

大肠杆菌生产琥珀酸的代谢工程研究进展

詹晓北, 陈设, 郑志永

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 琥珀酸是一种重要的化工原料, 具有广阔的市场. 微生物发酵法生产琥珀酸可以解决常规化学合成法对石油的依赖. 代谢工程的兴起使重组大肠杆菌生产琥珀酸变为可能, 也取得了一定的成效, 但是其发酵强度还不够高, 且过程中伴随着其他有机酸的积累, 因此还不适于工业化生产. 代谢工程以系统生物学为基础, 为重组大肠杆菌的进一步改造提供了更合理的依据. 本工作以大肠杆菌生产琥珀酸所涉及的关键酶、代谢途径及其改造为对象, 系统综述了大肠杆菌生产琥珀酸所涉及的代谢工程技术及其最新研究进展, 并探讨了将来的发展前景.

关键词: 代谢工程; 琥珀酸; 大肠杆菌

中图分类号: TQ921

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2007)04-0840-07

1 前言

琥珀酸又称丁二酸, 是三羧酸循环(TCA)的中间产物, 同时也是厌氧代谢的发酵产物之一^[1]. 琥珀酸广泛应用于医药、农药、染料、香料、油漆、食品、塑料等行业, 也可以作为 C₄ 平台化合物, 合成一些重要的化工产品如丁二醇、四氢呋喃、 γ -丁内酯、*n*-甲基吡咯烷酮(NMD)、2-吡咯烷酮等, 全世界市场需求量超过 2.76×10⁵ t/a^[2]. 另外, 琥珀酸还可用来合成可降解的生物聚合物, 如聚丁烯琥珀酸酯(PBS)和聚酰胺, 这使琥珀酸的市场需求量高达 2.7×10⁷ t/a^[3]. 然而, 传统的化学合成法因成本和环境污染等原因限制了琥珀酸的广泛应用, 因此微生物发酵法生产琥珀酸的研究越来越引起人们的兴趣. 在众多的琥珀酸生产菌中, 目前研究最多的是 *Actinobacillus succinogenes*^[4], *Mannheimia succiniciproducens*^[5], *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[6] 和 *Escherichia coli*^[7].

重组 DNA 技术的不断进步促进了代谢工程的发展, 以代谢工程的思想改造菌种是一种有效提高目的产物的手段^[8,9]. 虽然 *E. coli* 的琥珀酸产量不高, 通常为 100 mol 葡萄糖产 12 mol 琥珀酸, 但 *E. coli* 作为典型革兰氏阴性细菌, 其基因组和蛋白质组的信息比较全, 代谢途径也比较清楚, 用基因重组及其他分子生物学手段来提高 *E. coli* 的琥珀酸产量是可行的^[10]. 本工作对 *E. coli* 产琥珀酸的代谢工程研究进行了分析, 并探讨了将来的发展前景.

2 琥珀酸的代谢途径和关键酶

野生 *E. coli* 在有氧条件下主要的发酵产物是乙酸,

不会有琥珀酸的积累, 而 *E. coli* 在厌氧环境下进行混合酸发酵, 产生少量的琥珀酸, 仅占 7.8%^[11]. 图 1 为野生 *E. coli* 在厌氧环境下合成琥珀酸的代谢网络图. 由图可以看出, 葡萄糖经糖酵解生成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP), PEP 在 PEP 羧化酶的催化作用下固定 CO₂, 生成草酰乙酸(OAA). OAA 经过苹果酸脱氢酶和富马酸还原酶的作用, 最终生成琥珀酸. 在此合成途径中, 每生成 1 mol 琥珀酸需要固定 1 mol 的 CO₂, 同时消耗 2 mol 的 NADH^[12,13].

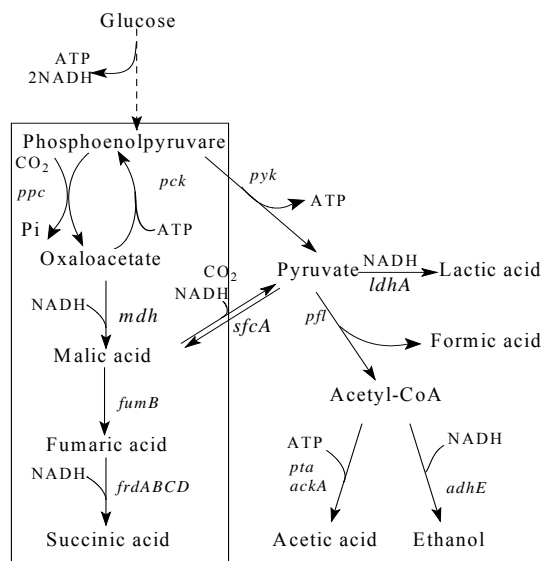


图 1 野生 *E. coli* 合成琥珀酸的代谢网络图

Fig.1 Metabolic pathway for succinate fermentation in wild-type *E. coli*

2.1 PEP 羧化酶和 PEP 羧化激酶

PEP 在 *E. coli* 的代谢中占据重要位置, 它是糖酵解途径的最后一步反应的中间物, 又是琥珀酸生物合成途

收稿日期: 2006-10-30, 修回日期: 2006-12-29

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 无锡市“学术技术带头人培养工程”基金资助项目(编号: 200502)

作者简介: 詹晓北(1962-), 男, 北京市人, 博士, 教授, 主要从事生物反应工程的研究, Tel: 0510-85918299, E-mail: xbzhan@sytu.edu.cn.

径中第一步羧基化反应的底物,其高能烯醇式磷酸酯键象征着酵解途径净能量的获得^[14]。在葡萄糖吸收过程中,PEP也是一个重要的公共底物,很多化合物进行糖异生作用都需要经过它,芳香族氨基酸生物合成途径的第一步反应底物也是它,因此其代谢流分布在细胞内受到高度调控^[15]。大肠杆菌拥有2个酶控制PEP羧化形成OAA,在好氧环境中,PEP羧化酶(EC 4.1.1.31)补充OAA在生物合成中的消耗;而在发酵过程中,该酶也具有分解代谢的功能,引入一部分PEP流向琥珀酸。第2个酶为PEP羧化激酶(EC 4.1.1.49),其生理功能是在糖原再生过程中催化三磷酸核苷酸依赖型OAA脱羧和磷酸化反应生成PEP^[16]。这两种酶的诱导特征反映了它们独特的功效:PEP羧化酶于细胞生长在糖酵解的底物中时表达,而PEP羧化激酶则当细菌生长在琥珀酸或其他4碳化合物时出现^[17]。

E. coli 为PEP羧化酶和PEP羧化激酶的编码基因 *ppc* 和 *pck* 已被克隆。在一项研究中^[18],将这2个基因分别克隆在表达型质粒 pJF118EH 中,并置于 *tac* 启动子的控制下。重组质粒转化至大肠杆菌 JCL1208 株,它不含 *lac* 操纵子,但在染色体上整合了 *lacI^r* 基因,因此在葡萄糖存在下可用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导重组基因表达。发酵时以 37 g/L 的葡萄糖为碳源,经 100 μmol/L 的 IPTG 诱导,PEP羧化酶和羧化激酶的表达水平比受体菌提高 50~100 倍。产物分析结果表明,PEP羧化酶的过量表达导致琥珀酸大量积累,由受体对照株的 3.0 g/L 提高到 10.7 g/L,但 PEP羧化激酶却没有明显的作用。与此同时,发酵液中其他副产物如乳酸、丙酮酸、甲酸、乙酸和乙醇等均比对照菌略有减少。这一结果证明,PEP羧化酶作为糖代谢途径的重要调控节点,在 *E. coli* 中过量表达能够改变发酵产物的分配比例。

2.2 富马酸还原酶

在厌氧环境下,以富马酸为最终电子受体,富马酸还原酶(EC 1.3.1.6)催化富马酸生成琥珀酸,是 *E. coli* 合成琥珀酸途径中的另一个关键酶。富马酸还原酶的氨基酸序列类似于 TCA 循环中的琥珀酸脱氢酶^[19],都可以完成从富马酸到琥珀酸的可逆反应,但反应中两种酶对底物的亲和力及催化反应的速率都不同。Goldberg 等^[20]和 Wang 等^[21]都曾研究过在 *E. coli* 中过量表达富马酸还原酶直接转化富马酸生成琥珀酸,发现包含质粒 pHCl002 的大肠杆菌 DH5α,在培养基中不添加葡萄糖或初始葡萄糖浓度很低的情况下,发酵液中有苹果酸的积累,而此重组菌在葡萄糖初始浓度为 23.7 g/L 的条件下培养 32 h 后,转化 50.8 g/L 的富马酸生成 47.5 g/L 的琥珀酸,质量转化率为 0.93。在研究不同富马酸初始浓

度对转化的影响时发现,当富马酸浓度为 90 g/L 时,产生了底物抑制,转化液中苹果酸的浓度明显增大。Wang 等^[21]的研究表明,葡萄糖在转化中的作用是为反应提供还原力和产生辅助因子 FADH₂。

另外, *E. coli* 中其他代谢支路的某些酶也会对琥珀酸的合成产生影响,其中一个典型的例子为苹果酸酶(EC 1.1.1.38)。苹果酸酶由 *scfA* 基因编码在 *E. coli* 中催化丙酮酸和苹果酸之间的可逆反应。然而,苹果酸酶催化不同底物的米氏常数 K_m 值差别较大,若分别以丙酮酸和苹果酸为底物,苹果酸酶的 K_m 值分别为 16 和 0.4 mmol/L,因此 *E. coli* 中苹果酸酶催化的反应更有利于丙酮酸的生成。通过在 *E. coli* NZN111 中过量表达编码苹果酸酶的基因 *scfA*,结果发现发酵液中不再积累丙酮酸,而琥珀酸的含量也有所提高^[22,23]。

3 *E. coli* 产琥珀酸的代谢工程

3.1 基因组比较的代谢工程

据报道^[24], *M. succiniciproducens* 能够高效地发酵生产琥珀酸,而在厌氧环境下, *E. coli* 进行的是混合有机酸的发酵,产生琥珀酸的同时会积累较多的副产物。如果通过比较 *E. coli* 和 *M. succiniciproducens* 的中心代谢途径(图 2),有目的地找出引起这两种细菌代谢途径不同的基因,再将 *E. coli* 中某些基因进行适当改造,则有可能提高 *E. coli* 发酵产琥珀酸的效率。基于此思路, Lee 等^[25]通过比较分析,首先选择了仅存在于 *E. coli* 中的 *pstG*, *pykF*, *mgo*, *sdhABCD* 和 *aceBA* 五个基因,接着将它们依次破坏,检验各自对发酵的影响。因为 *E. coli* 中存在许多代谢回路和异构酶,它们会阻碍某些扰乱对代谢流的影响,所以结果发现,基于上述 5 个基因的操作并没有对 *E. coli* 发酵有明显的影响。因此在基因组范围内,对上述两种细菌进行一些简单合理的比较代谢工程研究也很难获得成功,因为研究人员不可能通过实验来检验所有可能的组合敲除突变菌株。既然不能构建出所有的组合突变菌株, Lee 等^[25]就利用基因组水平上的 *E. coli* 代谢模型,通过计算机进行模拟实验。计算机模拟实验的结果表明,敲除 *E. coli* 中的 *pstG*, *pykF* 和 *pykA* 基因,对于提高琥珀酸的产量最有效。这一结果同样在实验中得到了验证: *E. coli* W3110GFA 生产出更多琥珀酸的同时,其他副产物的产量也明显减少。经过分析发现, *E. coli* 中的 *pstG*, *pykF* 和 *pykA* 三种基因都直接与丙酮酸的生成有关,而丙酮酸可在一些代谢支路(如 *ldhA*, *pfl* 和 *pta*)中形成副产物。相反, *M. succiniciproducens* 和 *A. succinogenes* 这些高产琥珀酸的菌株中丙酮酸代谢支路的通量都很低,琥珀酸主要经过 PEP 转变为 OAA、

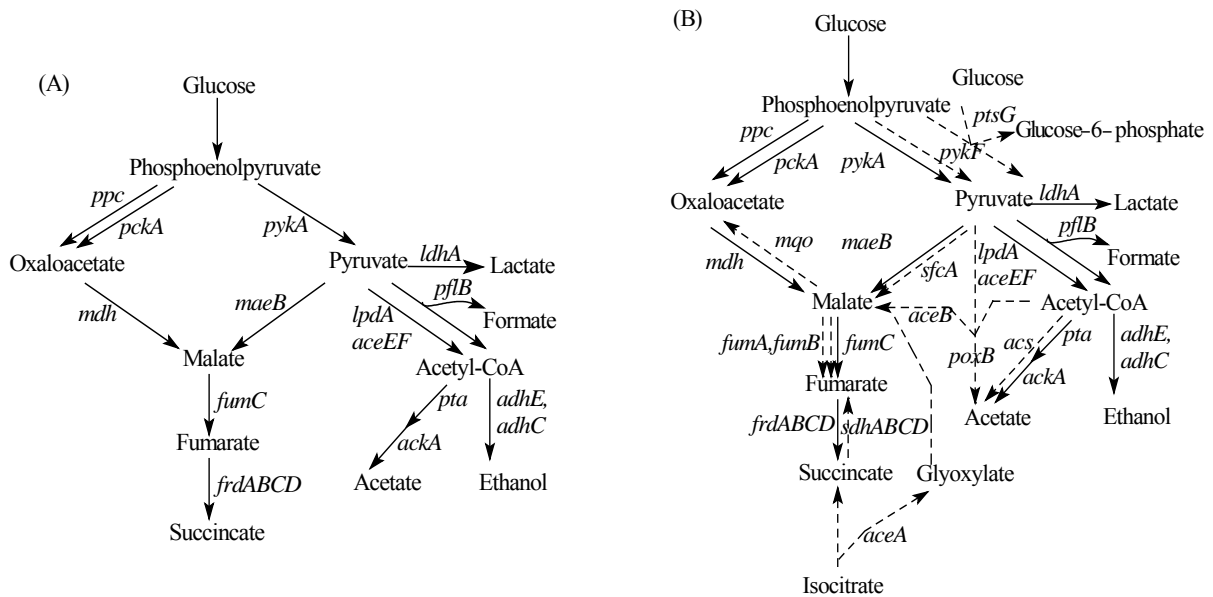


图2 *M. succiniciproducens* (A)和 *E. coli* (B)中琥珀酸合成途径的比较^[25]

Fig.2 Comparison of the central metabolic pathways related to succinic acid formation in *M. succiniciproducens* (A) and *E. coli* (B)^[25]

苹果酸和富马酸这一代谢支路生成。因此, *E. coli* 中丙酮酸的代谢流对于琥珀酸的生成是不利的。

功能基因组学和系统生物学的发展从整体上提供了深刻认识微生物代谢特性的工具, 给代谢工程的发展创造了前所未有的机遇^[26]。将基于基因组比较的代谢工程应用到 *E. coli* 生产琥珀酸的研究中, 再次证明了微生物基因组科学和相关技术的发展极大地提高了代谢工程的研究效率。

3.2 外源 PEP 羧化酶基因的导入

PEP 羧化酶在 *E. coli* 中往往作为一种糖异生的酶, 可催化 OAA 生成 PEP。Millard 等^[18]将含有 PEP 羧化酶基因(*pck*)的质粒 pCK601 克隆到载体 pJF118EH 中, 在缺少 *lac* 操纵子的宿主菌 JCL1208 中表达, 发现过量表达 PEP 羧化酶并没有使琥珀酸的产量提高。与 *E. coli* 不同的是, 产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)中的 PEP 羧化酶(PEPCK)可以催化 PEP, ADP 和 CO₂ 生成 OAA 和 ATP。这一反应是 *A. succinogenes* 固定 CO₂ 最终生成琥珀酸的主要反应^[27]。Kim 等^[28]在对 PEPCK 进行研究后, 利用基因重组技术, 将其分别在野生的大肠杆菌 K-12 和敲除 *ppc* 基因的突变菌株大肠杆菌 K-12 *ppc* 中过量表达, 结果表明过量表达 PEPCK 对大肠杆菌 K-12 产生琥珀酸没有作用, 而大肠杆菌 K-12 *ppc* 最终的琥珀酸产量提高了 6.5 倍。这一结果比过量表达 PEP 羧化酶的结果(3.5 倍)更高, 似乎表明了 PEPCK 比 PEP 羧化酶更适于琥珀酸的生产。这是因为 PECK 能再生 ATP, 节省了来自糖酵解途径的能量, 而 PEP 羧化酶途径则是一个耗能的过程。在大肠杆

菌中, PEP 羧化酶对底物(HCO₃⁻)的亲合性(K_m 值为 0.15 mmol/L)比 PEP 羧化激酶(K_m 值为 13 mmol/L)高 85 倍, 所以当培养液中 HCO₃⁻ 的浓度低时, 细胞中的羧化反应由 PEP 羧化酶完成, 相反 HCO₃⁻ 浓度高时, 羧化反应则由 PEP 羧化激酶来完成。Kwon 等^[29]的研究中发现, 培养液中添加 20 g/L 的 NaHCO₃ 时, 过量表达 *E. coli* 中的 PEP 羧化酶, 琥珀酸的产量提高了 2.2 倍。但当 NaHCO₃ 的浓度为 50 g/L 时, 琥珀酸的产量却降低了, 其抑制琥珀酸生成的机理还有待进一步研究。

3.3 琥珀酸代谢途径的改造

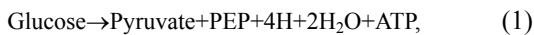
在厌氧环境下, *E. coli* 将葡萄糖通过 EMP 途径转化为 PEP 和丙酮酸, 两者在各种酶的作用下生成甲酸、乳酸、乙酸、乙醇和琥珀酸。因此有必要通过基因操作手段来改造琥珀酸的合成途径, 降低其他副产物的形成。例如, 在琥珀酸形成支路的第一步中, 过量表达 PEP 羧化酶可以使发酵后琥珀酸对葡萄糖的得率从 0.12 mol/mol 提高到 0.34 mol/mol^[20]。另外, 在野生 *E. coli* 中导入 pTrc99A-*pyc* 质粒, 在其中表达 *Rhizobium etli* 丙酮酸羧化酶, 使琥珀酸对葡萄糖的得率达到 0.17 mol/mol, 生产强度为 0.17 g/(L·h)^[30]。

仅仅通过增强琥珀酸代谢途径的通量并不能阻止其他副产物在整个代谢途径中的积累。因此, 通过切断乳酸、甲酸等的合成途径会有助于琥珀酸产量的提高。敲除乳酸脱氢酶的编码基因 *ldh* 后, *E. coli* 的生长情况没有发生改变, 而同时敲除 *ldh* 基因和编码丙酮酸-甲酸裂解酶的基因 *pfl* 后, *E. coli* NZN111 在厌氧环境下生长却很慢, 且当代谢终止时, 积累 0.25 g/L 的丙酮酸^[31]。

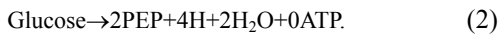
但在 *E. coli* NZN111 中导入编码苹果酸脱氢酶的基因 *mdh* 后, 其在厌氧环境下生长良好^[31]. 同样, 在 *E. coli* NZN111 中导入编码 *Ascaris suum* 中苹果酸酶的基因后, 琥珀酸对葡萄糖的得率达到 0.39 mol/mol, 生产强度为 0.29 g/(L·h)^[24,32].

E. coli AFP111 是 NZN111 经过自发染色体突变的变异菌株, 与 NZN111 不同的是, AFP111 能够在厌氧环境下生长. 据报道^[33], AFP111 在 5% H₂ 和 95% CO₂ 的环境下发酵后, 琥珀酸对葡萄糖的得率为 0.70 mol/mol, 合成的琥珀酸与乙酸的质量比为 1.97. 另外, AFP111 经过两阶段发酵, 即先在好氧环境下生长, 然后在 CO₂ 环境下合成产物, 结果发现琥珀酸对葡萄糖的得率和生产强度分别达到了 0.99 mol/mol 和 0.87 g/(L·h)^[34]. 将 *pyc* 基因导入 APF111 中 (AFP111/pTrc99A-*pyc*), 可以增强其在丙酮酸节点处的代谢弹性. Vemuri 等^[35]研究了两阶段发酵的转换时间(Transition time)对 AFP111/pTrc99A-*pyc* 发酵产琥珀酸的影响, 根据细胞在不同时间的生理特征, 选择了 6 个不同的转换时间, 最终发现好氧阶段的细胞浓度对下一阶段产物合成的影响较大. 当 *E. coli* 细胞浓度达到最大时, 最终发酵琥珀酸的浓度为 99.2 g/L, 对葡萄糖的得率为 1.10 mol/mol, 生产强度为 1.3 g/(L·h).

大肠杆菌中存在两种葡萄糖消耗方式^[15], 第一种方式称为磷酸转移酶系统(PTS), 在此过程中, 葡萄糖以 PEP 为辅助底物, 经过转移和磷酸化, 转变成胞内的 6-磷酸葡萄糖, 最终生成 PEP 和丙酮酸. 整个反应过程可表示为



每生成 1 mol 的 PEP, 既可以在 PEP 羧化酶的作用下生成 OAA, 也可以在丙酮酸激酶的作用下生成 1 mol 丙酮酸和 ATP. 第二种葡萄糖消耗方式中, 葡萄糖以 ATP 为辅助底物, 在葡萄糖激酶的作用下, 最终形成 PEP. 此反应过程可表示为



由上述两个方程式可知, 葡萄糖以第二种方式消耗时可以产生更多的 PEP, 继而提供了相对较多的琥珀酸合成前体. 将 *E. coli* 中磷酸转移酶系统抑制后, 琥珀酸的产量和 *E. coli* 的生长都有所提高^[36]. 另外, 在 *E. coli* 中表达丙酮酸羧化酶后, 葡萄糖消耗方式对琥珀酸发酵没有产生影响^[37]. 这是因为两种葡萄糖消耗方式生成的 PEP 和丙酮酸可分别在 PEP 羧化酶和丙酮酸激酶的作用下生成 OAA, 进而逐步合成为琥珀酸.

目前, *E. coli* 琥珀酸发酵主要采用厌氧发酵方式,

但由于厌氧发酵过程中生物量较低, 碳源消耗慢, 所以琥珀酸的生产强度不够高. 另一个影响 *E. coli* 厌氧发酵生产琥珀酸的因素是 NADH 的供应量不足. 这是因为 1 mol 的葡萄糖经过酵解后只生成 2 mol 的 NADH, 而在常规的合成途径中, 每生成 1 mol 琥珀酸需要消耗 2 mol 的 NADH. 解决这一问题的方法是在 *E. coli* 中构建一个乙醛酸循环支路, 因为乙醛酸循环过程中 NADH 的需要量较少, 可以为琥珀酸的合成提供更多的 NADH^[38]. 最近, Lin 等^[39]利用代谢工程方法构建了一株好氧发酵琥珀酸的 *E. coli* 基因工程菌(图 3), 此基因工程菌是通过敲除编码琥珀酸脱氢酶的基因(*sdh*)、编码丙酮酸氧化酶的基因(*poxB*)、编码 *pta-ack* 和 *aceBAK* 操纵子阻遏物的基因(*iclR*)及编码磷酸转移酶系统的基因(*ptsG*), 构建出了包含乙醛酸循环和 TCA 循环氧化支路的琥珀酸合成途径. 通过好氧分批发酵实验发现, 此菌株在 59 h 后琥珀酸的生成量为 58.3 g/L, 琥珀酸对葡萄糖的得率系数为 0.85 mol/mol, 但发酵液中还积累了 6.1 g/L 的丙酮酸和 3.0 g/L 的乙酸^[39,40]. 因此, 利用重组 *E. coli* 在完全好氧的环境下生产琥珀酸尚需对整个途径进行优化. 需要强调的是, 由于细胞的性质不仅与其基因组密切相关, 而且与细胞所处的微观及宏观环境条件(底物种类与浓度、pH、温度、溶氧、生物反应器的混合与传递特性等)密切相关, 因此在对 *E. coli* 改进时, 要密切结合这些实际的环境条件对所得的菌株用“组学”技术进行表型表征, 从而使所开发的代谢工程菌株满足包括环

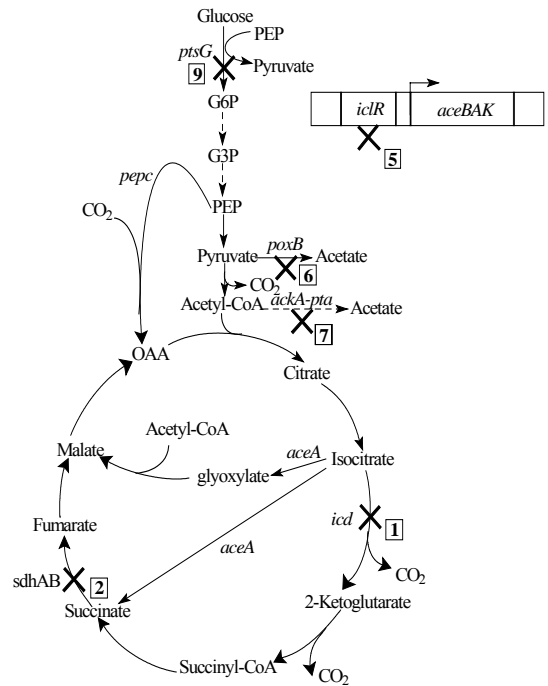


图 3 *E. coli* 好氧合成琥珀酸的代谢工程改造^[39]
Fig.3 Metabolic engineering of *E. coli* in the development of anaerobic succinate production system^[39]

境条件影响在内的整个生物加工过程优化的需要^[41,42]。

4 总结与展望

代谢工程的基本研究思路^[26]如图4所示,其中设计策略是基础,遗传修饰是关键,代谢分析则决定是否需要新一轮的代谢工程循环。虽然代谢工程在构建*E. coli*工程菌生产琥珀酸方面取得了一定的成效,但这些代谢工程设计策略主要针对单基因进行遗传修饰,往往不能显著改变整个代谢途径的通量。这表明由于代谢网络的复杂性,在代谢工程中简单地应用重组DNA技术难以取得酶工程那样的快速突破。

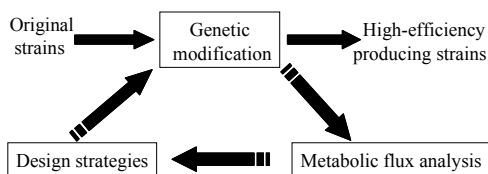


图4 代谢工程循环^[26]

Fig.4 Circle of metabolic engineering^[26]

目前,利用重组*E. coli*生产琥珀酸的一个突出问题是*E. coli*的生产强度相对于*A. succiniciproducens*和某些瘤胃细菌(如*M. succiniciproducens*)还较低^[43],另一个问题是发酵液中还存在一些影响下游提取的副产物。解决此问题可以从以下几点着手:(1)将厌氧过程改变为好氧过程,增加碳源的转化率,提高菌体的生长速率和过程的生产强度;(2)修饰甚至取代宿主细胞的原料运输机制;(3)根据产物形成和细胞生长,优化碳源氧化还原当量和能量当量的平衡;(4)详细分析和比较其他琥珀酸生产菌的全基因组序列,更好地认识它们在琥珀酸生产能力方面的差异;(5)利用生物信息学和数据库重新构建有潜力的代谢途径,建立更有效的动力学模型;(6)增强限速酶的活性及相关辅酶的再生能力。

随着研究的不断深入,今后利用重组*E. coli*生产琥珀酸的代谢工程设计除了重构代谢网络外,还应在认识*E. coli*代谢调控机理的基础上,重构基因表达调控网络。换言之,不仅要定向改变代谢流的方向并使通量最大化,还要定向改变和优化*E. coli*的功能。另外,如何在整体规模上获得对*E. coli*的新的理解,也成为下一步代谢工程待解决的关键问题。如果说功能基因组学是研究如何确定基因组中开放阅读框(ORFs)的功能,系统生物学则是通过对系统(如细胞)所有单元(如基因转录、翻译、蛋白与蛋白、代谢途径、酶与胞内代谢物)之间关系的定量研究来描述细胞的整体功能。显然,系统生物学的发展将促进人们对微生物生理、代谢和功能的理

解,进而推动微生物功能的工业应用^[44]。*E. coli*作为一种重要的工业微生物,其基因组序列已完全公布,这为代谢工程的研究提供了可能。另外,*E. coli*有较好的遗传背景,且有相应的表达或整合载体,这些都给代谢工程的设计带来了方便。但是,*E. coli*代谢途径的控制机理和决定代谢通量的关键因素目前仍不是很清楚。为此需要开发在生理状态下定量分析酶和调控元件活性以及代谢物浓度变化的设备和技术,以及将基因组、转录组、蛋白质组、代谢组和流量组数据关联起来的计算方法^[45]。

总之,现在的微生物代谢工程已进入一个借助于系统生物学、基因组学和功能基因组学知识库、系统开展微生物代谢途径和基因表达调控网络研究的新阶段。有理由相信,随着研究的深入,人类将通过微生物代谢工程技术,创造出合理、经济的琥珀酸细胞工厂。

参考文献:

- [1] Zeikus J G, Jain M K, Elankovan P. Biotechnology of Succinic Acid Production and Market for Derived Industrial Products [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 51: 545-525.
- [2] 詹晓北, 朱一晖. 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场 [J]. 食品科技, 2003, (2): 44-49.
- [3] Willke T, Vorlop K. Industrial Bioconversion of Renewable Resources as an Alternative to Conventional Chemistry [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 66: 131-142.
- [4] McKinlay J B, Zeikus J G, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* Fermentative Metabolism in a Chemically Defined Growth Medium [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(11): 6651-6656.
- [5] Lee J W, Lee S Y, Song H, et al. The Proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a Capnophilic Rumen Bacterium [J]. Proteomics, 2006, 6(12): 3550-3566.
- [6] Cotelesage J J, Prasad L, Zeikus J G, et al. Crystal Structure of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* PEP Carboxykinase Reveals an Important Active Site Loop [J]. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 2005, 37(9): 1829-1837.
- [7] Isar J, Agarwal L, Saran S, et al. Effect of Process Parameters on Succinic Acid Production in *Escherichia coli* W3110 and Enzymes Involved in the Reductive Tricarboxylic Acid Cycle [J]. Can. J. Microbiol., 2006, 52(9): 893-902.
- [8] Vemuri G N, Aristidou A A. Metabolic Engineering in the Proteomics Era: Elucidating and Modulating Regulatory Networks [J]. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2005, 69(2): 197-216.
- [9] Bianco C, Imperlini E, Calogero R, et al. Indole-3-acetic Acid Regulates the Central Metabolic Pathways in *Escherichia coli* [J]. Microbiology, 2006, 152(Part 8): 2421-2431.
- [10] 朱红裕, 李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略 [J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 150-155.
- [11] Wendisch V F, Bott M, Eikmanns B J. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium Glutamicum* for Biotechnological Production of Organic Acids and Amino Acids [J]. Curr. Opin. Microbiol., 2006, 9: 268-274.
- [12] Lin H, Bennett G N, San K-Y. Effect of Carbon Sources Differing in

- Oxidation State and Transport Route on Succinate Production in Metabolically Engineered *Escherichia coli* [J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 32(3): 87–93.
- [13] Christophe C, Naruemel N R, Joachim W S, et al. Dynamic Modeling of the Central Carbon Metabolism of *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, 79(1): 53–73.
- [14] 张惠展. 途径工程—第三代基因工程 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 53–73.
- [15] 沈同, 王镜岩. 生物化学, 第2版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 112–113.
- [16] Chao Y P, Patnaik R, Roof W D, et al. Control of Gluconeogenesis by *pps* and *pck* in *Escherichia coli* [J]. *J. Bacteriol.*, 1993, 175(21): 6939–6944.
- [17] Goldie A H, Sanwal B D. Allosteric Control by Calcium and Mechanism of Desensitization of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase of *Escherichia coli* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255: 1399–1405.
- [18] 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]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 1808–1810.
- [19] Blattner F R, Bloch C A, Perna N T, et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Science*, 1997, 277: 1453–1474.
- [20] Goldberg I, Lonberg H K, Bagley E A, et al. Improved Conversion of Fumarate to Succinate by *Escherichia coli* Strains Amplified for Fumarate Reductase [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, 45: 1838–1847.
- [21] Wang X, Gong C S, Tsao G T. Bioconversion of Fumaric Acid to Succinic Acid by Recombinant *Escherichia coli* [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1998, 70/72: 919–928.
- [22] Stols L, Donnelly M I. Production of Succinic Acid through Overexpression of NAD⁺-dependent Malic Enzyme in an *Escherichia coli* Mutant [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 2695–2701.
- [23] Hong S H, Lee S Y. Metabolic Flux Analysis for Succinic Acid Production by Recombinant *Escherichia coli* with Amplified Malic Enzyme Activity [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74(2): 89–95.
- [24] Hong S H, Kim J S, Lee S Y, et al. The Genome Sequence of the Capnophilic Rumen Bacterium *Mannheimia succiniciproducens* [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22: 1275–1281.
- [25] Lee S J, Lee D Y, Kim T Y, et al. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Enhanced Production of Succinic Acid, Based on Genome Comparison and in Silico Gene Knockout Simulation [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(12): 7880–7887.
- [26] 李寅, 曹竹安. 微生物代谢工程: 绘制细胞工厂的蓝图 [J]. *化工学报*, 2004, 55(10): 1573–1580.
- [27] Van der Werf M J, Guettler M V, Jain M K, et al. Environmental and Physiological Factors Affecting the Succinate Product Ratio during Carbohydrate Fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z [J]. *Arch. Microbiol.*, 1997, 168: 332–42.
- [28] Kim P, Laivenieks M, Vieille C, et al. Effect of Overexpression of *Actinobacillus succinogenes* Phosphoenolpyruvate Carboxykinase on Succinate Production in *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70(2): 1238–1241.
- [29] Kwon Y D, Lee S Y, Kim P. Influence of Gluconeogenic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK) Expression on Succinic Acid Fermentation in *Escherichia coli* under High Bicarbonate Condition [J]. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 16(9): 1448–1452.
- [30] Gokarn R R, Altman E, Eiteman M A. Metabolic Analysis of *Escherichia coli* Glucose Fermentation in Presence of Pyruvate Carboxylase [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1998, 20: 795–798.
- [31] Boenke W E, Millard C S, Stevens P W, et al. Stringency of Substrate Specificity of *Escherichia coli* Malate Dehydrogenase [J]. *Arch. Biochem.*, 1995, 322: 43–52.
- [32] Stols L, Kulkarni G, Harris B G, et al. Expression of *Ascaris suum* Malic Enzyme in a Mutant *Escherichia coli* Allows Production of Succinic Acid from Glucose [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997, 63/65: 153–158.
- [33] Donnelly M I, Millard C S, Clark D P, et al. A Novel Fermentation Pathway in an *Escherichia coli* Mutant Producing Succinic Acid, Acetic Acid, and Ethanol [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1998, 70/72: 187–198.
- [34] Vemuri G N, Eiteman M A, Altman E. Effects of Growth Mode and Pyruvate Carboxylase on Succinic Acid Production by Metabolically Engineered Strains of *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(4): 1715–1727.
- [35] Vemuri G N, Eiteman M A, Altman E. Succinate Production in Dual-phase *Escherichia coli* Fermentations Depends on the Time of Transition from Aerobic to Anaerobic Conditions [J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 28: 325–332.
- [36] Chatterjee R, Millard C S, Champion K, et al. Mutation of *ptsG* Gene Results in Increased Production of Succinate in Fermentation of Glucose by *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(1): 148–154.
- [37] Gokarn R R, Evans J D, Walker J R, et al. The Physiological Effects and Metabolic Alteration Caused by Expression of *Rhizobium etli* Pyruvate Carboxylase in *Escherichia coli* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 65: 188–195.
- [38] Sánchez A M, Bennett G N, San K-Y. Novel Pathway Engineering Design of the Anaerobic Central Metabolic pathway in *Escherichia coli* to Increase Succinate Yield and Productivity [J]. *Metab. Eng.*, 2005, 7: 229–239.
- [39] Lin H, Bennett G N, San K-Y. Metabolic Engineering of Aerobic Succinate Production Systems in *Escherichia coli* to Improve Process Productivity and Achieve the Maximum Theoretical Succinate Yield [J]. *Metab. Eng.*, 2005, 7: 116–227.
- [40] Lin H, Bennett G N, San K-Y. Fed-batch Culture of a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain Designed for High-level Succinate Production and Yield under Aerobic Conditions [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 90: 775–779.
- [41] Cox S J, Levanon S S, Sanchez A, et al. Development of a Metabolic Network Design and Optimization Framework Incorporating Implementation Constraints: A Succinate Production Case Study [J]. *Metab. Eng.*, 2006, 8: 46–57.
- [42] 陈洵, 周世奇, 陈涛, 等. 功能基因组学与代谢工程: 微生物菌种改进与生物过程优化 [J]. *化工学报*, 2006, 57(8): 1792–1801.
- [43] Song H, Lee S Y. Production of Succinic Acid by Bacterial Fermentation [J]. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2006, 39: 352–361.
- [44] Lee S Y, Lee D-Y, Kim T Y. Systems Biotechnology for Strain Improvement [J]. *Trends Biotechnol.*, 2005, 23: 349–358.
- [45] Gianchandani E P, Brautigan D L, Papin J A. Systems Analyses Characterize Integrated Functions of Biochemical Networks [J]. *Trends Biochem. Sci.*, 2006, 31(5): 284–291.

Recent Development in Metabolic Engineering for Production of Succinic Acid by *Escherichia coli*

ZHAN Xiao-bei, CHEN She, ZHENG Zhi-yong

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: Succinic acid is an important chemical material with a big market. Its production by the method of microorganism fermentation can release the dependence of petroleum by the chemical synthesis method. Metabolic engineering made the production of succinic acid with recombinant *Escherichia coli* become possible, and much was done in the fermentation procession by metabolic engineering. However, the productivity of succinic acid fermentation by *E. coli* was still not high enough, and other organic acids were also found in the end products. So it seemed not very economical to the industrialization. In the post-genomic era, metabolic engineering is based on systems biology. More rational modification on *E. coli* will be achieved. In this paper, advances in metabolic engineering for improving succinic acid production by *E. coli* were reviewed, including the regulation of key enzymes and reconstruction of biosynthesis pathway of succinic acid. In addition, the prospect of succinic acid production was also discussed.

Key words: metabolic engineering; succinic acid; *Escherichia coli*