

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

纖維原料水解液之生物精煉特用菌株篩選精進研究及程序開發

**Advanced study to screen a microbe for the cellulose
hydrolysate-based biorefinery and development of the screened
microbe-based production process**

計畫編號：1032001INER032

受委託機關(構)：逢甲大學化工系

計畫主持人：趙雲鵬

聯絡電話：04-24517250 ext. 3677

E-mail address：ypchao@fcu.edu.tw

核研所聯絡人員：林鼎翔

報告日期：103 年 11 月 23 日

目 錄

目 錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、計劃緣起與目的.....	3
貳、研究方法與過程.....	8
一、染色體操作工具箱之操作.....	8
二、剷除競爭性的基因.....	8
三、強化關鍵基因的表現.....	9
四、琥珀酸醱酵.....	9
參、主要發現與結論.....	11
一、建構 TCA 還原循環路徑.....	11
二、導引三羧酸循環路徑的碳流方向.....	10
三、醱酵條件對於琥珀酸生產的影響.....	14
四、桌上型醱酵槽進行琥珀酸生產.....	16
肆、參考文獻.....	20

中文摘要

本研究的目的是在於發展大腸桿菌之琥珀酸醱酵的技術平台。這個技術平台主要建立在生產菌株的構築和醱酵策略，前者是利用代謝工程技術來改質大腸桿菌，其策略包括(1) 建構 TCA 還原循環路徑；(2) 導引三羧酸循環路徑的碳流方向。後者則是進行醱酵條件之探討，以鑑定關鍵操作因子。結合以上兩者策略，生產菌株最終的琥珀酸產量可達 10.63 g/L，以及琥珀酸轉化率達 120%。

關鍵字：代謝工程、染色體工程、琥珀酸

Abstract

This study is aimed at to develop a technology platform for fermentative production of succinic acid in *Escherichia coli*. To achieve this goal, two main strategies were proposed consisting of the producer strain development and the fermentation technique. The former strategy was approached by metabolic engineering of *Escherichia coli*, including (1) generation of reductive TCA cycle and (2) redirection of carbon flux in the reductive TCA cycle. The second strategy was approached by investigating the key factors in the succinate fermentation. By combination of these two strategies, the engineered strain enabled production of 10.63 g/L succinate with a molar conversion yield reaching 120%.

Keywords: Metabolic engineering, Genomic engineering, succinic acid

壹、計畫緣起與目的

由於人們對於價格低廉的替代性能源和石化衍生產品的需求日益迫切，這股趨勢引發了所謂的「綠色工業革命」，其革命下的產物就是以綠色製程為基礎的產業，其中生物產業被視為綠色工業的代表，生物產業有賴於生物技術為基礎，相對於以化石能源為基礎的化學工業，生物技術可有效降低能源的消耗和汙染的排放，尤其生物技術可利用再生資源，達到永續發展和改善環境的目的。再生資源係指以生物質（biomass）為原料，範圍主要包括作物、農林漁牧加工後之廢棄物和工業及都市排放的有機廢棄物，透過生物精煉製程（biorefinery process）可將這些生物質轉化生產替代性能源（即生質能源）、取代石油衍生性的產品和新產品，這類新興產業的市場以每年約 15% 的速率成長，預計 2012 年後的全球總產值達到千億美元以上。

琥珀酸(succinic acid)是微生物代謝生產的二羧酸中最重要的物質，已經被美國能源部門列為 12 項平台生質化學品之一，極有經濟價值，經由特定的化學反應之後，琥珀酸可轉化成 1,4 丁二醇、順丁烯二酸酐(maleic anhydride)、琥珀酸亞胺、2-吡咯烷酮、四氫呋喃等，這些化學品可再轉化成許多有用的化學分子，可用以製作生物可分解聚合物、工業溶劑和特用化學品等，運用範圍廣泛且具有極大的商業市場；此外，琥珀酸可直接運用在食品工業上，當作風味添加劑，也可應用在要藥品上，甚至做為界面活性劑等。目前推估琥珀酸和其衍生物的市場可達每年 24.5 萬公噸，而由琥珀酸製

備的聚合物產量每年高達 2 千 5 百萬公噸，市場需求量甚為可觀。琥珀酸過去皆由石化產物丁烷轉化而得，目前由微生物醱酵所生成的琥珀酸成本估計為每公斤 0.55-1.1 美元，極具有競爭力，未來若醱酵生產成本可再降低，預期生質琥珀酸將可取代其石油衍生物，因此吸引了世界上有許多知名的大型製造公司躍躍欲試，其中包括日本 Mitsubishi Chemical、美國 Myriant Technologies、Diversified Natural Products 和 Michigan Biotechnology Institute International、德國 BASF、荷蘭 DSM 以及法國 Roquette 和 BioAmber 等公司。

自然界中有許多微生物具有醱酵生產琥珀酸的能力，最常見的例子如反芻菌 *Actinobacillus succinogenes* 在厭氧醱酵條件下可生產琥珀酸，目前的研究工作皆著重於此菌株的改質，以便能使用較便宜的碳源來轉化生產琥珀酸，以提高產品的競爭力；反芻菌 *Mannheimia succiniciproducens* 也被普遍研究，由於成功引入了基因工程技術之後，使得該菌株的生理代謝行為漸被解譯，未來頗具開發的潛力；德國 BASF 公司則篩選了一株反芻菌 *Basfia succiniciproducens*，在連續醱酵條件下，由甘油醱酵生產的琥珀酸之產量、轉化率和生產率分別可達 5.21 g/L、1.02 g/g 和 0.094 g/L/h，該製程的產業化仍有段距離；而荷蘭 DSM 及法國 Roquette 合作開發了重組麵包酵母菌，在醱酵 95 小時後，由葡萄糖可轉化生產 43 g/L 琥珀酸，具有產業化開發的潛能；此外，*Corynebacterium*

glutamicum、*Zymomonas mobilis* 和 *Yarrowia lipolytica* 也曾被研發來醱酵生產琥珀酸，惟成效有限，仍待後續的改進。大體而言，這些微生物多半需要豐富的營養基來培養，且生長速度較緩慢，應用於琥珀酸的生產，仍有極大的改進空間。

相較於其他生產菌株，大腸桿菌具有諸多優勢，包括可使用營養基簡單培養、生長快速、具有代謝多種單醣的能力、且可大量表現生產蛋白質，以及可資運用的基因工程和醱酵技術均較成熟，因此改質大腸桿菌來生產琥珀酸便受到研究者的注目。最早的研究是利用 *pflB* 和 *ldhA* 基因剔除的大腸桿菌，惟其琥珀酸產量低，後經由一連串的突變篩選，再加上強化菌株之 malic enzyme 的活性，重組大腸桿菌終可生產 1.19 g/L 琥珀酸。另外一個策略則是剔除菌株中與琥珀酸競爭的代謝路徑，以及引入 *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase (*pyc*) 基因和啟動細胞內的乙醛酸支路 (glyoxylate shunt)，結果改質後的大腸桿菌可由葡萄糖醱酵生產 58.3 g/L 琥珀酸，其莫爾轉化率達 0.85。事實上，琥珀酸的合成需要二氧化碳，因此將二氧化碳引入醱酵槽中，可以有效增加琥珀酸的生成量；而類似的策略則是將藍藻細菌的 carbonic anhydrase 引入大腸桿菌中，以增加二氧化碳的固化效用，進而增進琥珀酸的生成量。此外，研究者也在大腸桿菌中表現反芻菌 *A. succinogenes* phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase (*pck*)，這個代謝路徑可由

PEP 生成 oxaloacetate (OAA), 同時生成 ATP, 相較於 PEP carboxylase (*ppc*) 所催化的同樣代謝反應, 可增生能量, 進而有利於琥珀酸的生成量。其他的研究也試圖操作葡萄糖的運輸來增加能量的產生, 例如剔除 *ptsI* 基因, 以破壞大腸桿菌中負責運輸和磷酸化葡萄糖的磷酸烯醇式丙酮酸轉磷酸化酶系統 (PEP-phosphotransferase system, PTS), 接之以 galactose transporter (*galP*) 和 glucokinase (*glk*) 替代 PTS 的功能, 如此可以增加 PEP, 增進琥珀酸的生成量。再則, 結合導引演化的策略, 經基因改質的大腸桿菌可進化成琥珀酸生產菌, 結果顯示其莫爾轉化率和產量可達 1.2-1.6 和 70-80 g/L。

許多單醣如葡萄糖、蔗糖、木糖、半乳糖、甘油皆曾被研究用來醱酵生產琥珀酸, 此外, 也有研究者利用農業廢棄物、加工殘餘物、作物纖維素和半纖維素水解物當作微生物醱酵的料源。誠如前述, 纖維素和半纖維素是自然界中蘊藏最豐富的物質, 透過生物精煉製程將纖維素和半纖維素轉化成琥珀酸, 仍是公認最具發展潛力的製程。然水解植物生物質 (即纖維素和半纖維素) 的產物主要為葡萄糖和木糖, 自然界中少有微生物可以具備代謝這兩種醣類的能力, 以致影響了以植物生物質為基礎的微生物醱酵精煉製程的工業發展。大腸桿菌是少數具有代謝這兩種醣類的能力之菌種, 雖然如此, 在大腸桿菌中存在一種葡萄糖代謝物調控機制, 當此兩種醣同時存在時, 大腸桿菌會優先選擇葡萄糖代謝, 待葡萄糖消耗殆盡時,

繼而消耗木糖，且往往無法完全代謝木糖，如此下來將延宕整個醱酵的時程，最終致使醱酵效能不彰。針對以上這個問題，我們藉由代謝工程技術來改質大腸桿菌，除了將葡萄糖所引發的調控機制給予解除外，且強化了菌株中的木糖代謝路徑，結果獲得了一株可以同時有效代謝葡萄糖和木糖的重組菌株。

在本計畫中，我們將以大腸桿菌為基礎發展由葡萄糖轉化生成琥珀酸的生物精煉製程，而本年度的計畫重點在於構築一株可由代謝葡萄糖生產琥珀酸的生產菌株，結合醱酵技術來生產琥珀酸。

貳、研究方法與過程

本計畫之最終目標就是要建立一個琥珀酸的生物精煉製程，為了達到這個目標，我們將結合代謝工程技術、生物合成技術、導引演化技術來全面工程改造大腸桿菌，同時發展醱酵技術，以使得重組菌株能夠代謝纖維素水解液來生成琥珀酸。

本年度的計畫目標則將建構一株琥珀酸生產菌，其執行方法及進行步驟分述如下：

一、染色體操作工具箱之操作：

我們過去建構一套染色體操作工具箱，以使用以操作大腸桿菌染色體基因，並能重複基因剷除和基因強化，免除抗生素的使用。此工具箱主要包括兩端包夾一個抗生素基因標誌的突變型 *loxPRE* 位置和 *loxPLE* 位置的卡匣；其另一功能可以做為原位鑲箱啟動子工具箱，以方便能將人工啟動子與染色體基因黏合在一起，主要含有一個啟動子和兩端被 *loxPRE* 位置和 *loxPLE* 位置包夾的抗抗生素標誌基因的樣板質體。

二、剷除競爭性的基因：

接著我們利用這個基因剷除工具箱來替除菌株染色體上的基因，其作法首先以 PCR 方法增幅一段兩端被 *loxPRE* 位置和 *loxPLE* 位置包夾的抗抗生素標誌基因卡匣，另一方面，使用 PCR 方法將欲剔除的基因兩端 DNA 片段增幅出來，接著以增幅出的兩端 DNA 片段為前導子和增幅出的抗抗生素標誌基因卡匣為樣板，運用重疊 PCR 方法將這 3 個 DNA 片段黏接起來，最後再 PCR 方法將這融合的 DNA 片段大量增幅，以電穿法將融合 DNA 片段轉形入菌株中，藉由菌株內重組酶 λ -Red 所表現的 *exo*、*bet*、*gam* 等三個基因之作

用，將此融合 DNA 卡夾鑲插至菌株的目標基因上，置換染色體上的目標基因，最後再藉由嗜菌體 P1 的 Cre 重組酶重組突變型 *loxP* RE 位置和 *loxP* LE 位置，移除其中的抗生素基因標誌，遺留下一個 *loxP*RE/LE 位置，此時殘餘的 *loxP* RE/LE 位置不再受 Cre 重組酶作用。根據以上的方法，剷除菌株染色體 *sucCD* 基因。

三、強化關鍵基因的表現：

接著，我們利用原位鑲箱啟動子工具箱來強化菌株染色體上的基因，其作法首先以 PCR 方法增幅一段含有一個啟動子和兩端被 *loxP*RE 位置及 *loxP*LE 位置包夾的抗抗生素標誌基因卡夾，另一方面，使用 PCR 方法將欲剔除的基因兩端 DNA 片段增幅出來，接著以增幅出的兩端 DNA 片段為前導子和增幅出的啟動子和抗抗生素標誌基因卡夾為樣板，運用重疊 PCR 方法將這 3 個 DNA 片段黏接起來，最後再 PCR 方法將這融合的 DNA 片段大量增幅，以電穿法將融合 DNA 片段轉形入菌株中，藉由菌株內重組酶 λ -Red 所表現的 *exo*、*bet*、*gam* 等三個基因之作用，將此融合 DNA 卡夾鑲插至菌株的目標基因上，置換染色體上的目標基因，最後再藉由嗜菌體 P1 的 Cre 重組酶重組突變型 *loxP* RE 位置和 *loxP* LE 位置，移除其中的抗生素基因標誌，遺留下一個 *loxP*RE/LE 位置，移除其中的抗生素基因標誌，最後將啟動子原位鑲箱在染色體基因的上游，以便達到調控和強化染色體基因表現之目的。根據以上的方法，將菌株染色體基因包括 *mdh* 和 *fumC* 等基因置放在人工啟動子的下游，以達到強化其表現的目的。

四、琥珀酸醱酵：

從固態培養基中選取重組菌株單一菌落，培養於 LB 培養液 (5

mL) 的搖瓶中，以 37°C、200 rpm 培養隔夜後，接種至含有 5 g/L 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基中，使得搖瓶 (25 mL) 中的初始細胞密度達到 $OD_{550}=0.1$ ，接著於 37°C、150 rpm 下進行繼代培養。琥珀酸醱酵則採以下方法，如上述的方法，以燒瓶來過夜培養生產菌，隔日將過夜培養菌株接種至內含 30 g/L 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基的客製化小型醱酵槽，醱酵體積達 400 mL，控制醱酵液 pH 在 7.0 左右，隨著醱酵時間取樣分析細胞生長、醣類消耗和產物濃度，其中葡萄糖和有機酸濃度係使用 HPLC 來測量。此外，為了有效控制醱酵液溶氧濃度，生產菌株改以桌上型醱酵槽來進行琥珀酸醱酵，其醱酵體積達 3000 mL。

參、主要發現與結論

一、建構 TCA 還原循環路徑：

如圖一所示，將菌株染色體 *sucCD* 基因剔除，可將菌株的 TCA(三羧酸)氧化循環路徑改變成還原循環路徑，須知大腸桿菌處在厭氧狀態下，將採用 TCA 還原循環路徑來進行生長，而厭氧狀態有利於琥珀酸的生產，所以此策略可模仿 TCA 還原循環路徑，有助於產物的生產。

二、導引三羧酸循環路徑的碳流方向：

根據大腸桿菌之葡糖糖代謝路徑分析，可知經由內源型 *ppc* 基因所催化的反應路徑，由葡萄糖生成琥珀酸的理論反應式如下：



由上述反應式(1)顯示，由葡萄糖來生成琥珀酸需要額外能源如氧化還原力 NADH，因此任何消耗能源的路徑皆須予以剔除，此外，生產其他有機酸廢棄物的路徑也需剔除，以減少碳流量的損失，基於此，過去我們使用操作染色體工具箱依序剔除 *pta*, *ldhA*, *poxB*, *pflB*, *mgsA* 和 *adhE* 等基因。此外，為了疏通碳流累積在丙酮酸的代謝節點，一則有效的策略便是增加下游代謝節點的碳流量，基於此，生產琥珀酸的反應路徑是由 *frdABCD* 基因產物所負責，因此我們運用發展的原位鑲箱啟動子工具箱將人工啟動子與染色體 *frdABCD* 基因融和，以強化菌株的 *frdABCD* 基因表現，所獲得的菌株則命名為

BSuc-4ZPU。

在此以菌株 BSuc-4ZPU 為基礎，為了進一步強勢導引匯集於左端還原支路的碳流至琥珀酸，因此使用原位鑲箱啟動子工具箱將人工啟動子與染色體 *mdh* 基因融和，以強化菌株的 *mdh* 基因表現，所獲得的菌株則命名為 BSuc-4ZPUM。所獲得菌株使用燒瓶來培養，培養至細胞停滯生長時期時，以離心機收集細胞，破菌後回收細胞萃取液來進行 Mdh 的酵素活性檢測，如表一所示，其中有一株菌株 BSuc-4ZPUM 的 Mdh 比酵素活性較原菌株 BSuc-4ZPU 高出 10 倍，顯示經此技術建構後的菌株可表現出較高的 Mdh。

接著，以客製化小型醱酵槽方式來初步檢測菌株 BSuc-4ZPUM 和菌株 BSuc-4ZPU(控制組)的生產效能。首先使用含有 3% (167 mM) 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基，依據前述實驗方法來進行醱酵，在前期 12 小時，不斷進行曝氣以進行菌株的好氧生長，隨後關閉曝氣，以進行菌株的琥珀酸醱酵，隨時間取樣分析，結果如圖二所示，在前期醱酵階段，兩株菌株的生長狀態類似，並消耗近 60 mM 葡萄糖，但琥珀酸幾乎沒有生產；在後期醱酵階段，兩株菌株接進入生長停滯時期，並且累積生產琥珀酸，而菌株 BSuc-4ZPUM 所生產琥珀酸的濃度略高於菌株 BSuc-4ZPU 所生產的量，最後在醱酵 48 小時之後，仍留下約 50-60 mM 葡萄糖，且生產出約 55 mM 琥珀酸，其莫爾轉化率估計達 92%。

參照圖一，由草醋酸(OAA)到琥珀酸的合成路徑中，由蘋果酸到富馬酸的代謝路徑仍未強化，因此原位鑲箱啟動子工具箱將人工啟動子與染色體 *fumC* 基因融和，以強化菌株的 *fumC* 基因表現，所獲得的菌株則命名為 BSuc-4ZPUMF。所獲得菌株使用燒瓶來培養，培養至細胞停滯生長時期時，以離心機收集細胞，破菌後回收細胞萃取液來進行 FumC 的酵素活性檢測，如表二所示，其中有一株菌株 BSuc-4ZPUMF 的 FumC 比酵素活性較原菌株 BSuc-4ZPUM 高出 1.8 倍，顯示經此技術建構後的菌株可表現出較高的 FumC。

接著，以小型醱酵槽方式來初步檢測菌株 BSuc-4ZPUMF 和菌株 BSuc-4ZPUM(控制組)的生產效能。首先使用含有 3% (167 mM) 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基，依據前述實驗方法來進行醱酵，在前期 12 小時，不斷進行曝氣以進行菌株的好氧生長，隨後關閉曝氣，以進行菌株的琥珀酸醱酵，隨時間取樣分析，結果如圖三所示，在前期醱酵階段，菌株 BSuc-4ZPUMF 生長狀態較優，並消耗近 60 mM 葡萄糖，但琥珀酸幾乎沒有生產；在後期醱酵階段，兩株菌株接進入生長停滯時期，並且累積生產琥珀酸，而菌株 BSuc-4ZPUMF 所生產琥珀酸的濃度略高於菌株 BSuc-4ZPUM 所生產的量，最後在醱酵 48 小時之後，仍留下約 50 mM 葡萄糖，且生產出約 60 mM 琥珀酸，其莫爾轉化率估計達 86%。

參照圖一，草醋酸係為合成琥珀酸的前驅物，它是透由細胞內

的葡萄糖分解路徑所生成的磷酸烯醇丙酮酸(PEP)，再經由內源型磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(Ppc)催化生成琥珀酸。為了能導引碳流至草醋酸代謝節點，以增進琥珀酸的合成，在此我們由 *Corynebacterium glutamicum* 和 *Lactococcus lactis* 選殖丙酮酸羧化酶(Pyc)基因，分別獲得質體 pTH-Cpyc 和 pTH-Lpyc；丙酮酸羧化酶的功用與磷酸烯醇丙酮酸羧化酶類似，惟其轉化丙酮酸成草醋酸，同時固定二氧化碳。隨後將這些質體分別轉形入菌株 BSuc-4ZPUMF 中，依序得到菌株 BSuc-4ZPUMF/pTH-Cpyc 和 BSuc-4ZPUMF/pTH-Lpyc。接著，以小型醱酵槽方式來初步檢測菌株的生產效能，使用含有 3% (167 mM) 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基，依據上述實驗方法來進行醱酵，結果如圖四所示，相較於菌株 BSuc-4ZPUMF，菌株 BSuc-4ZPUMF/pTH-Cpyc 和 BSuc-4ZPUMF/pTH-Lpyc 並無法促進琥珀酸的產量，顯示尚有其它因素限制了琥珀酸的醱酵生產。。

三、醱酵條件對於琥珀酸生產的影響：

由上述的初步檢測得知，構築的菌株 BSuc-4ZPUMF 具備著由草醋酸(OAA)到琥珀酸的強化合成路徑，因此生產出較高的生物質量，雖然也略為增進琥珀酸的產量，不過琥珀酸轉化率卻稍下降。在此，我們進一步檢測醱酵條件對於菌株的琥珀酸生產之影響，由上圖中得知，葡萄糖似乎無法為菌株 BSuc-4ZPUMF 所善用，據此推測培養基中可能存在其他限制因素，因此在培養基中添加不同量

的酵母萃取粉(0.125%、0.25%、0.5%)，依照前面的醱酵培養方式，將菌株 BSuc-4ZPUMF 進行兩階段式的醱酵，結果如圖五所示，菌株在後期醱酵期間皆能維持微幅生長，且可增進約 75%的生物質量，在醱酵 48 小時之後，菌株可代謝大部分的葡萄糖，仍有大約 5-20 mM 葡萄糖未被代謝，而琥珀酸的產量在含有 0.125%、0.25%、0.5%酵母萃取粉的培養基中依序可獲得 35 mM、65 mM、45 mM，其最終產量和轉化率皆大幅降低。經 HPLC 分析後可得知，在含有酵母萃取粉的條件下，除了琥珀酸外，菌株仍會生產大量乳酸類似物，而導致琥珀酸的產量減少，由於菌株內形成乳酸的已知合成路徑皆已剔除，這個乳酸類似物究竟是經由何條代謝路徑生成出來，目前無法得知。

接下來的問題是如何抑制乳糖類似物的生成或促進琥珀酸的合成路徑，我們試圖改變醱酵液的酸鹼值，同時結合批次饋料的方式來解決問題。因此以上述方法進行醱酵，一開始則使用含 0.25%酵母萃取粉和 80 mM 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基，醱酵 pH 值控制在 6.2 或 7.0 時，同時進行饋料批次醱酵。結果如圖六所示，在 pH 6.2 的條件下，在前 24 小時進行細胞生長階段，隨後進行生產階段，菌株 BSuc-4ZPUMF 隨時間逐漸累積琥珀酸，96 小時後共消耗 220 mM 葡萄糖和生產 90 mM 琥珀酸。醱酵前 24 小時的細胞生長階段，菌株消耗 70 mM 葡萄糖；由此之後，菌株開始進入生長停滯時期，琥

琥珀酸濃度亦隨醱酵時間逐漸累積，直到醱酵結束，在此生產階段，菌株共消耗 150 mM 葡萄糖和生產 90 mM 琥珀酸；據以上數據估算，琥珀酸轉化率達 0.40 g/g，而莫爾轉化率則達 60%。然而在 pH 7.0 的條件下，菌株最後共消耗 220 mM 葡萄糖和生產 50 mM 琥珀酸，這個結果顯示醱酵 pH 值對於此菌株的琥珀酸生產影響極大。

四、桌上型醱酵槽進行琥珀酸生產：

綜觀以上的結果，琥珀酸的醱酵大致是限制於菌株於生產階段的葡萄糖代謝效能，這個限制因素雖然可以使用補充營養基如酵母粉來解決，不過卻引發細胞內其他未知的代謝反應，導致產生大量的乳酸類似物，即使改變葡萄糖饋料方式和醱酵液的酸鹼值，惟其效果不彰。須知菌株的醱酵生產階段處於氧氣現置的狀態下，而琥珀酸的前驅物草醋酸來自二氧化碳的固化反應，由此判斷，此階段醱酵液中的溶氧度(即二氧化碳的溶度)應扮演十分重要的角色。以上的實驗結果皆來自使用客製化小型醱酵槽，其缺點在於無法有效控制醱酵液的溶氧度，所以決定採用桌上型醱酵槽來控制這個操作參數以進行琥珀酸生產，並且使用不添加酵母粉的培養基，醱酵條件則與上述相似。

使用含有 167 mM 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基來培養菌株 BSuc-4ZPUMF，首先以 1 vvm 的空氣進流量來進行曝氣，培養控制在 37 °C 和 pH 7，這個階段進行菌株的好氧生長，醱酵 12 小時之

後，細胞密度達約 4 OD₅₅₀，在此刻停止曝氣，且打入 3.5 公升二氧化碳，控制醱酵液的溶氧度達 0.1-0.5%飽和濃氧度，以進行菌株的琥珀酸醱酵，隨時間取樣分析，結果如圖七所示。在前期生長階段，菌株 BSuc-4ZPUMF 消耗近 55 mM 葡萄糖，僅產生些微琥珀酸；隨後進入後期的生產階段，在前 12 小時，菌株仍持續生長達 6 OD₅₅₀，不過細胞密度卻開始下降直到醱酵結束，然而菌株 BSuc-4ZPUMF 所生產琥珀酸的濃度隨時間逐漸累積，在此階段醱酵 3.5 日之後，共消耗 82 mM 葡萄糖，且生產出約 90 mM 琥珀酸，生產階段的琥珀酸莫爾轉化率估計達 110%，由 HPLC 分析獲知，除了琥珀酸，菌株並不會生產其他有機酸和醱酵產物如乳酸、蟻酸、丙酮酸和乙醇等。這個實驗結果顯示，控制醱酵液的溶氧度是影響琥珀酸生產的重要因素，在接近厭氧的微溶氧狀態下，菌株可將消耗的葡萄糖有效的轉化成琥珀酸，而通入的二氧化碳，可以形成一股驅動力，有效驅動內源型磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(Ppc)的”固碳”催化反應(參見圖一)，惟菌株的葡萄糖代謝速率大幅降低，導致琥珀酸的生產速率低；此外，菌株在生產階段的中後期呈現死亡的現象，這個現象的成因仍不明。

基於以上的結果，下一步驟需解決的問題就是如何增進琥珀酸的生產速率。這個問題可藉由提高菌株的細胞密度，因此我們在含有 167 mM 葡萄糖的 NBS 基本礦物培養基中額外添加 1.6 g/L 酵

母粉。醱酵條件與上述相同，首先以 1 vvm 的空氣進流量來進行曝氣，培養控制在 37 °C 和 pH 7，這個階段進行菌株的好氧生長，醱酵 12 小時之後，細胞密度達約 10.5 OD₅₅₀，在此刻停止曝氣，且打入 3.5 公升二氧化碳，控制醱酵液的溶氧度達 0.1-0.5%飽和濃氧度，以進行菌株的琥珀酸醱酵，隨時間取樣分析，結果如圖八所示。在前期生長階段，菌株 BSuc-4ZPUMF 消耗近 92 mM 葡萄糖，僅產生些微琥珀酸；隨後進入後期的生產階段，細胞密度緩慢下降直到醱酵結束，而菌株 BSuc-4ZPUMF 所生產琥珀酸的濃度隨時間逐漸累積，在此階段醱酵 1.5 日之後，共消耗 75 mM 葡萄糖，且生產出約 90 mM 琥珀酸，生產階段的琥珀酸莫爾轉化率估計達 120 % (0.79 g 琥珀酸/g 葡萄糖)，由 HPLC 分析獲知，菌株並不會生產其他有機酸和醱酵產物如乳酸、蟻酸、丙酮酸和乙醇等。與前一個策略相比，這個醱酵策略可以提高琥珀酸莫爾轉化率達 10%，琥珀酸的生產速率(2.5 mM/hr)則增加達 130%。

由代謝路徑的反應式(1)來推估，琥珀酸理論莫爾轉化率可達 200%，這個研究所採用的最佳策略可以達到 120 % 的理論莫爾轉化率，已經與過去研究發表的成果可相比擬：琥珀酸的生產速率達 2.5 mM/hr (0.3 g/L/hr)，琥珀酸產量達 10.63 g/L。綜合以上所有的結果，結合建構的生產菌株與發展的醱酵策略已經成功建立了一個琥珀酸的生產技術平台，未來研究的課題將著重於琥珀酸產量的增進，以

及聯接纖維素水解的平台，達到生產纖維琥珀酸的最終目標。

肆、參考文獻

1. Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. 2007. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 23:381-388.
2. Arakawa H, Lodygin D, Buerstedde JM. 2001. Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnol* 1:7.
3. Barrett DG, Yousaf MN. 2009. Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism. *Molecules* 14:4022-4050.
4. Borges ER, Pereira NJ. 2011. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *J Ind Microbiol Biotechnol*:1001-1011.
5. Bozell JJ, Petersen GR. 2010. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's “top 10” revisited *Green Chem* 12:539-554.
6. Chao YP, Chiang CJ, Lee HM, Wang ZW, Chen PT; 2012. Method for simultaneous fermentation of pentose and hexose patent

US13/656,654.

7. Chen K, Jiang M, Wei P, Yao J, Wu H. 2010. Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes* Appl Biochem Biotechnol 160:477-485.
8. Chiang CJ, Chen PT, Chao YP. 2008. Replicon-free and markerless methods for genomic insertion of DNAs in phage attachment sites and controlled expression of chromosomal genes in *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng 101:985-995.
9. Chiang CJ, Saini M, Lee HM, Wang ZW, Chen PT, Chao YP. 2012. Genomic engineering of *Escherichia coli* by the phage attachment site-based integration system with mutant loxP sites. Proc Biochem In Press.
10. Cox SJ, Shalel LS, Sanchez A, Lin H, Peercy B, Bennett GN, San KY. 2006. Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: a succinate production case study. Metab Eng 8:46-57.
11. Deutscher J, Francke C, Postma PW. 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 70:939-1031.
12. Donnelly MI, Millard CS, Clark DP, Chen MJ, Rathke JW. 1998. A

- novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol. *Appl Biochem Biotechnol* 70-72:187-98.
13. Gobina E. 2007 report code EGY054A. BCC Research publications.
 14. Haveren JV, Scott EL, Sanders J. 2008. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioprod & Biorefin* 2:41-57.
 15. Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. 2008. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng* 99:1140-1153.
 16. Jantama K, Haupt MJ, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO; 2010. Materials and methods for efficient succinate and malate production patent US 2010/0184171 A1.
 17. Kumar R, Singh S, Singh OV. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377-391.
 18. Lee JW, Lee SY, Song H, Yoo JS. 2006. The proteome of *Mannheimia succiniciproducens*, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics* 6:3550-3566.

19. Lee KY, Park JM, Kim TY, Yun H, Lee SY. 2010. The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microb Cell Fact* 9:94.
20. Lee P, Lee S, Hong S, Chang H. 2002. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:663-668.
21. Lee PC, Lee SY, Hong SH, Chang HN. 2003. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 26:63-67.
22. Li J, Zheng XY, Fang XJ, Liu SW, Chen KQ, Jiang M, Wei P, Ouyang PK. 2011. A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour Technol* 102:6147-6152.
23. Lu S, Eiteman MA, Altman E. 2009. Effect of CO₂ on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *J Biotechnol* 143:213-223.
24. Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. 2008.

- An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:459-464.
25. Paster M, Pellegrino JL, Carole TM. 2003. Industrial bioproducts: today and tomorrow Washington DC: USDOE.
26. Prosfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, Blattner FR. 1999. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* 27:4409-4415.
27. Sánchez AM, Bennett GN, San KY. 2005. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng*:229-239.
28. Scholten E, Renz T, Thomas J. 2009. Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnol Lett* 31:1947-1951.
29. Singh A, Cher Soh K, Hatzimanikatis V, Gill RT. 2011 Manipulating redox and ATP balancing for improved production of succinate in *E. coli*. *Metab Eng* 13:76-81.

30. Sivakumar G, Vail DR, Xu J, Burner DM, Lay Jr JO, Ge X, Weathers PJ. 2010. Bioethanol and biodiesel: alternative liquid fuels for future generations. *Eng Life Sci* 10:8-18.
31. Stols L, Donnelly MI. 1997. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol* 63:2695-2701.
32. Thakker C, Martínez I, San KY, Bennett GN. 2012. Succinate production in *Escherichia coli*. *Biotechnol J* 7:213-224.
33. Tsukatania T, Matsumoto K. 2000. Flow-injection fluorometric quantification of succinate in foodstuffs based on the use of an immobilized enzyme reactor. *Anal Chim Acta* 416:197-203.
34. van de Graaf MJ, Valianpoer F, Fiey G, Delattre L, Schulten EAM; 2011. Process for the crystallization of succinic acid patent WO2010EP67868.
35. Wang D, Li Q, Li W, Xing J, Su Z. 2009. Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 45:491-497.
36. Wang J, Zhu J, Bennett GN, San KY. 2011. Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Metab Eng*

13:328-335.

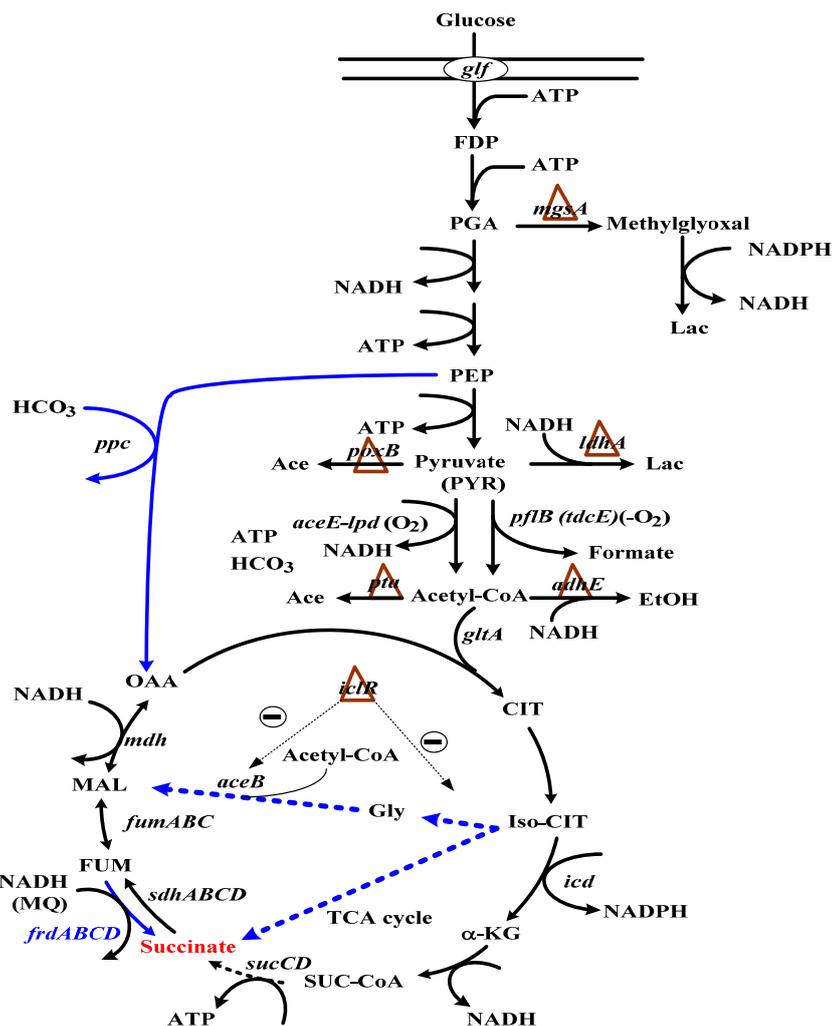
37. Werpy T, Petersen G, editors. 2004. Top Value added chemicals from biomass Washington DC: US DOE.
38. Xu J, Guo BH. 2010. Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization. *Biotechnol J* 5:1149-1163.
39. Yuzbashev TV, Yuzbasheva EY, Sobolevskaya TI, Laptev IA, Vybornaya TV, Larina AS, Matsui K, Fukui K, Sineoky SP. 2010. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng*. 107:673-682.
40. Zeikus JG, Jain. M.K., Elankovan P. 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:545-552.
41. Zhang X, Jantama K, Shanmugam KT, Ingram LO. 2009. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol* 75:7807-7813.

表一 菌株 Mdh 酵素比活性

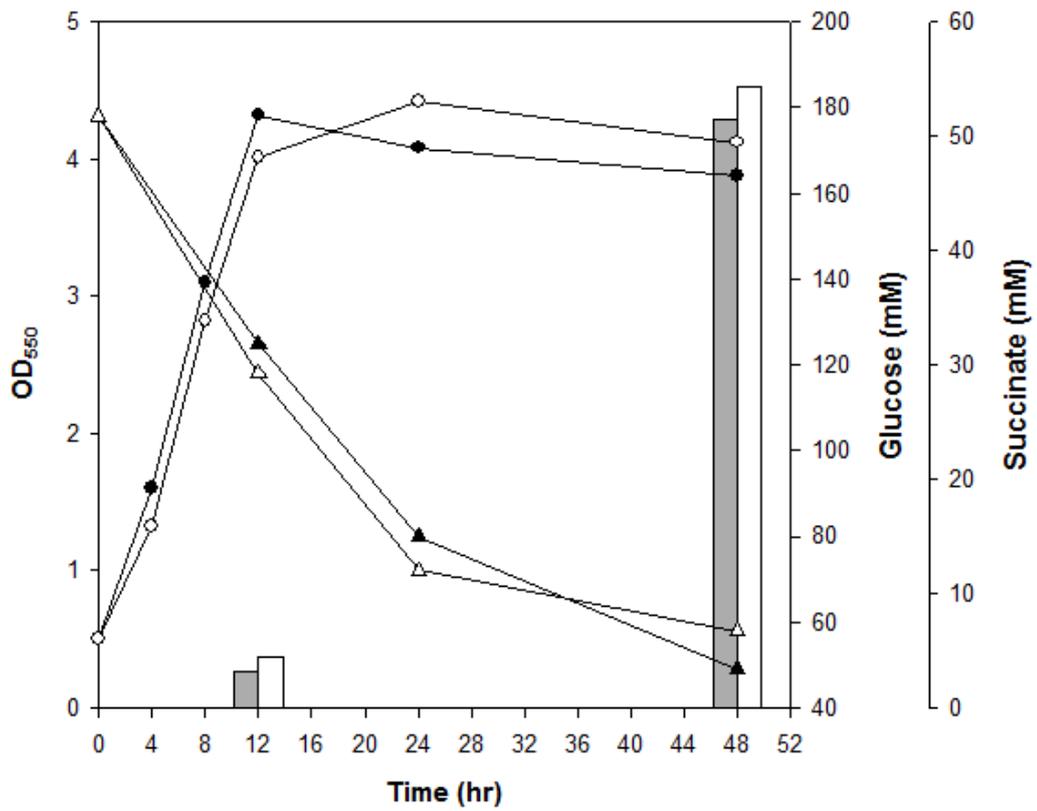
	Unit/ml sup	Unit/mg protein
Bsuc-4ZPU	0.035	0.008
Bsuc-4ZPU-M#1	0.489	0.081
Bsuc-4ZPU-M#2	0.345	0.057
Bsuc-4ZPU-M#3	0.049	0.008
Bsuc-4ZPU-M#4	0.349	0.057

表二 菌株 FumC 酵素比活性

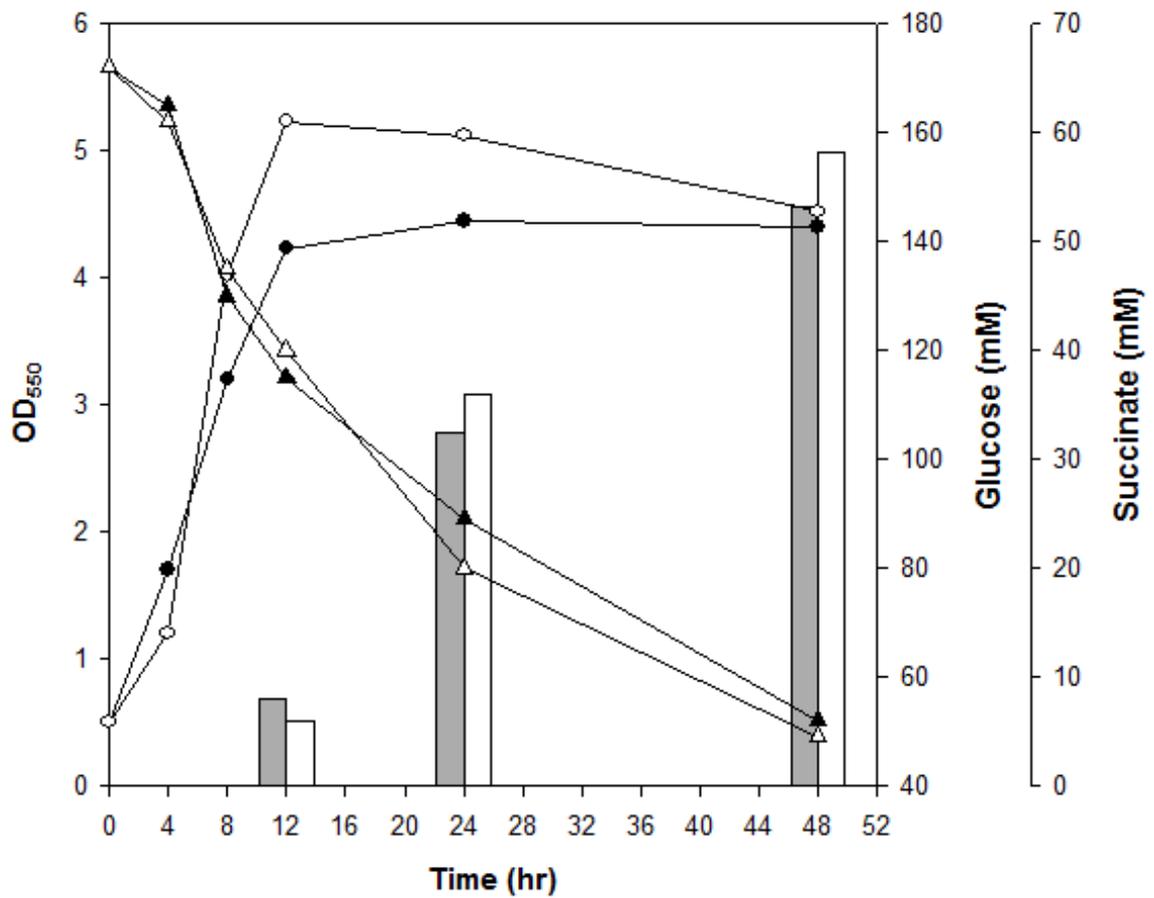
	Unit/ml sup	Unit/mg protein
Bsuc-4 ZPUM	8.27	41.36
Bsuc-4 ZPUMF(SPL-FumC Km) #1	14.57	72.84
Bsuc-4 ZPUMF(SPL-FumC Km) #2	13.51	67.53
Bsuc-4 ZPUMF(SPL-FumC Km) #3	14.51	72.57
Bsuc-4 ZPUMF(SPL-FumC Km) #4	11.66	58.30
Bsuc-4 ZPUMF(SPL-FumC Km) #5	7.70	38.48



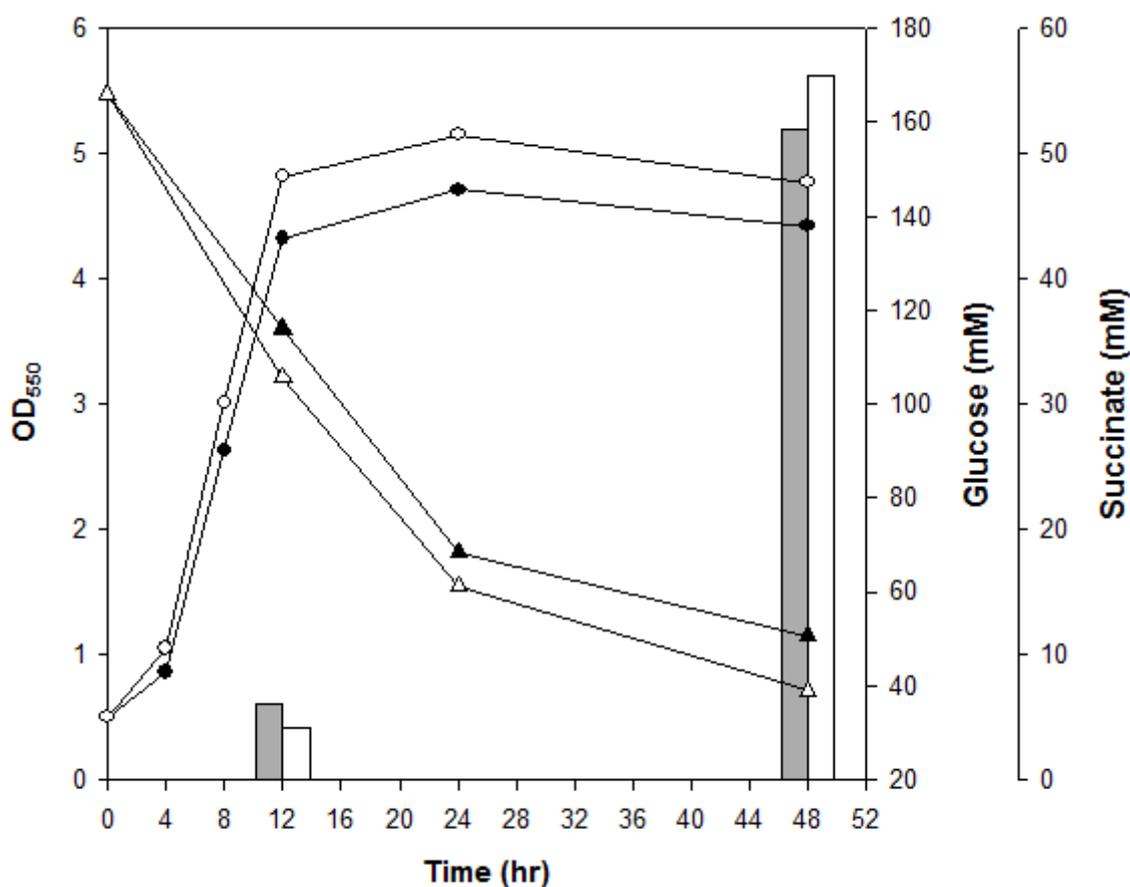
圖一 大腸桿菌葡萄糖醱酵生產琥珀酸之代謝路徑示意圖。縮寫說明：FDP, fructose 1,6-biphosphate; PGA, 3-phosphoglyceraldehyde; X5P, xylulose5-phosphate; PPP, pentose phosphate pathway; PEP, phosphoenolpyruvate; Lac, lactate; Ace, acetate; OAA, oxaloacetate; CIT, citrate; Iso-CIT, isocitrate; a-KG, alpha-ketoglutarate; SUC-CoA, succinyl-CoA; FUM, fumarate; MAL, malate.



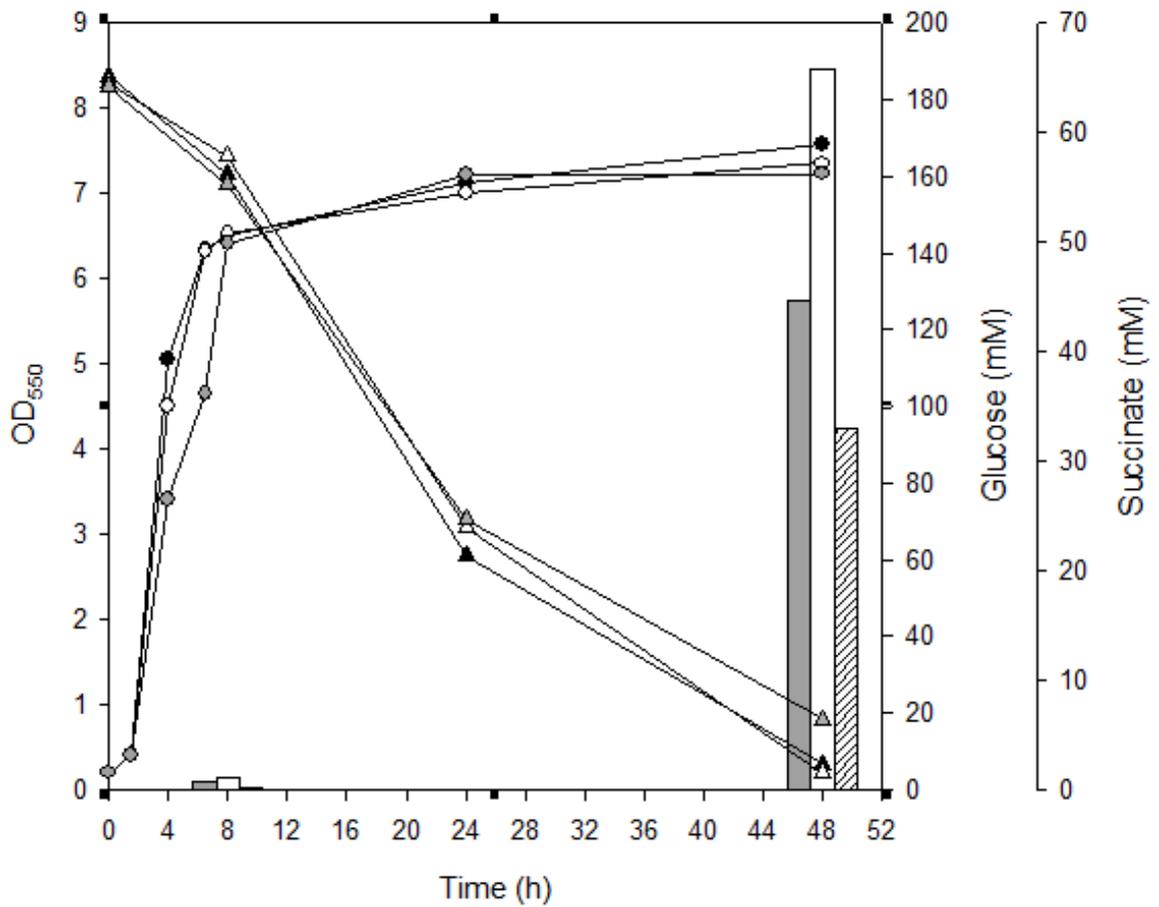
圖二 重組菌株 BSuc-4ZPUM 和 BSuc-4ZPU(控制組)進行醱酵曲線圖。符號說明：菌株 BSuc-4ZPUM (△)和 BSuc-4ZPU (▲)葡萄糖消耗；菌株 BSuc-4ZPUM (○)和 BSuc-4ZPU (●)細胞密度；BSuc-4ZPU 及；菌株 BSuc-4ZPUM (空心柱狀)和 BSuc-4ZPU (實心柱狀)琥珀酸生產。



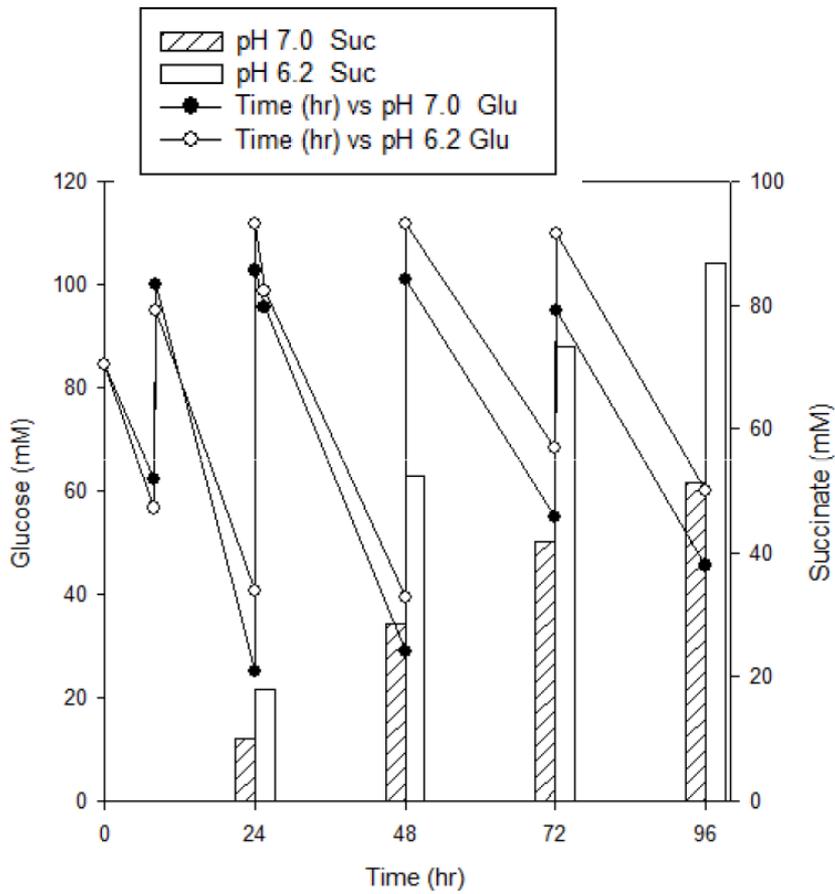
圖三 重組菌株 BSuc-4ZPUMF 和 BSuc-4ZPUM(控制組)進行發酵曲線圖。符號說明：菌株 BSuc-4ZPUMF (\triangle)和 BSuc-4ZPUM (\blacktriangle)葡萄糖消耗；菌株 BSuc-4ZPUMF (\circ)和 BSuc-4ZPUM (\bullet)細胞密度；BSuc-4ZPU 及；菌株 BSuc-4ZPUMF (空心柱狀)和 BSuc-4ZPUM (實心柱狀)琥珀酸生產。



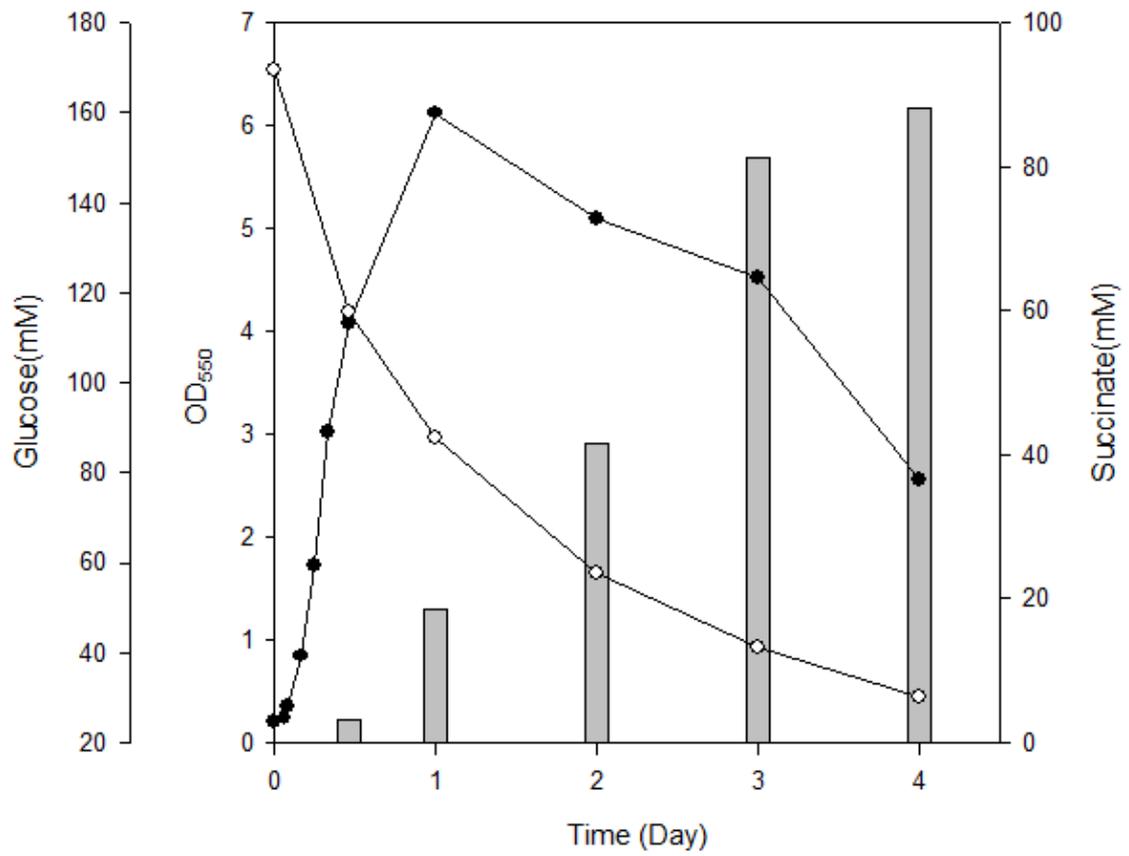
圖四 重組菌株 BSuc-4ZPUMF/pTH-Cpyc 和 BSuc-4ZPUMF/pTH-Lpyc 進行醱酵曲線圖。符號說明：菌株 BSuc-4ZPUMF/pTH-Lpyc (Δ)和 BSuc-4ZPUMF/pTH-Cpyc (\blacktriangle)葡萄糖消耗；菌株 BSuc-4ZPUMF/pTH-Lpyc (\circ)和 BSuc-4ZPUMF/pTH-Cpyc (\bullet)細胞密度；BSuc-4ZPUMF/pTH-Lpyc (空心柱狀)和 BSuc-4ZPUMF/pTH-Cpyc (實心柱狀) 琥珀酸生產。



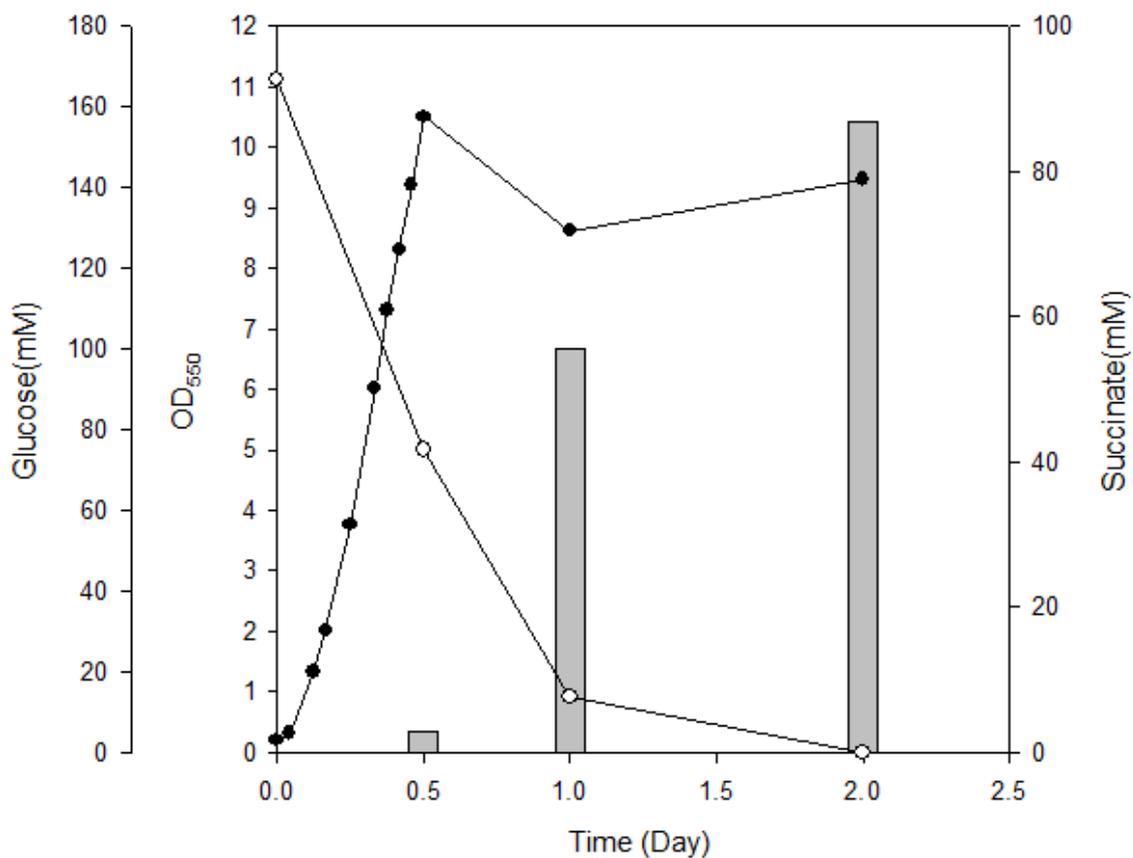
圖五 在添加不同濃度酵母粉條件下重組菌株BSuc-4ZPUMF進行醱酵曲線圖。進行醱酵曲線圖。符號說明：0.5% (●)、0.25%(灰圓)、0.125% (○)葡萄糖消耗；0.5% (▲)、0.25%(灰三角形)、0.125% (△)細胞密度；0.5% (實心柱)、0.25%(空心柱)、0.125% (斜線柱) 琥珀酸生產。



圖六、在控制條件下重組菌株 BSuc-4ZPUMF 進行醱酵曲線圖。符號說明:在 pH 7.0 條件下菌株的葡萄糖消耗(●)及琥珀酸生產(斜線柱);在 pH 6.2 條件下菌株的葡萄糖消耗(○)及琥珀酸生產(空心柱)。



圖七 重組菌株 BSuc-4ZPUMF 於桌上型醱酵槽進行醱酵曲線圖。符號說明：葡萄糖消耗(○)；細胞密度(●)；琥珀酸生產(柱狀)。



圖八 在添加酵母粉條件下重組菌株 BSuc-4ZPUMF 於桌上型醱酵槽進行醱酵曲線圖。符號說明：葡萄糖消耗(○)；細胞密度(●)；琥珀酸生產(柱狀)。