

代谢工程改造大肠杆菌生产 α -酮戊二酸

朱攀*, 孙馨怿, 李雨菲, 陈佳颖, 方雨婷

江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡

朱攀, 孙馨怿, 李雨菲, 陈佳颖, 方雨婷. 代谢工程改造大肠杆菌生产 α -酮戊二酸[J]. 微生物学报, 2026, 66(1): 364-376.
ZHU Pan, SUN Xinyi, LI Yufei, CHEN Jiaying, FANG Yuting. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -ketoglutarate production[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(1): 364-376.

摘要: α -酮戊二酸是一种重要的短链有机酸, 广泛应用于食品、医药、化妆品和饲料等领域。然而, 生物发酵法生产 α -酮戊二酸的效率有待进一步提高, 主要受限于微生物内源代谢途径的合成能力。**【目的】** 开发能高效生产 α -酮戊二酸的大肠杆菌, 为未来大规模生产 α -酮戊二酸提供理论支撑。**【方法】** 采用理性代谢工程改造 α -酮戊二酸合成途径与非理性常压室温等离子体诱变 (atmospheric and room temperature plasma mutagenesis, ARTP) 相结合的方法解除内源代谢途径的限制, 提高 α -酮戊二酸的合成效率。**【结果】** 通过表达丙酮酸羧化酶、柠檬酸合成酶、顺乌头酸酶和异柠檬酸脱氢酶重构了 α -酮戊二酸合成的氧化 TCA 途径, 有效提升了 α -酮戊二酸产量。借助 ARTP 技术, 非理性优化并强化了 α -酮戊二酸合成的代谢网络, 进一步提高了其合成能力。通过敲除乳酸、乙酸和甲酸代谢途径的相关基因有效减少了碳代谢流的损耗, 提高了 α -酮戊二酸合成前体——丙酮酸的供给效率。在此基础上, 进一步敲除 α -酮戊二酸降解途径的相关基因, 使碳代谢流在 α -酮戊二酸节点滞留, 提高了 α -酮戊二酸产量。通过优化发酵条件, 在 5 L 发酵罐中工程菌株 *Escherichia coli* KA29 的 α -酮戊二酸产量、得率和生产强度分别达到 28.7 g/L、0.29 g/g 和 0.48 g/(L·h)。**【结论】** 本研究策略为 α -酮戊二酸高产菌株的开发与应用奠定了基础, 同时也为代谢工程改造生产其他有机酸提供了参考。

关键词: 大肠杆菌; α -酮戊二酸; 丙酮酸; 常压室温等离子体诱变; 代谢工程; 发酵优化

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20241629); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP124023)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20241629) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP124023).

*Corresponding author. E-mail: zhupan@jiangnan.edu.cn

Received: 2025-07-17; Accepted: 2025-09-05; Published online: 2025-10-09

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -ketoglutarate production

ZHU Pan*, SUN Xinyi, LI Yufei, CHEN Jiaying, FANG Yuting

School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: α -ketoglutarate is an important short-chain organic acid that is widely used in various fields such as food, medicine, cosmetics, and animal feed. However, the efficiency of producing α -ketoglutarate through biological fermentation remains to be improved, primarily due to the limitations in the synthetic capacity of microbial metabolic pathways. **[Objective]** To address the above issues, we developed an engineered *Escherichia coli* that can efficiently produce α -ketoglutarate, thereby providing theoretical support for the large-scale production of α -ketoglutarate in the future. **[Methods]** We employed an efficient approach combining rational and irrational modifications to overcome the constraints of endogenous metabolic pathways and enhance the biosynthesis efficiency of α -ketoglutarate. **[Results]** The oxidative TCA pathway was reconstructed to improve α -ketoglutarate production through expressing pyruvate carboxylase, citrate synthase, aconitase, and isocitrate dehydrogenase. The metabolic network for α -ketoglutarate biosynthesis was irrationally optimized and strengthened to enhance its biosynthesis capability by atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis. To improve the supply efficiency of the precursor for α -ketoglutarate biosynthesis, we reduced the dissipation of carbon flux in the pyruvate node by knocking out genes related to the accumulation of lactate, acetate, and formate. Furthermore, we knocked out the genes related to the degradation pathway of α -ketoglutarate to achieve the retention of carbon flux at α -ketoglutarate node and improve its production. Through the optimization of fermentation conditions, the fermentation in a 5 L fermenter with the engineered strain *E. coli* KA29 achieved the α -ketoglutarate titer, yield, and productivity of 28.7 g/L, 0.29 g/g, and 0.48 g/(L·h), respectively. **[Conclusion]** The research strategies mentioned above lay a foundation for the development and application of strains with high production of α -ketoglutarate and provide a reference for metabolic engineering to produce other organic acids.

Keywords: *Escherichia coli*; α -ketoglutarate; pyruvate; atmospheric and room temperature plasma mutagenesis; metabolic engineering; optimization of fermentation conditions

α -酮戊二酸是一种重要的短链羧酸分子, 广泛应用于食品、医药、化妆品和动物饲料等领域^[1]。此外, α -酮戊二酸作为三羧酸循环和氨基酸代谢中的关键二元酸, 在氨基酸形成和氮转运过程中发挥着重要作用^[2]。 α -酮戊二酸的生产方法主要有化学合成法、微生物发酵法和酶催化法。由

于化学合成法易引发环境污染等问题, 因此 α -酮戊二酸生产方法的研究主要聚焦于微生物发酵法和酶催化法。研究表明, 微生物发酵法生产 α -酮戊二酸所涉及的微生物主要有大肠杆菌(*Escherichia coli*)、球拟假丝酵母(*Candida glabrata*)和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)等^[3-4]。

为实现发酵法生产 α -酮戊二酸，发酵优化和代谢工程策略已被广泛用于提高酵母生产 α -酮戊二酸的效率。一方面，采用发酵优化策略调节胞内 α -酮戊二酸的合成途径、增强细胞的 α -酮戊二酸合成能力，是提高 α -酮戊二酸产量的有效方法。通过调节生物素和 Ca^{2+} 浓度实现了 *C. glabrata* 胞内碳流在丙酮酸和 α -酮戊二酸之间的重新分配，分批发酵 64 h 时 α -酮戊二酸产量提高至 43.7 g/L^[5]。此外，以 *Y. lipolytica* WSH-Z06 为出发菌株，通过两阶段 pH 控制策略和甘油补加策略， α -酮戊二酸产量达到了 66.2 g/L^[6]。虽然通过优化发酵条件能够提高菌株生产 α -酮戊二酸的能力，但该策略存在对发酵条件要求较高、发酵过程不易控制、菌株生产性能易波动等问题。另一方面，采用代谢工程策略改造和优化 α -酮戊二酸的合成途径，以期实现高效、稳定生产 α -酮戊二酸的目标。通过在 *C. glabrata* 中强化内源乙酰 CoA 合成酶(ACS2)的表达水平，有效增加了胞内乙酰 CoA 的积累量，进而使 α -酮戊二酸产量提高了 2.47 倍^[7]；通过在 *C. glabrata* 中适当提高丙酮酸脱氢酶、丙酮酸羧化酶和丙酮酸脱羧酶的活性，并降低 α -酮戊二酸脱氢酶的活性，最终使 α -酮戊二酸产量提高至 37.7 g/L^[8-9]。在 *Y. lipolytica* WSH-Z06 中分别过表达来自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 的丙酮酸羧化酶， α -酮戊二酸产量分别提高了 24.5% 和 35.4%^[10]；通过在 *Y. lipolytica* WSH-Z06 中表达来自小鼠 (*Mus musculus*) 的柠檬酸裂合酶，调节辅因子代谢以改变碳代谢流分布，从而使 α -酮戊二酸产量提高至 56.5 g/L^[11]。虽然通过对酵母进行改造能够提高 α -酮戊二酸产量，但 α -酮戊二酸的发酵周期仍然较长。

与酵母相比，*E. coli* 具有更快的生长速度和更强的代谢能力。因此，通过代谢工程改造 *E. coli* 能够在缩短发酵周期的同时提高 α -酮戊二酸产量。通过在 *E. coli* 中构建与优化 α -酮戊二酸合成的氧化 TCA 途径、消除丙酮酸下游代谢副产物和 α -酮戊二酸降解代谢途径、优化乙酰

CoA 供给等策略，使 α -酮戊二酸产量达到了 32.2 g/L^[12]。然而，目前关于代谢工程改造 *E. coli* 生产 α -酮戊二酸的研究较少，因此 *E. coli* 生产 α -酮戊二酸的潜力有待进一步挖掘。本研究以 *E. coli* 为出发菌株，采用理性代谢工程改造策略，包括强化氧化 TCA 途径、消除丙酮酸节点的副产物途径、阻断 α -酮戊二酸分解代谢途径等，以及非理性代谢工程改造策略——常压室温等离子体诱变(atmospheric and room temperature plasma mutagenesis, ARTP)，有效改善了 α -酮戊二酸生产(图 1)。最终，工程菌株 *E. coli* KA29 的 α -酮戊二酸产量达到 28.7 g/L，该研究为利用

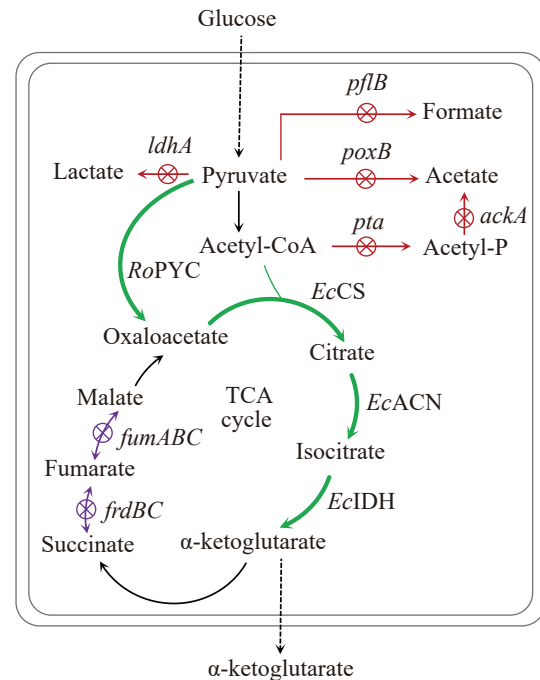


图1 代谢工程改造大肠杆菌生产 α -酮戊二酸

Figure 1 Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -ketoglutarate production. RoPYC: Pyruvate carboxylase; EcCS: Citrate synthase; EcACN: Cis-aconitase; EcIDH: Isocitrate dehydrogenase; *ldhA*: Lactate dehydrogenase gene; *pflB*: Pyruvate formate lyase gene; *poxB*: Pyruvate oxidase gene; *pta*: Phosphotransacetylase gene; *ackA*: Acetate kinase gene; *fumABC*: Fumarase gene; *frdBC*: Fumarate reductase gene.

E. coli 生产 α -酮戊二酸奠定了实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

以 *E. coli* CICC 23846 作为底盘菌株进行代谢工程改造以生产 α -酮戊二酸。*E. coli* JM109 主要用于重组质粒构建。本研究所使用的菌株信息见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、PrimeSTAR 高保真酶、Taq DNA 聚合酶等分子生物学基因操作相关酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 一步同源重组酶, 南京巨匠生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、产物纯化试剂盒等分子生物学基因操作相关试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌与酵母基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; α -酮戊二酸, Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂, 国药集团化学试剂有限公司。PCR 引物由亦欣生物科技(上海)有限公司合成。

PCR 扩增仪、凝胶成像仪、电转仪、电泳仪、高速离心机, 艾本德股份公司; SBA 生物

传感仪, 山东科学院生物研究所; 高效液相色谱仪, ThermoFisher Scientific 公司; 分析天平、精密 pH 计, 梅特勒-托利多公司; 5 L 发酵罐, 迪必尔生物工程(上海)有限公司。

1.2 分子操作方法

采用 CRISPR-Cas9 技术^[13], 在底盘菌株 *E. coli* CICC 23846 基因组的中性位点 *ygaY*、*ilvG*、*lafU* 和 *rph* 处分别插入 *RoPYC*、*EcCS*、*EcACN* 和 *EcIDH* 基因, 依次获得菌株 *E. coli* KA01、*E. coli* KA02、*E. coli* KA03 和 *E. coli* KA04。以 *E. coli* KA01 的构建过程为例, 采用融合 PCR 方法将 *ygaY* 上下游同源臂和带有 *Trc* 启动子的基因 *RoPYC* 进行连接, 获得 *RoPYC* 整合框, 将其与质粒 pTargetF 和 pCas 共同转入菌株 *E. coli* CICC 23846 中筛选获得阳性克隆, 消除质粒后获得 *RoPYC* 基因整合的菌株 *E. coli* KA01。采用相同的方法构建 *EcCS*、*EcACN* 和 *EcIDH* 基因过表达的菌株 *E. coli* KA02、*E. coli* KA03 和 *E. coli* KA04。此外, 采用上述方法分别获得 *ldhA*、*poxB*、*pflB*、*pta-ackA*、*frdBC* 和 *fumABC* 基因敲除盒, 将其与质粒 pCas 和 pTargetF 共同转入菌株 *E. coli* KA25 中, 依次获得菌株 *E. coli* KA26、*E. coli* KA27、*E. coli* KA28 和 *E. coli* KA29。

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 种子培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

1.3.2 发酵培养基

M9 无机盐培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, NH₄Cl 1.0, Na₂HPO₄·12H₂O 15.1, KH₂PO₄ 3.0, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.3, 微量元素液 1 mL。微量元素液(g/L): FeCl₃·6H₂O 2.4, CoCl₂·6H₂O 0.3, CuCl₂ 0.2, ZnCl₂·4H₂O 0.3, NaMnO₄ 0.3, H₃BO₃ 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.5, 溶于 0.1 mol/L HCl 中配制。

NBS 无机盐培养基(g/L): 葡萄糖 50.0,

表1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Descriptions	Sources
<i>E. coli</i> C2	<i>E. coli</i> CICC 23846	CICC
<i>E. coli</i> KA00	<i>E. coli</i> C2	This study
<i>E. coli</i> KA01	<i>E. coli</i> C2 Δ <i>ygaY</i> :: <i>RoPYC</i>	This study
<i>E. coli</i> KA02	<i>E. coli</i> KA01 Δ <i>ilvG</i> :: <i>EcCS</i>	This study
<i>E. coli</i> KA03	<i>E. coli</i> KA02 Δ <i>lafU</i> :: <i>EcACN</i>	This study
<i>E. coli</i> KA04	<i>E. coli</i> KA03 Δ <i>rph</i> :: <i>EcIDH</i>	This study
<i>E. coli</i> KA24	<i>E. coli</i> KA04, ARTP mutagenesis	This study
<i>E. coli</i> KA25	<i>E. coli</i> KA04, ARTP mutagenesis	This study
<i>E. coli</i> KA26	<i>E. coli</i> KA25 Δ <i>ldhA</i>	This study
<i>E. coli</i> KA27	<i>E. coli</i> KA26 Δ <i>poxB</i> Δ <i>pta-ackA</i>	This study
<i>E. coli</i> KA28	<i>E. coli</i> KA27 Δ <i>pflB</i>	This study
<i>E. coli</i> KA29	<i>E. coli</i> KA28 Δ <i>frdBC</i> Δ <i>fumABC</i>	This study

(NH₄)₂HPO₄ 3.5, KH₂PO₄ 3.5, K₂HPO₄ 5.0, MgSO₄·7H₂O 0.3, CaCl₂·2H₂O 15.0 mg/L, 维生素 B1 0.5 mg/L, 1 mL 微量元素液。微量元素液(g/L): FeCl₃·6H₂O 2.4, CoCl₂·6H₂O 0.3, CuCl₂ 0.2, ZnCl₂·4H₂O 0.3, NaMnO₄ 0.3, H₃BO₃ 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.5, 溶于 0.1 mol/L HCl 中配制。

AM1 无机盐培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, (NH₄)₂HPO₄·12H₂O 2.6, NH₄H₂PO₄ 0.9, KCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.4, 微量元素液 1 mL。微量元素液(g/L): FeCl₃·6H₂O 2.4, CoCl₂·6H₂O 0.3, CuCl₂ 0.2, ZnCl₂·4H₂O 0.3, NaMnO₄ 0.3, H₃BO₃ 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.5, 溶于 0.1 mol/L HCl 中配制。

MR 无机盐培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, (NH₄)₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 6.7, MgSO₄·7H₂O 0.8 g/L, 柠檬酸 0.8 g/L, 微量元素液 1 mL。微量元素液(g/L): FeSO₄·7H₂O 10.0, CaCl₂·2H₂O 2.0, ZnSO₄·7H₂O 2.2, MnSO₄·4H₂O 0.5, CuSO₄·5H₂O 1.0, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.1, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.1, 溶于 5 mol/L HCl 配制。

mAM1 培养基: 在 AM1 无机盐培养基中添加 4.0 g/L 酵母提取物。

1.3.3 种子培养

从甘油管中蘸取菌液划线于 LB 平板, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 挑取新鲜的单菌落接种至 50 mL/250 mL 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 条件下培养 10 h。

1.3.4 摇瓶发酵

以起始 OD₆₀₀=0.5 的接种量, 将菌液接种至 50 mL/250 mL 的 M9 无机盐培养基中, 并加入 30 g/L 灭菌 CaCO₃, 于 37 °C、200 r/min 条件下培养 60 h。在发酵 24 h 时补加葡萄糖 50 g/L。

1.3.5 5 L 罐发酵

重组菌经平板活化后, 挑取单菌落接入装液量为 50 mL/250 mL 的 mAM1 培养基中, 在 37 °C、200 r/min 条件下培养 10–12 h 后作为种子液, 以起始 OD₆₀₀=0.5 的接种量, 接种于 5 L 罐发酵(含 2.5 L mAM1 培养基)中, 通气量 1 vvm、转速 300 r/min, 37 °C 培养 60 h。发酵

过程中采用 4 mol/L NaOH 控制 pH 为 7.0。当初始葡萄糖消耗完毕后开始持续流加葡萄糖至发酵结束, 控制葡萄糖浓度在 1–5 g/L。

1.4 ARTP 诱变

1.4.1 菌悬液制备

从甘油管中蘸取菌液划线于 LB 平板, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 挑取新鲜的单菌落接种 50 mL/250 mL 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 条件下培养 10 h。将菌液 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 弃去培养基, 菌体用 PBS 溶液洗涤 3 次, 再用生理盐水重悬, 采用细菌计数板计数, 调整菌悬液浓度约 10⁸ 个/mL, 备用。

1.4.2 ARTP 诱变

取 10 μL 上述菌悬液滴在灭菌后的金属载片中央(ARTP 仪专用配件), 并置于 ARTP 诱变育种仪中进行诱变。以氮气为工作气体, 设定功率为 120 W, 处理温度为室温, 通气量为 10 SLPM (standard liters per minute), 等离子体发射源与样品间的距离为 5 mm, 处理时间设置为 30 s。将诱变处理后的载片放入装有 990 μL 种子培养基的 1.5 mL 离心管中振荡 100 s, 之后转入装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 适当稀释后取 100 μL 涂布于固体培养基, 置于 37 °C 恒温培养 24 h。

1.5 生物量测定

菌体浓度利用可见分光光度计进行测定, 测定波长为 600 nm, 并根据 1 OD₆₀₀=0.3 g/L 细胞干重(dry cell weight, DCW)的比例关系来计算菌体生物量。

1.6 葡萄糖含量测定

发酵液中葡萄糖浓度稀释 100 倍后使用生物传感分析仪进行检测。

1.7 有机酸含量测定

发酵液中有有机酸含量使用高效液相色谱仪进行测定, 分析条件如下: 色谱柱为 Atlantis[®] dC18 (5 μm, 4.6 mm×250 mm); 流动相为 0.1 mol/L KH₂PO₄(采用 H₃PO₄ 调节至 pH 2.8), 进样量 10 μL,

检测波长 215 nm, 柱温 20 °C, 流速 0.6 mL/min。

1.8 统计学分析

统计分析结果均以 mean±SD 表示, 每组实验至少进行 3 次生物学重复。使用 GraphPad Prism 8.0 进行 *t* 检验分析, 对数据均值之间的统计差异进行分析, 其中: *表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$; ***表示 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 α -酮戊二酸合成途径的构建

在 *E. coli* 合成 α -酮戊二酸的过程中葡萄糖首先通过糖酵解途径生成丙酮酸, 丙酮酸再经 TCA 循环生成 α -酮戊二酸。为提高 α -酮戊二酸的合成能力, 通过基因过表达强化了从丙酮酸到 α -酮戊二酸的代谢途径, 主要涉及 4 个关键

酶: 源自 *R. oryzae* 的丙酮酸羧化酶(*RoPYC*)、*E. coli* 本源的柠檬酸合成酶(*EcCS*)、顺乌头酸酶(*EcACN*)和异柠檬酸脱氢酶(*EcIDH*) (图 2A)。结果表明, 工程菌株 *E. coli* KA04 的 α -酮戊二酸产量达到 5.5 g/L, 较对照菌株 *E. coli* KA00 (1.2 g/L) 提高了 358.3% (图 2B)。与此同时, 工程菌株 *E. coli* KA04 的生物量(dry cell weight, DCW)较对照菌株 *E. coli* KA00 提高了 35.4% (图 2B)。此外, 工程菌株 *E. coli* KA04 也能积累一定量的副产物, 如含有 6.2 g/L 丙酮酸、5.4 g/L 乳酸、4.3 g/L 乙酸和 2.4 g/L 甲酸。上述结果表明, 菌株 *E. coli* KA04 可用于生产 α -酮戊二酸, 但 α -酮戊二酸的生产水平仍较低, 需进一步提高其产量。

2.2 ARTP 诱变增强 α -酮戊二酸生产

以 *E. coli* KA04 为出发菌株进行 ARTP 诱

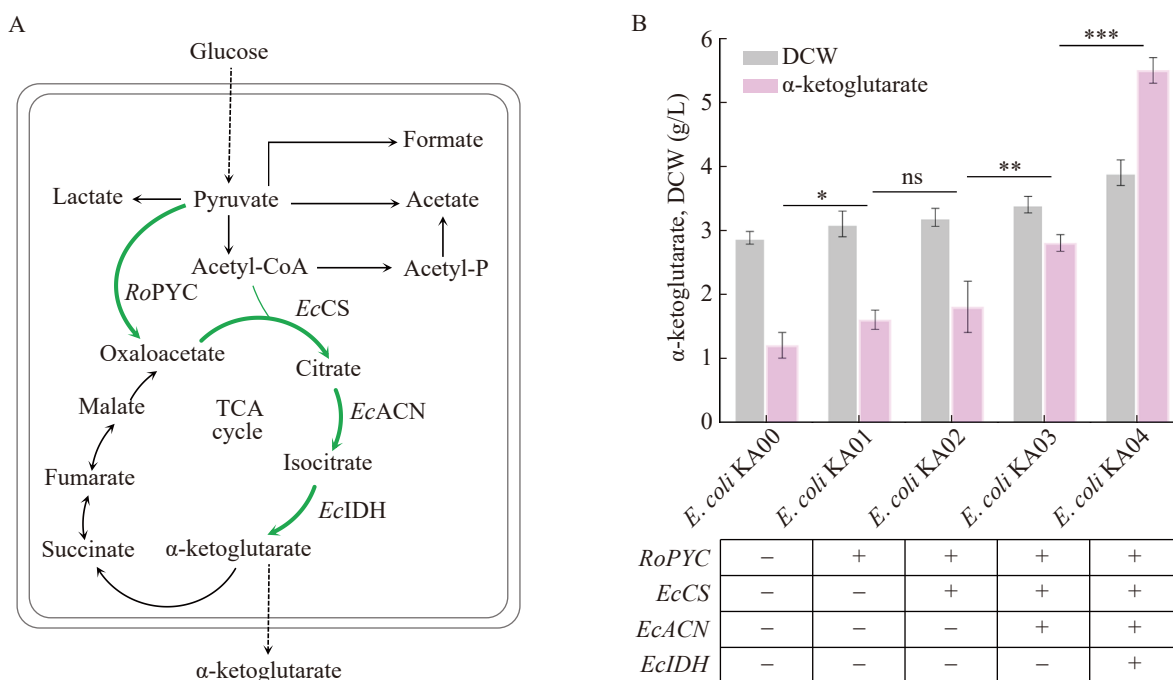


图2 α -酮戊二酸合成途径的构建。A: 重构TCA循环生产 α -酮戊二酸; B: 基因过表达对 α -酮戊二酸生产的影响。

Figure 2 Construction of the biosynthetic pathway of α -ketoglutarate. A: Rewiring the TCA cycle for α -ketoglutarate production; B: Effect of gene overexpression on the production of α -ketoglutarate. *RoPYC*: Pyruvate carboxylase; *EcCS*: Citrate synthase; *EcACN*: *Cis*-aconitase; *EcIDH*: Isocitrate dehydrogenase. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: Not significant. -: No gene overexpression; +: Gene overexpression.

变, 根据 α -酮戊二酸产量, 对筛选平板上长出的 200 株 ARTP 突变菌株进行初步筛选, 获得 32 株 α -酮戊二酸产量高于 *E. coli* KA04 的突变菌株, 正突变率达 16.0% (图 3A)。在此基础上, 对上述初筛获得的突变菌株进行复筛, 其中 25 株突变株的 α -酮戊二酸产量高于出发菌株 *E. coli* KA04 (图 3B)。突变株 *E. coli* KA24 和 *E. coli* KA25 的 α -酮戊二酸产量分别达到了 9.8 g/L 和 10.2 g/L, 较对照菌株 *E. coli* KA04 分别提高了 78.2% 和 85.5% (图 3B)。将上述复筛获得的 2 株突变株进行传代发酵验证, 并分析其遗传稳定性。以摇瓶发酵获得的 α -酮戊二酸产量为指标, 突变株 *E. coli* KA25 的 α -酮戊二酸产量不仅高于出发菌株 *E. coli* KA04 且产量变化幅度小 (图 3C)。上述结果表明, 突变株 *E. coli* KA25 具有良好的遗传稳定性, 适合进一步进行代谢工程改造生产 α -酮戊二酸。

2.3 α -酮戊二酸合成前体供给优化

通过 ARTP 诱变获得的突变株 *E. coli* KA25 在改善 α -酮戊二酸积累的同时也增加了副产物的积累, 如含有 8.8 g/L 丙酮酸、7.4 g/L 乳酸、5.5 g/L 乙酸和 2.7 g/L 甲酸 (图 4B)。为减少碳代谢流的损耗, 敲除了副产物乳酸、乙酸和甲酸代谢途径涉及的相关基因 (图 4A)。为降低乳酸积累, 敲除了乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*); 为降低乙酸积累, 敲除了丙酮酸氧化酶基因 (*poxB*)、磷酸转乙酰酶基因 (*pta*) 和乙酸激酶基因 (*ackA*); 为降低甲酸积累, 敲除了丙酮酸甲酸裂解酶基因 (*pflB*)。结果表明, 工程菌株 *E. coli* KA28 的 α -酮戊二酸产量达到 15.4 g/L, 较出发菌株 *E. coli* KA25 提高了 51.0% (图 4B)。与此同时, 工程菌株 *E. coli* KA28 的丙酮酸 (3.3 g/L)、乳酸 (2.1 g/L)、乙酸 (1.5 g/L) 和甲酸 (0.6 g/L) 含量较出发菌株 *E.*

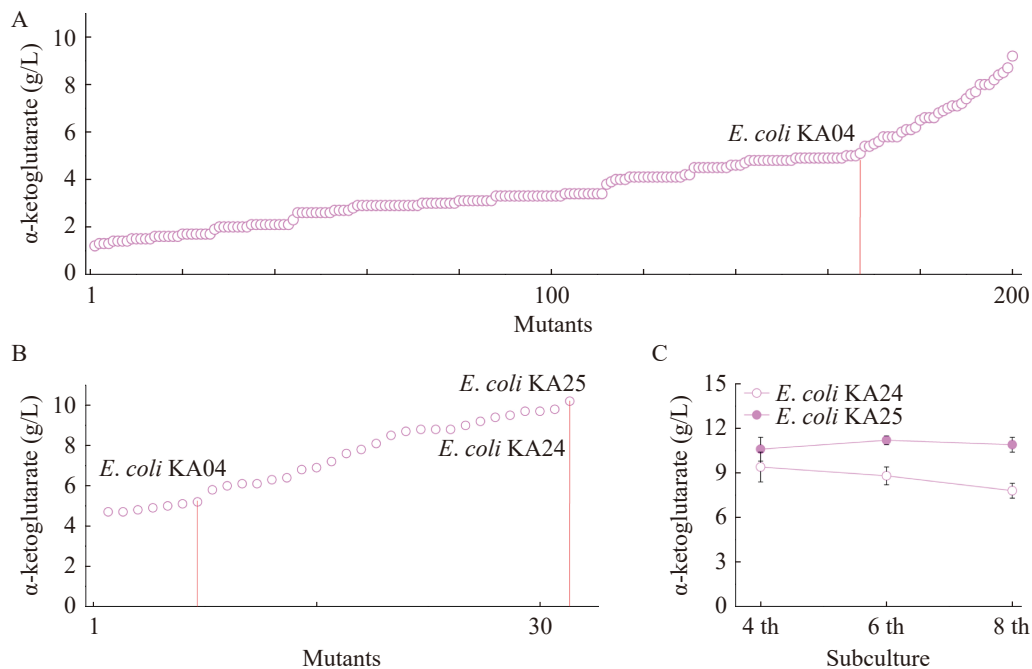


图3 ARTP诱变增强 α -酮戊二酸生产。A: 初筛ARTP诱变对 α -酮戊二酸生产的影响; B: 复筛ARTP诱变对 α -酮戊二酸生产的影响; C: *E. coli*突变菌株*E. coli* KA24和*E. coli* KA25的遗传稳定性。

Figure 3 ARTP mutagenesis for enhancing the production of α -ketoglutarate. A: Effect of ARTP mutagenesis on α -ketoglutarate production through primary screen; B: Effect of ARTP mutagenesis on α -ketoglutarate production through secondary screen; C: The genetic stability of *E. coli* mutants, *E. coli* KA24 and *E. coli* KA25.

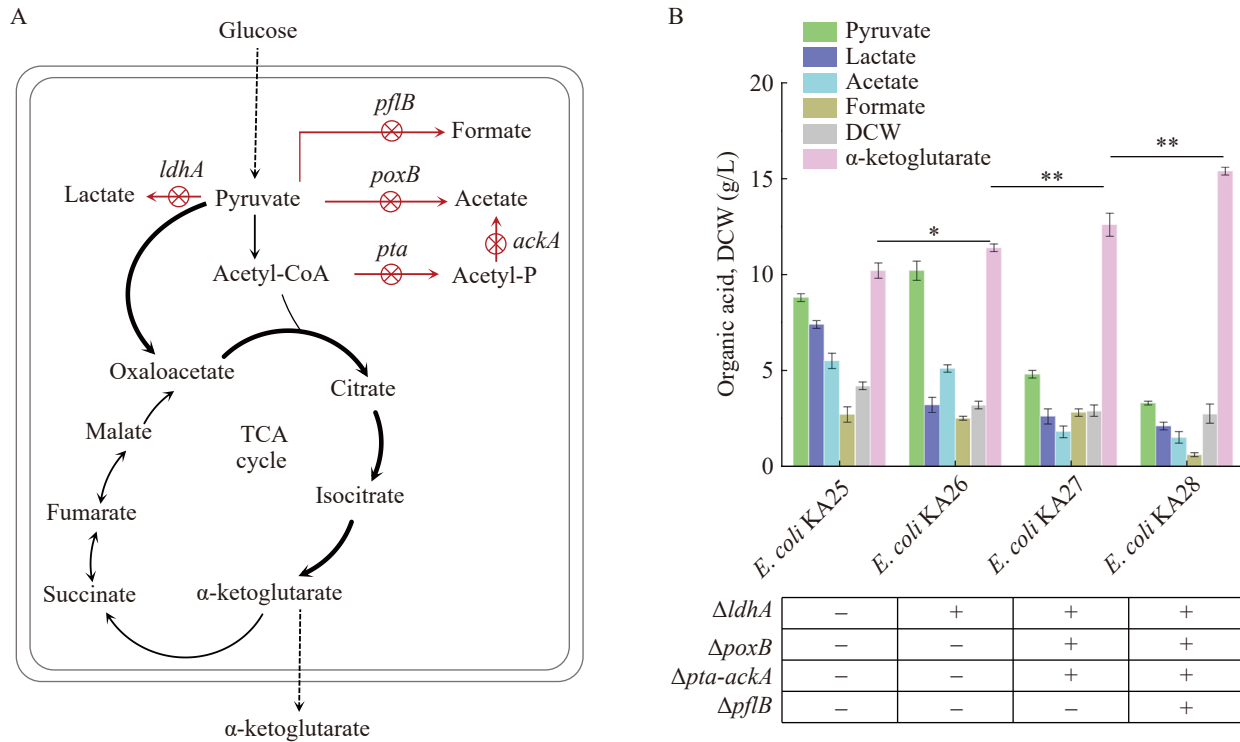


图4 α -酮戊二酸合成前体供给优化。A: 重构副产物代谢途径以生产 α -酮戊二酸; B: 基因敲除对 α -酮戊二酸生产的影响。

Figure 4 Optimization of the supply of precursors for α -ketoglutarate production. A: Rewiring the metabolic pathways of by-products for α -ketoglutarate production; B: Effect of gene deletion on the production of α -ketoglutarate. *ldhA*: Lactate dehydrogenase gene; *pflB*: Pyruvate formate-lyase gene; *poxB*: Pyruvate oxidase gene; *pta*: Phosphotransacetylase gene; *ackA*: Acetate kinase gene. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. -: No gene overexpression; +: Gene overexpression.

coli KA25 分别降低了 62.5%、71.6%、72.7% 和 77.8% (图 4B)。此外, 工程菌株 *E. coli* KA28 的生物量(DCW)较出发菌株 *E. coli* KA25 降低了 34.7% (图 4B)。上述结果表明, 通过敲除副产物积累相关代谢途径有利于增加 α -酮戊二酸合成前体的供给, 从而提高 α -酮戊二酸的产量。

2.4 α -酮戊二酸合成降解途径阻断

通过敲除副产物代谢途径相关基因有效降低了副产物的积累, 使更多碳代谢流用于 α -酮戊二酸生产。然而, 在工程菌株 *E. coli* KA28 生产 α -酮戊二酸的过程中仍积累了 0.4 g/L 琥珀酸、4.6 g/L 苹果酸和 3.8 g/L 富马酸(图 5B)。为阻断 α -酮戊二酸降解途径, 降低其下游副产物

的积累, 在 *E. coli* KA28 中进一步敲除富马酸还原酶基因(*frdBC*)和富马酸酶基因(*fumABC*), 获得了工程菌株 *E. coli* KA29 (图 5A)。结果表明, 工程菌株 *E. coli* KA29 的 α -酮戊二酸产量达 18.6 g/L, 较出发菌株 *E. coli* KA28 提高了 20.8% (图 5B)。与此同时, 工程菌株 *E. coli* KA29 的苹果酸(2.3 g/L)和富马酸(1.5 g/L)较出发菌株 *E. coli* KA28 分别降低了 50.0% 和 60.5%, 而琥珀酸积累量无明显变化(图 5B)。此外, 工程菌株 *E. coli* KA29 的生物量(DCW)较 *E. coli* KA28 降低了 15.4%。上述结果表明, 敲除 α -酮戊二酸下游副产物积累相关基因有利于将碳代谢流滞留于 α -酮戊二酸节点, 从而提高 α -酮戊

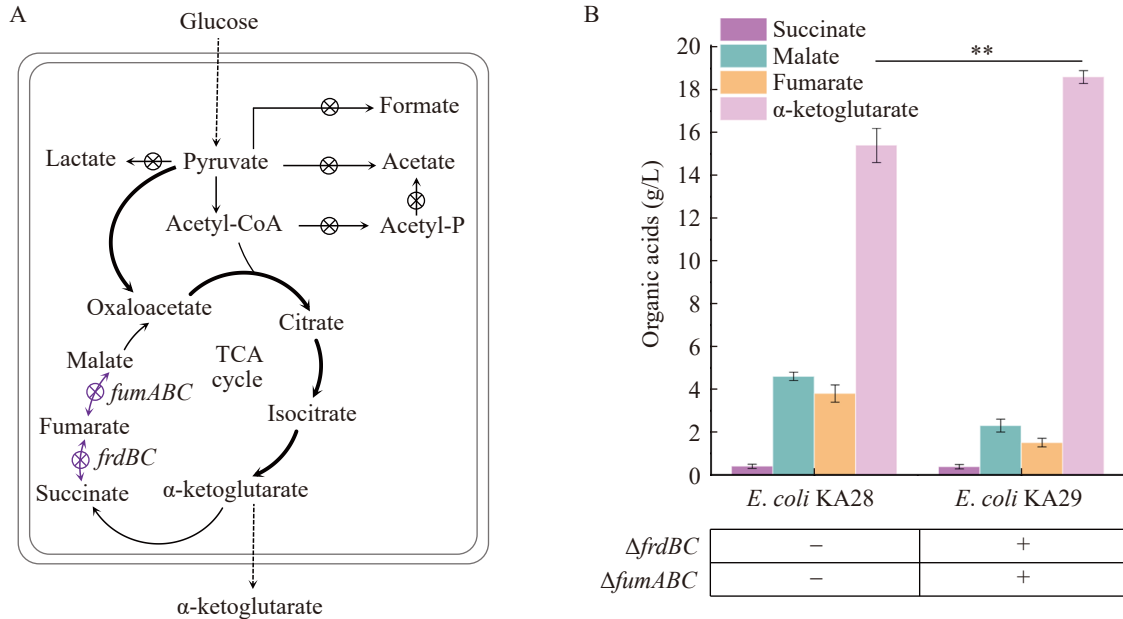


图5 α -酮戊二酸合成降解途径阻断。A: 重构 α -酮戊二酸降解代谢途径; B: 基因敲除对 α -酮戊二酸生产的影响。

Figure 5 Blocking the degradation pathway of α -ketoglutarate. A: Rewiring the metabolic pathways of α -ketoglutarate degradation; B: Effect of gene deletion on the production of α -ketoglutarate. *fumABC*: Fumarase gene; *frdBC*: Fumarate reductase gene. **: $P < 0.01$. -: No gene overexpression; +: Gene overexpression.

二酸产量。

2.5 发酵优化生产 α -酮戊二酸

菌株、培养基成分以及发酵条件是决定微生物发酵产酸性能的3个关键因素。为考察工程菌 *E. coli* KA29 的 α -酮戊二酸生产性能, 分别优化了发酵培养基和发酵条件。培养基 M9^[14-16]、NBS^[17-18]、AM1^[12]、mAM1^[19] 和 MR^[20] 已广泛应用于 *E. coli* 发酵生产乳酸、富马酸、苹果酸、 α -酮戊二酸、苯甲酸等有机酸。因此, 测定了工程菌 *E. coli* KA29 在 M9、NBS、mAM1、AM1 和 MR 等5种发酵培养基中的产酸情况(图 6A)。在5种培养基中, mAM1 培养基效果最优, 既有利于菌株 *E. coli* KA29 生长, 又最适合生产 α -酮戊二酸, 生物量(DCW)和 α -酮戊二酸产量分别达到 5.5 g/L 和 20.5 g/L。上述结果表明, mAM1 培养基更有利于 α -酮戊二酸的积累, 因此选择 mAM1 培养基用于后续研究。

溶氧水平对细胞生长和碳代谢流分布起着关键作用。因此, 考察了 50、100、200 和 300 r/min 转速条件下工程菌 *E. coli* KA29 的产酸情况(图 6B)。随着转速提高, 工程菌 *E. coli* KA29 的 α -酮戊二酸产量呈逐渐增加趋势。当转速从 200 r/min 提高到 300 r/min 时工程菌 *E. coli* KA29 的 α -酮戊二酸产量进一步增加至 24.5 g/L。上述结果表明, 溶氧水平可能会影响工程菌 *E. coli* KA29 在 α -酮戊二酸节点的碳代谢流分布, 进而在一定程度上增加 α -酮戊二酸产量。

在 5 L 发酵罐上进一步验证了上述培养基和溶氧水平对工程菌 *E. coli* KA29 生产 α -酮戊二酸的影响。经过 60 h 的补料分批发酵, 生物量(DCW)最大达 7.5 g/L, α -酮戊二酸产量、得率和生产强度分别达 28.7 g/L、0.29 g/g 和 0.48 g/(L·h) (图 6C)。此外, 发酵副产物丙酮酸、琥珀酸和苹果酸积累量分别为 5、6.3、4.3 g/L, 而乳酸、乙酸、甲酸和富马酸积累量均在 1.0 g/L 以下(图 6D)。

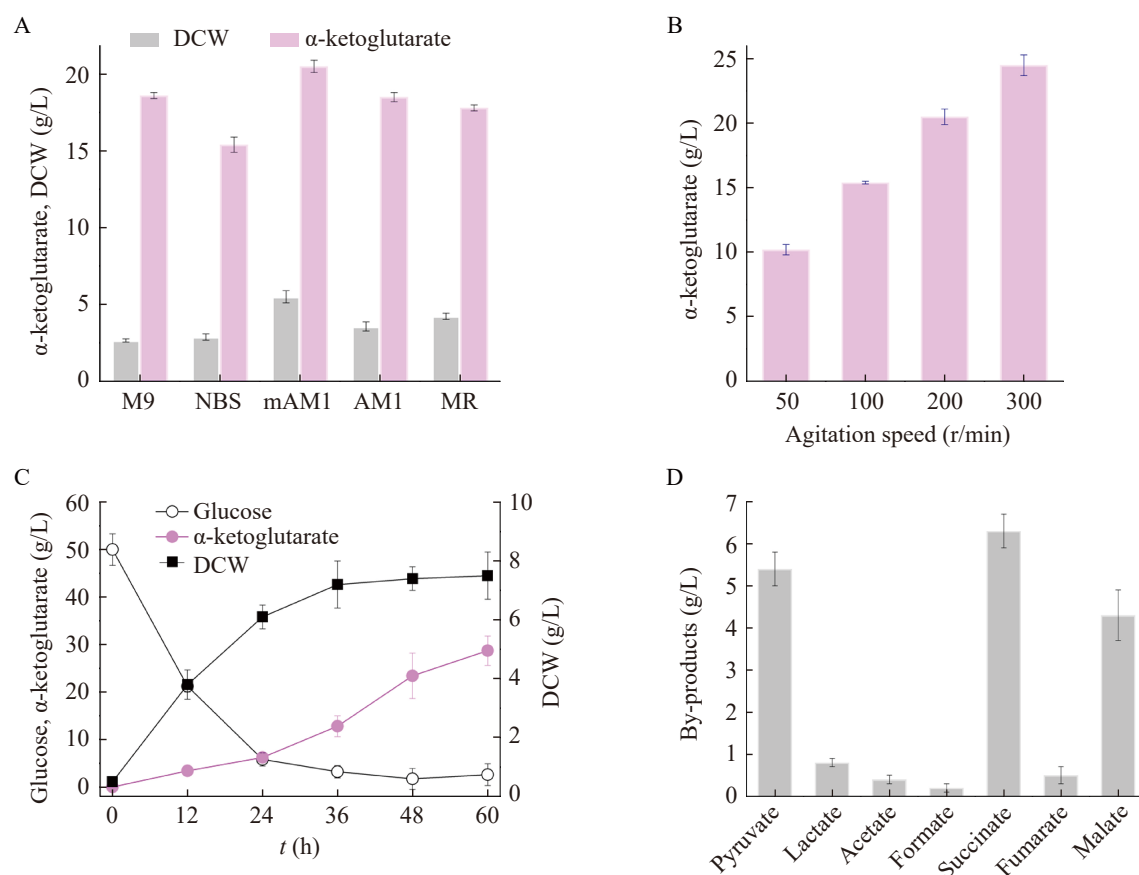


图6 发酵优化生产 α -酮戊二酸。A: 培养基优化; B: 搅拌转速优化; C: 在5 L发酵罐上, *E. coli* KA29 补料分批发酵生产 α -酮戊二酸; D: *E. coli* KA29发酵过程中积累的副产物。

Figure 6 Fermentation optimization for the production of α -ketoglutarate. A: Culture medium optimization; B: Agitation speed optimization; C: Production of α -ketoglutarate with *E. coli* KA29 in a 5 L fed-batch bioreactor; D: The accumulation of by-products during the fermentation of *E. coli* KA29.

上述结果表明, 工程菌 *E. coli* KA29 对于高效生产 α -酮戊二酸具有较大潜力。

3 讨论与结论

本研究以 *E. coli* 为出发菌株, 采用理性与非理性代谢工程改造相结合的策略, 重构并强化了 α -酮戊二酸合成的氧化 TCA 途径, 显著提高了 α -酮戊二酸产量。通过发酵条件优化, 在 5 L 发酵罐上工程菌株 *E. coli* KA29 的 α -酮戊二酸产量、得率和生产强度分别达到了 28.7 g/L、0.29 g/g 和 0.48 g/(L·h)。本研究为微生物发酵法生产 α -酮戊二酸提供了新的研究思路, 同时也

为利用代谢工程改造 *E. coli* 生产其他有机酸提供了参考。

代谢工程策略已广泛应用于改造工业微生物以生产 α -酮戊二酸。目前采用的主要策略有 5 种: 构建 α -酮戊二酸合成途径、强化 α -酮戊二酸前体供给途径、消除 α -酮戊二酸竞争性代谢途径、优化 α -酮戊二酸合成过程中的辅因子平衡以及提高 α -酮戊二酸外转运能力。一方面, 在 *E. coli* 中构建了 α -酮戊二酸合成的氧化 TCA 途径, 敲除了丙酮酸节点的副产物途径以及 α -酮戊二酸下游降解途径, 优化了氧化 TCA 途径表达水平和乙酰 CoA 供给, 最终 α -酮戊二酸产量达到

了 32.2 g/L^[12]。上述研究与本研究的区别主要体现在以下 3 个方面。(1) 出发菌株不同, 上述研究使用的出发菌株为野生型 *E. coli* W3110, 而本研究采用能够积累一定富马酸的 *E. coli* CICC 23846。(2) 理性代谢工程改造的侧重点不同, 上述研究虽然对 α -酮戊二酸合成途径以及竞争性代谢途径进行了改造, 但更侧重于 α -酮戊二酸合成途径的优化和前体乙酰 CoA 供给的强化。由于本研究采用了富马酸积累型底盘菌株 *E. coli* CICC 23846, 因此更注重 α -酮戊二酸合成途径的改造。(3) 发酵条件不同, 上述研究采用的发酵培养基中含有 20.0 g/L 蛋白胨和 10.0 g/L 酵母提取物, 发酵条件为搅拌速度 200 r/min 和通气量 1 vvm; 而在本研究中发酵培养基中含有 4.0 g/L 酵母提取物, 发酵条件为搅拌速度 300 r/min 和通气量 1 vvm。本研究的发酵培养基成分相对更简单, 更便于下游提取, 有利于降低成本。综上所述, 未来的研究可能侧重于以下 2 个方面:(1) 深入分析 α -酮戊二酸合成途径的限制性瓶颈, 以及解除瓶颈的代谢工程与合成生物学策略;(2) 由于副产物途径以及降解途径的敲除在一定程度上阻碍了细胞生长, 因此可以采用提高乙酰 CoA 供给、弱化降解途径等策略改善细胞生长。

另一方面, 在 *Y. lipolytica* 中通过过量表达异柠檬酸脱氢酶(IPD1)和丙酮酸羧化酶(PYC1), 有效改善了氧化 TCA 途径的碳流量, 使 α -酮戊二酸产量达到了 186 g/L^[4]。此外, 在 *C. glabrata* 中通过调节丙酮酸节点关键酶的辅因子供给实现了碳流从丙酮酸到 α -酮戊二酸的重新分配, 最终 α -酮戊二酸产量达到了 43.7 g/L^[5]。上述研究主要侧重于代谢工程改造酵母生产 α -酮戊二酸, 显著提高了 α -酮戊二酸的产量。然而, 酵母发酵生产 α -酮戊二酸也存在一些缺点。(1) 对于 *Y. lipolytica* 而言, 发酵周期(120 h 以上)相对较长, 增加了发酵过程染菌风险; 发酵碳源多为精甘油、部分为粗甘油, 总体而言发酵成本相对较高; 发酵过程需要添加碳酸钙作为中和

剂, 这也增加了下游分离纯化成本。(2) 对于 *C. glabrata* 而言, 菌株为条件致病菌, 存在生物安全风险; 发酵过程需要添加碳酸钙作为中和剂, 增加了下游分离纯化成本; 发酵过程中产生的杂酸较多(如丙酮酸), 这也不利于下游分离纯化。综上所述, 未来的研究可能侧重于以下 3 个方面:(1) 针对 *E. coli* KA29 继续进行代谢工程改造, 提高 α -酮戊二酸合成效率;(2) 继续简化发酵培养基并缩短发酵周期, 降低成本与染菌风险;(3) 继续降低发酵过程中的杂酸积累量, 缓解下游分离纯化压力。

溶氧水平在控制 *E. coli* 胞内代谢流分布中起着重要作用, 通过代谢流的重新分布可提高 α -酮戊二酸产量。细菌处于高溶氧水平下会导致胞内氧自由基含量升高, 为了消除氧自由基对自身的危害, 细菌会从以下 3 个方面对胞内代谢进行调节^[21]: 激活氧应激信号通路使细胞进入氧化应激状态、改变胞内关键酶的酶活水平以及重新调整胞内 NADPH/NADH 水平。通过上述调节, 细胞在消除氧毒害的同时实现了胞内代谢通量在整体水平上的重新分配, 从而引起 α -酮戊二酸产量的积累。在上述调节方式中, 关键酶的酶活水平调节是 α -酮戊二酸积累最为关键的因素。例如, 通过分析 *P. fluorescens* 在氧化应激条件下的生理变化时发现, 参与 NADPH 合成的酶的酶活水平均有所上升, 其中 NADP-依赖型的异柠檬酸裂解酶的酶活水平比正常情况下提高了 194.3%。然而, 胞内参与 NADH 合成的酶的酶活水平会表现出明显下调, 其中变化最大的就是 α -酮戊二酸脱氢酶, 其酶活力降低了 82.5%^[22]。因此, 处于氧化应激条件下的细菌会积累 α -酮戊二酸, 可能是由于异柠檬酸酶酶活水平升高增加了 α -酮戊二酸的合成, 而 α -酮戊二酸脱氢酶酶活水平下降弱化了 α -酮戊二酸的代谢所引起。随后, 通过进一步分析 *P. fluorescens* 处于氧化应激条件下的代谢通量变化发现, α -酮戊二酸产量比正常情况下有显著提高, 这也进一步证实了细胞处于氧化应激下会

引起 α -酮戊二酸积累^[23]。另一方面, 胞内 NADPH/NADH 水平的重新分配是细胞积累 α -酮戊二酸的另一个关键因素。 *E. coli* 在氧应激条件下胞内活性氧增加, 糖酵解途径的代谢通量被重新导向到磷酸戊糖途径以及 TCA 循环, 从而引起胞内 NADPH/NADH 增加, 最终导致 α -酮戊二酸量的积累, 其中 α -酮戊二酸的积累速率比正常情况下提高了 106.0%^[24-25]。在本研究中工程菌 *E. coli* KA29 在高溶氧水平条件下也可能会引起胞内活性氧水平升高并激发氧化应激系统, 从而提高 α -酮戊二酸产量。

作者贡献声明

朱攀: 研究构思和设计、实验操作、论文撰写与修改; 孙馨悒: 代谢途径构建; 李雨菲: ARTP 诱变与筛选; 陈佳颖: 支路代谢途径敲除; 方雨婷: 发酵培养基优化。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] SAUER M, PORRO D, MATTANOVICH D, BRANDUARDI P. Microbial production of organic acids: expanding the markets[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(2): 100-108.
- [2] CHERNYAVSKAYA OG, SHISHKANOVA NV, IL'CHENKO AP, FINOGENOVA TV. Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(2): 152-158.
- [3] OTTO C, YOVKOVA V, BARTH G. Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(4): 689-695.
- [4] YOVKOVA V, OTTO C, AURICH A, MAUERSBERGER S, BARTH G. Engineering the α -ketoglutarate overproduction from raw glycerol by overexpression of the genes encoding NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2003-2013.
- [5] LIU LM, LI Y, ZHU Y, DU GC, CHEN J. Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level[J]. Metabolic Engineering, 2007, 9(1): 21-29.
- [6] YU ZZ, DU GC, ZHOU JW, CHEN J. Enhanced α -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy[J]. Bioresource Technology, 2012, 114: 597-602.
- [7] 梁楠, 王淼, 刘立明, 堵国成, 陈坚. 提高光滑球拟酵母乙酰辅酶A水平促进 α -酮戊二酸合成[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 874-878.
- [8] LIANG N, WANG M, LIU LM, DU GC, CHEN J. Enhancing α -ketoglutaric acid production in *Torulopsis glabrata*: increase of acetyl-CoA availability[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(7): 874-878 (in Chinese).
- [9] ZHANG DD, LIANG N, SHI ZP, LIU LM, CHEN J, DU GC. Enhancement of α -ketoglutarate production in *Torulopsis glabrata*: redistribution of carbon flux from pyruvate to α -ketoglutarate[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009, 14(2): 134-139.
- [10] 张旦旦, 刘立明, 堵国成, 陈坚. 光滑球拟酵母中 α -酮戊二酸脱氢酶系生理作用解析[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1584-1589.
- [11] ZHANG DD, LIU LM, DU GC, CHEN J. Physiological function of α -ketoglutarate dehydrogenase complex in *Torulopsis glabrata*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(12): 1584-1589 (in Chinese).
- [12] YIN XX, MADZAK C, DU GC, ZHOU JW, CHEN J. Enhanced α -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(6): 1527-1537.
- [13] 杨晓玲, 殷树梅. 谷氨酸衍生物合成研究进展[J]. 化工技术与开发, 2008, 37(9): 18-20.
- [14] YANG XL, YIN SM. Research progress in synthesis of glutamic acid ramifications[J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2008, 37(9): 18-20 (in Chinese).
- [15] CHEN XL, DONG XX, LIU J, LUO QL, LIU LM. Pathway engineering of *Escherichia coli* for α -ketoglutaric acid production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(9): 2791-2801.
- [16] JIANG Y, CHEN B, DUAN CL, SUN BB, YANG JJ, YANG S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [17] GAO C, WANG SH, HU GP, GUO L, CHEN XL, XU P, LIU LM. Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(3): 661-672.
- [18] LI N, ZHANG B, WANG ZW, TANG YJ, CHEN T, ZHAO XM. Engineering *Escherichia coli* for fumaric acid production from glycerol[J]. Bioresource Technology, 2014, 174: 81-87.
- [19] NIU DD, TIAN KM, PRIOR BA, WANG M, WANG ZX, LU FP, SINGH S. Highly efficient L-lactate production using engineered *Escherichia coli* with dissimilar temperature optima for L-lactate formation and cell growth[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 78.
- [20] GUO L, ZHANG F, ZHANG C, HU GP, GAO C, CHEN XL, LIU LM. Enhancement of malate production through

- engineering of the periplasmic rTCA pathway in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(6): 1571-1580.
- [18] ZHANG X, WANG X, SHANMUGAM KT, INGRAM LO. L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(2): 427-434.
- [19] DONG XX, CHEN XL, QIAN YY, WANG YC, WANG L, QIAO WH, LIU LM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 to produce L-malate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(3): 656-664.
- [20] LUO ZW, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of benzoic acid from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 298-311.
- [21] JO SH, SON MK, KOH HJ, LEE SM, SONG IH, KIM YO, LEE YS, JEONG KS, KIM WB, PARK JW, SONG BJ, HUH TL. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(19): 16168-16176.
- [22] SINGH R, MAILLOUX RJ, PUISEUX-DAO S, APPANNA VD. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6665-6675.
- [23] MAILLOUX RJ, SINGH R, BREWER G, AUGER C, LEMIRE J, APPANNA VD. α -ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase work in tandem to modulate the antioxidant α -ketoglutarate during oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(12): 3804-3810.
- [24] REINOSO CA, AUGER C, APPANNA VD, VÁSQUEZ CC. Tellurite-exposed *Escherichia coli* exhibits increased intracellular α -ketoglutarate[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 421(4): 721-726.
- [25] RUI B, SHEN T, ZHOU H, LIU JP, CHEN JS, PAN XS, LIU HY, WU JH, ZHENG HR, SHI YY. A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress[J]. *BMC Systems Biology*, 2010, 4: 122.