. coli</i> JL07	<i>E. coli</i> JL01 Δ <i>sdhA</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> JL08	<i>E. coli</i> JL01 Δ <i>sucD</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> JL09	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>acs</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子	本研究构建
<i>E. coli</i> JL10	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>pank</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子	本研究构建
<i>E. coli</i> JL11	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>lpd</i> 基因组定点突变	本研究构建
<i>E. coli</i> JL12	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>acs</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子和 <i>lpd</i> 基因组定点突变	本研究构建
<i>E. coli</i> JL13	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>pank</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子和 <i>lpd</i> 基因组定点突变	本研究构建
<i>E. coli</i> JL14	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>acs</i> 和 <i>pank</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子	本研究构建
<i>E. coli</i> JL15	<i>E. coli</i> JL08 带有 <i>acs</i> 和 <i>pank</i> 基因组将原始启动子替换为 pJ23119 启动子和 <i>lpd</i> 基因组定点突变	本研究构建

表 2-2 研究所使用的质粒
Table 2-2 Plasmids used in this study

质粒	特征	来源
pTrcHisA	trc 启动子, Amp ^R , pBR322 复制起始位点	实验室保藏
pTet	tet 启动子, Cm ^R , p15A 复制起始位点	实验室保藏
pTR-0	pTrcHisA 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_0875</i> 、 <i>Tfu_2399</i> 和 <i>Tfu_0067</i> , Amp ^R , pBR322 复制起始位点	本研究构建
pTE-0	pTet 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_1647</i> 和 <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A 复制起始位点	本研究构建
pTE-1	pTet 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因包含高强度 RBS 的 <i>Tfu_1647</i> 和 <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A 复制起始位点	本研究构建
pTE-2	pTet 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因包含中强度 RBS 的 <i>Tfu_1647</i> 和 <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A 复制起始位点	本研究构建
pTE-3	pTet 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因包含低强度 RBS 的 <i>Tfu_1647</i> 和 <i>Tfu_2576-7</i> , Cm ^R , p15A 复制起始位点	本研究构建
pET28a-1	pET28a 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_0875</i> , Kan ^R , f1 ori	本研究构建
pET28a-2	pET28a 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_2399</i> , Kan ^R , f1 ori	本研究构建
pET28a-3	pET28a 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_0067</i> , Kan ^R , f1 ori	本研究构建
pET28a-4	pET28a 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_1647</i> , Kan ^R , f1 ori	本研究构建
pET28a-5	pET28a 质粒带有来源于 <i>Thermobifida fusca</i> 密码子优化后的基因 <i>Tfu_2576-7</i> , Kan ^R , f1 ori	本研究构建
pETM6R1-RBS _L - <i>egfp</i>	pETM6R1 带有低表达强度的 <i>egfp</i> 基因	本研究构建
pETM6R1-RBS _M - <i>egfp</i>	pETM6R1 带有中表达强度的 <i>egfp</i> 基因	本研究构建
pETM6R1-RBS _H - <i>egfp</i>	pETM6R1 带有高表达强度的 <i>egfp</i> 基因	本研究构建
pCas9	araBAD 启动子, Kan ^R , repA101 复制起始位点	本研究构建
pTargetF	sgRNA, Spe ^R	本研究构建

2.1.2 引物

本研究中所用引物均是通过江苏苏州金唯智有限公司负责合成, 具体引物信息如表 2-3 所示。

表 2-3 研究所使用的引物

Table 2-3 Primers used in this study

名称	序列 (5'→3')	大小 (bp)
Tfu_0875-S	CAGTGATAGAGAAAAGAATTCAAAGAGGAGAAAATG	36
Tfu_0875-A	TGATAGCAGTCTTGCGCATCAATTTCAATCATGGCC	36
Tfu_2399-S	CGCGTTCTGAGGATCCAAAGAGGAGAAAATACAT	34
Tfu_2399-A	ACAGCCGGCGTTTCGAAAGTGTTCCATCGTAGT	32
Tfu_0067-S	GAGCTTCTAGAATTAAGGATTGAGCTCAACTCAGT	35
Tfu_0067-A	AGTGCGGCCGCAAGCTTCTGCAGTTATTATTTTTTATC	38
Tfu_1647-S	GATGATTAATTGTCAAAGCTTTCAGGCAATTCCGTT	37
Tfu_1647-A	CACACAGGAAACAGACCATGAATCAGCCCCTGAAT	35
Tfu_2576-7-S	GCCTTCAGGGTCTCGTTAAGCAGGTCGTAAGCTCGT	35
Tfu_2576-7-A	GCGGTTTGCAAGGTGTGTCGTTTGGTGGTGGTTG	34
RBS-S _L	CGAGATCTGCTTGCAATTCGCGCTATTCGGCTTCCAGCAAAGCG	43
RBS-S _M	CGAGATCTGGACCGTTGTAAGTTACGCATTGCTCACTTCCCTG	43
RBS-S _H	GCTCTAGAAAGAGGGCGCGGCAGAGAAGGAGGAGGTAAGA	40
RBS-A	ACGGAATTGCCAAGCTTTCTTCAAGCTCTGGTAGCTCGT	39
<i>acs</i> -S	ATCTGCAGAAAGAACAAGGGCGTTCAACG	29
<i>acs</i> -A	TACATATGAAAATCATTAGCATTAAAGGAGAAA	32
<i>lpd</i> -S	CCGCCATTTTGTGAAAGCTTAGATCTATAC	30
<i>lpd</i> -A	GACCTGTAGGAAGTACTCACTTGTGAGTGCAGTGCAGAGAC	34
<i>pank</i> -S	CTAGGCCTACTGTGCGAGTACTTCTCGTAAGCCAT	34
<i>pank</i> -A	CACTCGAACGTACGTCAATGCGATGAAGTTGAA	33
<i>sucD</i> -S	TGCAGTAAAAGCCGTTGGTGGTGGTTCTA	29
<i>sucD</i> -A	CGATGTGTGGAATTGTTGGCGGTTTCAGAG	29
<i>sdhA</i> -S	CCTCGAGGTATCCGTAGCATTGCAATGAT	29
<i>sdhA</i> -A	GACGTCAAGATCTTCGATGCACGTAGTC	28

2.1.3 试剂与培养基

(1) 主要试剂

本研究中所需要的试剂如表 2-4 所示。

表 2-4 研究所使用的试剂

Table 2-4 Reagents used in this study

公司	试剂和酶
宝生物工程(大连)有限公司	高保真酶、核酸扩增酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Protein Marker、DNA Maker
生工生物工程(上海)股份有限公司	质粒提取试剂盒(细菌)、胶回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、诱导剂 IPTG、抗生素 Kan、Amp 和 Str
国药集团药业股份有限公司	无水葡萄糖、琼脂粉、三氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、吡啶、HCl、H ₂ SO ₄ 、NH ₄ OH、NaCl、NH ₄ Cl、K ₂ HPO ₄ 、KH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O、FeSO ₄ ·7H ₂ O 和 MgSO ₄ ·7H ₂ O
宝生物工程(大连)有限公司	高保真酶、核酸扩增酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Protein Marker、DNA Maker
生工生物工程(上海)股份有限公司	质粒提取试剂盒(细菌)、胶回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、诱导剂 IPTG、抗生素 Kan、Amp 和 Str

表 2-4 研究所使用的试剂 (续表)

Table 2-4 Reagents used in this study (continued)

公司	试剂和酶
国药集团药业股份有限公司	无水葡萄糖、琼脂粉、三氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、吡啶、HCl、H ₂ SO ₄ 、NH ₄ OH、NaCl、NH ₄ Cl、K ₂ HPO ₄ 、KH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O、FeSO ₄ ·7H ₂ O 和 MgSO ₄ ·7H ₂ O
南京诺唯赞生物科技有限公司	一步法同源重组克隆试剂盒
天根生化科技(北京)	细菌基因组提取试剂盒
英国 OXIOD 公司	酵母粉、蛋白胨
艾美捷科技有限公司	无水四环素(aTc)
上海阿拉丁生化科技股份有限公司	FAD、NAD ⁺ 、ATP、CoA-SH、己二酸、N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺和三甲基氯硅烷

(2) 其他试剂

(i) 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲盐溶液: 称取 1.42 g Na₂HPO₃, 0.27 g K₂HPO₃, 8 g 氯化钠, 0.20 g 氯化钾, 加入 800 mL 蒸馏水充分溶解后, 用氨水将 pH 值调至 7.4 左右, 再用蒸馏水定容至 1 L。

(ii) 液相流动相的配制(1 L):

称取 275 μL 稀硫酸, 倒入 1 L 容量瓶中, 加入 ddH₂O 至刻度线。盖上容量瓶的玻璃盖, 进行上下颠倒摇匀, 静置后可使用。

(3) 培养基

LB 培养基: 菌株生长的培养; TB 培养基: 全细胞转化; 发酵培养基: 己二酸的发酵生产, 具体配方如表 2-5 所示。

表 2-5 实验所用的培养基

Table 2-5 Medium used in the experiment

培养基	成分
LB 培养基	酵母粉 5 g·L ⁻¹ 、蛋白胨 10 g·L ⁻¹ 、NaCl 10 g·L ⁻¹ 。LB 固体培养基额外添加 20 g·L ⁻¹ 琼脂粉
TB 培养基	酵母粉 24 g·L ⁻¹ 、胰蛋白胨 12 g·L ⁻¹ 、甘油 4 g·L ⁻¹ 、K ₂ HPO ₄ 2.3 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O 16.4 g·L ⁻¹
发酵培养基	玉米浆 7.5 g·L ⁻¹ 、K ₂ HPO ₄ 1.4 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 0.6 g·L ⁻¹ 、(NH ₄) ₂ SO ₄ 3.3 g·L ⁻¹ 、葡萄糖 20 g·L ⁻¹

2.1.4 主要仪器

本研究中所需要的试剂如表 2-6 所示。

表 2-6 实验所用的仪器设备

Table 2-6 Instruments and equipment used in experiments

主要实验仪器	生产厂家
超净工作台	苏州净化设备有限公司
BIORAD Thermal Cycler PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
分光光度计	UNIC(上海)仪器有限公司

表 2-6 实验所用的仪器设备 (续表)

Table 2-6 Instruments and equipment used in experiments (continued)

主要实验仪器	生产厂家
5-L 发酵罐	Biotech 上海保兴生物设备工程有限公司
超声波破碎仪	美国 SONICSX750
电子天平	奥豪斯仪器(上海)有限公司
高效液相色谱系统	北京普源精电科技有限公司(RIGOL)
pH 计	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
制冰机	斯科茨曼制冰系统有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
GC-2030AF 型气相色谱仪	日本 Shimadzu 公司
5804R 型高速离心机	德国 Eppendorf 公司
测糖仪	SBA-40E 生物传感分析仪
ÄKTA 蛋白纯化仪	美国通用电气(GE)公司
多功能酶标仪	瑞士 TECAN 帝肯酶标仪
DYY-6C 型电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
医用低温冰箱	海尔电器公司
2.4-L 发酵罐	迪必尔生物工程(上海)有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 分子生物学实验方法

(1) 引物设计

本研究中所用引物均是通过软件 SnapGene 1.1.3 设计完成。引物序列见表 2-3 所示。

(2) PCR 扩增产物的回收和纯化

PCR 反应程序如表 2-7 所示。

表 2-7 PCR 扩增体系

Table 2-7 PCR amplification system

条件	时间
95°C 预变性	5 min
95°C 变性	30 s
58°C 退火温度	1 min
72°C 进行延伸	5 min
循环	×30
72°C 终延伸	10 min

融合 PCR 体系如表 2-8 所示。

表 2-8 融合 PCR 体系的配制

Table 2-8 Fusion PCR system preparation

试剂	体积(μL)
5×Prime STAR Buffer	10
dNTPs (2.5 mmol·L ⁻¹)	5

表 2-8 融合 PCR 体系的配制 (续表)

Table 2-8 Fusion PCR system preparation (continued)

试剂	体积(μL)
5 \times Prime STAR Buffer	10
dNTPs (2.5 mmol \cdot L $^{-1}$)	5
片段 1 (<500 ng)	2
片段 2 (<500 ng)	2
Prime STAR $^{\text{®}}$ DNA 聚合酶	0.5
ddH $_2$ O	加至 50

(3) 重组质粒的构建

(i) 表达载体 pTR-0 和 pTE-0 的构建

提取质粒 pET28a-0875、pET28a-2399、pET28a-0067、pET28a-1647 和 pET28a-2576-7, 作为扩增目标片段的模板, 根据基因序列设计引物对扩增片段 0875、2399 和 0067, 胶回收后保存。随后, 用引物对 0875-S/A、2399-S/A 和 0067-S/A 分别扩增 0875、2399 和 0067 基因, 经过融合 PCR 得到融合片段 0875-2399-0067。提取质粒 pTrcHisA, 用 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切并产物纯化回收, 经同源重组得到质粒 pTrcHisA (*EcoRI-SalI*)。将融合片段 0875-2399-0067 连接至载体 pTrcHisA (*EcoRI-SalI*)的 *EcoRI* 和 *SalI* 位点, 产生载体 pTrcHisA-0875-2399-0067, 命名为 pTR-0。

同理, 用引物对 1647-S/A 和 2576-7-S/A 分别扩增 1647 和 2576-7 基因, 经过融合 PCR 得到融合片段 1647-2576-7。提取质粒 pTet, 用 *SpeI* 和 *HindIII* 双酶切并产物纯化回收, 经同源重组得到质粒 pTet (*SpeI-HindIII*)。将融合片段 1647-2576-7 连接至载体 pTet (*SpeI-HindIII*)的 *SpeI* 和 *HindIII* 位点, 产生载体 pTet-1647-2576-7, 命名为 pTE-0。

(ii) 表达载体 pTE-1-3 的构建

用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切载体 pTet, 通过引物对 1647-RBS-S_i (i: L, M, H)/1647-RBS-A 从质粒 pETM6R1-RBS_{L/M/H}-*egfp* 扩增 *egfp* 基因, 经酶切连接、转化、PCR 验证和测序分析, 得到目标载体 pTE-1-3。

(4) 重组质粒的热激转化

(i) 重组质粒的提取

将阳性转化子接种于 10 mL LB 液体抗性培养基中, 置于摇床 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r \cdot min $^{-1}$ 过夜培养。每次吸取 1.2 mL 的菌液于 1.5 mL EP 管中, 置于离心机中, 8000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 2 min, 完成后弃去上清。最后按照上海生工公司 DNA 质粒抽提试剂盒说明书进行质粒的抽提操作。

(ii) 重组质粒的热激转化

将大肠杆菌感受态细胞从-40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出, 置于冰上解冻。完成后将 1 μL 质粒加入装有感受态细胞的 EP 管中, 缓慢吹吸混匀, 立即置于冰上冰浴 30 min 使质粒吸附于细胞表面。随后将 EP 管放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中热激 60 s。完成后立即将其置于冰上冰浴 5 min。完成后再加入 1 mL LB 液体培养基, 并将 EP 管置于旋转摇床 37 $^{\circ}\text{C}$, 220 r \cdot min $^{-1}$ 培养 1-2 h, 使感受态细胞复苏。培养时间结束后, 将 EP 管复置于离心机中, 8000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 2

min。完成后弃去 1 mL 的上清。随后用将余留的上清液将细胞沉淀轻轻混匀，涂布于 LB 抗性平板中，并置于 37°C 培养箱培养 8-10 h。完成后挑取抗性平板上的单菌落，进行菌落扩增 PCR 验证以挑取阳性转化子。最后将带有重组质粒的阳性转化子测序，并进行序列的比对分析。

2.2.2 己二酸的发酵测试

(1) 摇瓶水平的发酵测试

将工程菌在 30 mL LB 培养基、37°C、220 r·min⁻¹ 培养 12 小时，以初始 OD₆₀₀ 为 0.1 转接到 50 mL 发酵培养基(包含 20 g·L⁻¹ 的葡萄糖)中，37°C、220 r·min⁻¹ 培养至对数中期，加入诱导剂以诱导目的基因表达，转至 37°C、220 r·min⁻¹ 进行基因的表达及产物的生成。

(2) 5-L 发酵罐水平的放大验证

在迪必尔四联罐(2.4-L)和 5-L 发酵罐中验证己二酸的生产。将 *E. coli* JL12 过程菌株在转接至 50 mL 种子培养基，10% 接种量转接至发酵培养基中，到对数中期后，添加诱导剂，并用氢氧化铵控制酸碱度。

(3) 分析检测方法

(i) 葡萄糖浓度的测定

将发酵液 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液稀释若干倍后，用生物传感分析仪检测，以测定发酵液中的葡萄糖含量。

(ii) 液相色谱法检测有机酸

本研究中的己二酸和副产物均采用 HPLC 测定。取 1 mL 发酵液 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min，上清液用 0.22 μm 滤膜过滤，HPLC 定量检测发酵液中的有机酸。检测条件如下：色谱柱：Aminex HPX-87H (Bio-rad, USA)，流动相：5 mmol·L⁻¹ 稀硫酸-乙腈(97:3, v/v)，流速：0.3 mL·min⁻¹，柱温：30°C，进样量：20 μL，检测器：紫外检测器，波长：210 nm。

2.2.3 其他实验方法

(1) 酶促反应动力学的测定

反应体系共 100 μL，包括 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)，0.2 mmol·L⁻¹ 乙酰辅酶 A，0.2 mmol·L⁻¹ 琥珀酰辅酶 A，0.2 mmol·L⁻¹ 二硫代二硝基苯甲酸。反应加入 1 μL 纯酶后开始进行。反应温度 30°C，在 412 nm 处，每隔 10 s 记录一次吸光度变化，记录至底物消耗至 10% 为止。每分钟产 1 μmol·L⁻¹ CoA 的酶量定义为 1 个酶活单位。

(2) 底盘菌株的重测序分析

采用 Illumina HiSeq/Novaseq/MGI2000 对目标菌株进行 DNA 重测序，同时下一代测序文库的制备按照制造商的协议构建。首先每个样本提取 200 μg 的基因组 DNA。随后由被 Covaris 对基因组进行随机切割，所获片段的大小平均为 300-350 bp。接着用末端修饰酶的预混液对这些片段进行末端修复，分别对 5'端进行磷酸化修饰，而对 3'端进行腺苷化修饰，并在两端添加适配体。完成后每个样品分别用 P5 和 P7 引物进行 PCR 扩增 8 个循环，而两引物均有在退火后进行桥式 PCR 的序列，且 P7 引物由于携带六个

碱基，因此可用于多轮扩增。所获 PCR 产物使用安捷伦 2100 生物分析仪进行清理和验证。最后在 illumina HiseqXten/Novaseq/MGI2000 系统上对符合条件的文库进行 PE150 端测序。

数据结果使用 Cutadapt (V1.9.1)首先去除适配体、PCR 引物、N 碱基含量大于 10% 以及碱基质量低于 20 的序列。接着使用 BWA (V0.7.17)将处理后的数据映射到参考基因组中，并通过 Picard (V2.25.7)对映射结果进行处理，以消除重复。

HaplotypeCaller 使用 GATK (V3.8.1)软件调用 SNV/InDel。SNV/InDel 的注释由 Annovar (V21 april 2018)执行。利用 breakdancer 和 CNVnator 进行基因组结构变异分析。

(3) 胞内前体物质的测定

取一定量的细胞培养液与提前预冷的 60% 甲醇水溶液混合，以终止所有生化反应。在 4°C 下 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后收集细胞，并用提前预冷的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤细胞两次。向细胞中加入一定量的 6% 高氯酸，超声波破碎(300 W，脉冲开启，1 s；脉冲关闭，5 s)处理 10 min 后，以 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min，吸取上清液备用。全程严格保持在冰上进行操作。

(i) 胞内琥珀酰辅酶 A 的检测

为了测定细胞内的琥珀酰辅酶 A，高效液相色谱系统在 45°C 下使用系统(TSQ Quantum Ultra EMR)和色谱柱(Hypersil GOLD a Q1.9-μm, 2.1×50 mm)进行检测。1 μL 的样品注入色谱柱中，并使用乙腈(A)和 5 mmol·L⁻¹ 的醋酸铵溶液(pH 5.0) (B)以 0.2 mL·min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱，0-2.0 min, 100% B; 2.1-5.0 min, 95% B; 5.1-7.0 min, 60% B; 7.1-8.0 min, 保持在 40% B; 8.0-8.1 min, 回到 100% B; 8.1-11.0 min, 保持在 100% B 下以重新平衡色谱柱。质谱参数流速：0.2 ml·min⁻¹；喷涂电压：3200 V (正离子模式)和 2800 V (负离子模式)，蒸发温度：50°C，鞘气压力：35 arb，离子吹扫气体压力：0 arb，辅助气体压力：15 arb，毛细管温度：350°C。

(ii) 胞内乙酰辅酶 A 的检测

前期细胞处理及破碎方法与琥珀酰辅酶 A 的处理方法一致。在 4°C 下加入 K₂CO₃ 调节 pH 至 3.0。然后 0.22 μmol·L⁻¹ 过滤上清液用于 HPLC 测量。C18 色谱柱(ODS2 Hypersil, 5 μm; 赛默飞)连接至紫外检测器上 254 nm 检测吸收峰，使用缓冲液 A (0.20 mol·L⁻¹ 磷酸钠, pH 5.0)和缓冲液 B (0.25 mol·L⁻¹ 800 mL 磷酸钠, pH 5.0 和 200 mL 乙腈的混合物)用作流动相，流速：0.3 mL·min⁻¹，柱温：25°C。梯度洗脱条件：0-5.0 min, 3% B; 5.0-7.5 min, 18% B; 7.5-12.5 min, 28% B; 12.5-18 min, 保持在 40% B; 18-20 min, 回到 42% B; 20-22 min, 保持在 3% B 下以重新平衡色谱柱。

(4) 泛酸激酶(PanK)和乙酰辅酶 A 合成酶(Acs)酶活测定

泛酸激酶酶活测定方法参考相关文献所述进行测定^[80,81]；乙酰辅酶 A 合成酶酶活测定采用羟胺法，具体参考相关文献所述进行测定^[82]。

(5) 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

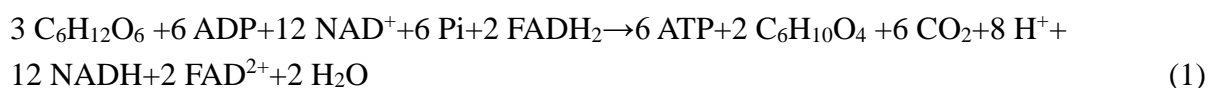
RT-qPCR 快速实时定量 PCR 系统(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)进行，具体参考相关文献所述进行测定^[83]。

第三章 结果与讨论

3.1 己二酸合成路径的构建和底盘菌株的筛选

3.1.1 己二酸合成路径的构建

为了实现己二酸的高效合成，本研究通过整合糖酵解途径、TCA 循环和 RADP 途径，构建了以葡萄糖为底物，利用乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 为前体物质，由路径酶 β -酮硫解酶(Tfu_0875)、3-羟酰基-辅酶 A 脱氢酶(Tfu_2399)、3-羟基己二酰-辅酶 A 脱氢酶(Tfu_0067)、5-羧基-2 戊烯酰-辅酶 A 还原酶(Tfu_1647)、琥珀酰辅酶 A 合成酶 α 亚基和 β 亚基(Tfu_2576-7)参与的己二酸合成代谢途径(图 3-1)。因此，葡萄糖转化为己二酸的化学计量方程如(1)所示，己二酸的理论得率为 $2/3 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，1 g 葡萄糖可以生产 0.54 g 己二酸。



(1)式中：

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ —葡萄糖；

ADP—腺苷二磷酸；

NAD^+ —烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；

Pi—磷酸基团；

FADH_2 —还原型黄素二核苷酸；

ATP—腺嘌呤核苷三磷酸；

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ —己二酸；

NADH—烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原态；

FAD^{2+} —黄素腺嘌呤二核苷酸。

为了评估菌株是否具有转化葡萄糖为己二酸的能力，在菌株 *E. coli* BL21 (DE3)中进行全细胞转化实验。转化体系包括：39.1 mmol·L⁻¹ 葡萄糖，用磷酸缓冲盐溶液定容，湿菌体量为 30 g·L⁻¹，反应温度为 37°C。经过气相质谱检测，转化液中含有 0.16 g·L⁻¹ 己二酸。但是，己二酸的合成效率太低，仅为理论值的 9%。因此，需要通过底盘菌株的筛选与代谢工程改造等手段，强化大肠杆菌从头合成己二酸的效率。

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/725222102040011114>