

文章编号: 1006-3080(2026)03-0335-12

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250705002

调节 TCA 循环促进大肠杆菌利用乙酸合成 (*R*)-3-羟基丁酸的研究

费 鹏¹, 孙俊如¹, 罗远婵¹, 吴 辉^{1,2}

(1. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237; 2. 大连理工大学生物工程学院,
智能生物制造教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要: 乙酸是常见的非糖类碳源之一, 具有成本低、来源广等优点。TCA(Tricarboxylic Acid)循环是工程大肠杆菌以乙酸为碳源合成(*R*)-3-羟基丁酸(*R*-3HB)的主要竞争途径, 合理调控 TCA 循环能够提高 *R*-3HB 的产量和得率。本研究构建了一种能够通过相对荧光强度反映 *R*-3HB 浓度的高效筛选方法, 并使用携带随机不同 crRNA 的 CRISPRi 系统, 对 TCA 循环进行不同强度的抑制, 筛选出 5 株 *R*-3HB 的潜在高产菌株, 在摇瓶水平进行发酵验证。其中, SX11 菌株在摇瓶条件下能够生产 2.12 g/L 的 *R*-3HB, 相较于对照组提高 31.7%; 且该菌株在 64 h 时的得率为 0.41 g/g, 相较于对照组提高 115.8%。基于 SX11 菌株中的 crRNA 序列构建了对应的 CRISPRi 质粒进行回补验证, 大肠杆菌 BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 的 *R*-3HB 产量和得率分别为 2.04 g/L 和 0.37 g/g, 相对原始菌株(pTrcAB7, pBADP2)分别提高 13.3% 和 94.7%。该结果证明了含有 *gltAcrRNA2** 的 CRISPRi 系统能够有效调控 TCA 循环, 促进菌株利用乙酸合成 *R*-3HB。本文为提高以乙酰-CoA 为前体的产物产量提供了新思路。

关键词: 大肠杆菌; 乙酸; (*R*)-3-羟基丁酸; 高效筛选; CRISPRi

中图分类号: Q815

文献标志码: A

乙酸是一种常见的二碳一元有机酸, 可作为微生物利用的碳源, 相较于糖类碳源, 乙酸具有碳利用率高、成本低廉以及来源广等优点^[1]。由于世界范围内的粮食短缺等问题, 乙酸等非粮食来源碳源作为绿色生物制造的底物正逐步受到世界各国研究者的广泛关注。传统的化石基乙酸生产虽然产量大、成本低廉, 但使用的原料都是煤、石油和天然气等不可再生资源, 不利于可持续发展^[2-3]。目前, 随着技术的进步, 乙酸已经能够以木质纤维素、合成气、废水和有机废弃物等廉价物质进行生产^[4-6]。其中, 以木质纤维素为原料生产乙酸具有成本低、资源丰富和易规模化生产等优点^[7]; 合成气发酵则可以在生产乙酸的过程中固定 CO₂, 促进“双碳”目标的达成, 有望替

代化石基资源成为乙酸的主要生产方法^[3, 8-9]。目前, 采用微生物发酵技术已可利用乙酸生产多种物质, 如 3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)^[10-11]、衣康酸^[12]、琥珀酸^[13]、甲羟戊酸^[14]、异丙醇^[15]、异丁醇^[16]、角鲨烯^[17]和聚(3-羟基丁酸酯)^[18]等。

(*R*)-3-羟基丁酸(*R*-3HB)是一种具有手性中心的重要生物基平台化合物, 能够作为抗生素、维生素和信使等多种物质的前体^[19-21]。*R*-3HB 是常见生物基可降解塑料聚(3-羟基丁酸酯)(PHB)的单体, 能够用于合成 PHB 及其共聚物。此外, *R*-3HB 是哺乳动物三种常见酮体中含量最高的一种, 可以为心脑血管等器官提供能量, 也用于治疗 and 缓解多种疾病^[22-25]。目前, 采用微生物发酵生产 *R*-3HB 的技术已经较为

收稿日期: 2025-07-05

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103500)

作者简介: 费 鹏(1997—), 男, 湖南武冈人, 博士生, 主要研究方向为大肠杆菌乙酸代谢工程。E-mail: 464668771@qq.com

通信联系人: 吴 辉, E-mail: hwwu@ecust.edu.cn

引用本文: 费 鹏, 孙俊如, 罗远婵, 等. 调节 TCA 循环促进大肠杆菌利用乙酸合成 (*R*)-3-羟基丁酸的研究 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2026, 52(3): 335-346.

Citation: FEI Peng, SUN Junru, LUO Yuanchan, et al. Adjusting the TCA Cycle for Promoting the Production of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid from Acetate in *Escherichia coli*[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(3): 335-346.

成熟,例如:Chen 等^[26]通过增强生产途径酶活性、辅酶工程和调控中心代谢途径这 3 种方式构建工程大肠杆菌(*E. coli*),最终该菌株以葡萄糖为碳源,通过分批补料发酵生产 75.7 g/L 的 R-3HB。

在微生物正常代谢过程中, TCA(Tricarboxylic Acid) 循环需要消耗大量乙酰-CoA。因此,在包括 R-3HB 在内的以乙酰-CoA 为前体的产物生产过程中, TCA 循环是主要竞争途径之一。但与常规竞争途径不同, TCA 循环是在好氧条件下维持菌体生存和生长的关键途径,如果直接阻断 TCA 循环,会严重抑制菌株的生长,甚至直接导致菌株死亡。近年来,通过代谢调控将 TCA 循环强度调控至有利于产物合成的水平,已成为代谢工程领域的研究热点。例如:Zhao 等^[27]在大肠杆菌利用葡萄糖合成衣康酸的研究中,使用 CRISPRi 靶向基因 *icd*、*pykA* 和 *sucCD* 调控 TCA 循环强度,最终衣康酸的产量提高了 23%,达到了 3.93 g/L; Löbs 等^[28]通过 CRISPRi 调节 TCA 循环和电子传递链相关基因的表达,并结合其他策略成功将马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)的乙酸

乙酯产量提高 3.8 倍。

研究者前期已经成功在大肠杆菌 BW25113 中构建了从乙酸到 R-3HB 的代谢通路,实现以乙酸为底物生产 R-3HB^[29-30]。本文以乙酸为底物,在生产 R-3HB 的工程大肠杆菌菌株中,构建了一种能够通过相对荧光强度反映 R-3HB 浓度的高效筛选方法,结合基于 CRISPRi 的代谢调控策略,成功筛选出能够精准适度抑制 TCA 循环的 crRNA 序列,提高了代谢工程菌株利用乙酸合成 R-3HB 的产量和得率。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

本研究中生产 R-3HB 所用的背景菌株是 BW25113,而质粒构建等分子实验在大肠杆菌 DH5 α 中进行。本论文使用的菌株和质粒详细情况见表 1 和表 2。此外,本文中构建菌株使用的引物、启动子及 RBS 见表 3。

表 1 本文所使用的菌株
Table 1 Strains used in this paper

Strain	Genotype	Source
DH5 α	<i>F</i> ⁻ , <i>supE44</i> , <i>lacU169</i> , (ϕ 80 <i>lacZ</i> 15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Laboratory collection
BW25113	<i>F</i> ⁻ , <i>DE(araD-araB)567</i> , <i>lacZ4787(del)::rrnB-3</i> , <i>LAM</i> ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>DE(rhaD-rhaB)568</i> , <i>hsdR514</i>	Laboratory collection
FP26	BW25113 P _{J23101} - <i>gltA</i>	This study
FP27	BW25113 P _{J23108} - <i>gltA</i>	This study
FP28	BW25113 P _{J23112} - <i>gltA</i>	This study
FP29	BW25113 P _{J23113} - <i>gltA</i>	This study
FP30	BW25113 P _{J23114} - <i>gltA</i>	This study
FP31	BW25113 P _{J23119} - <i>gltA</i>	This study
SX01—SX39	BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2) transformed by the random CRISPRi plasmid	This study

表 2 本文所使用的质粒
Table 2 Plasmids used in this paper

Plasmid	Description	Source
pTrcAB7	<i>phaA</i> (F219Y) and <i>phaB</i> (Q47L/ T173S) genes from <i>Cupriavidus Necator</i> in pTrc99a	Laboratory collection
pBADP2	<i>pct</i> ₄₅₄₃ gene from <i>Clostridium beijerinckii</i> 8052 in pBAD33-trc	Literature [29]
pTed-HPR	P _{hpdR} - <i>hpdR</i> , P _{hpdH} - <i>mrfp1</i> , Kan ^R , pSC101** ori	This study
pET28a-HPR	P _{hpdR} - <i>hpdR</i> , P _{hpdH} - <i>mrfp1</i> , Kan ^R , pBR322 ori, F1 ori	This study
pTrcAB7-HPR	P _{hpdR} - <i>hpdR</i> and P _{hpdH} - <i>mrfp1</i> was add to pTrcAB7	This study
JBEI-18703	DH1, P _{Tet} -eng-dCas9-P _{J23119} - <i>poxB-ackA-pta</i> , pSC101**, Kan ^R	Literature [31]
pSC101-smr	DH1, P _{Tet} -eng-dCas9-P _{J23119} - <i>poxB-ackA-pta</i> , pSC101**, Spe ^R	This study
pSC101- <i>gltA</i>	DH1, P _{Tet} -eng-dCas9-P _{J23119} - <i>gltA</i> crRNA2*, pSC101**, Spe ^R	This study

表 3 本文所使用的引物、启动子及 RBS

Table 3 Primers, promoters and RBS used in this paper

Item	Name	Sequence (5' to 3')
Primer	F- <i>P_{gltA}</i> -sgRNA	GATTAAC TTATGTAA CAGTGG TTTTAGAGCTAGAAATA
	R- <i>P_{gltA}</i> -sgRNA	CACTGTTACATAAGTTAATCACTAGTATTATACCTAGGAC
	F- <i>gltA</i> -yan	GCGGTAAGGATGCCCCACAT
	R-J231xx-yan	CTAGTATTTCTCCTCTTTCTCTAGAGCTAGC
	F- <i>gltA</i> up	CGAAGAAGCTGCCCATAATCGC
	R- <i>gltA</i> down	TTTTCGACAGCAGGCGGAAC
	F- <i>gltA</i> down101	AGGTATTATGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTGATACAAAAGCAAAACTCAC
	R- <i>gltA</i> up101	TCTAGAGCTAGCATAATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTAAAGGATCACTGTTTCAGGATAAAACCCG
	F- <i>gltA</i> down108	AGGTATAATGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTGATACAAAAGCAAAACTCAC
	R- <i>gltA</i> up108	TCTAGAGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAGGATCACTGTTTCAGGATAAAACCCG
	F- <i>gltA</i> down112	AGGGATTATGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTGATACAAAAGCAAAACTCAC
	R- <i>gltA</i> up112	CTAGAGCTAGCATAATCCCTAGGACTGAGCTAGCTATCAGGGATCACTGTTTCAGGATAAAACCCG
	F- <i>gltA</i> down113	AGGGATTATGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTGATACAAAAGCAAAACTCAC
	R- <i>gltA</i> up113	TCTAGAGCTAGCATAATCCCTAGGACTGAGCTAGCCATCAGGGATCACTGTTTCAGGATAAAACCCG
	F- <i>gltA</i> down114	AGGTACAATGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTGATACAAAAGCAAAACTCAC
	R- <i>gltA</i> up114	TCTAGAGCTAGCATTGTACCTAGGACTGAGCTAGCCATAAAGGATCACTGTTTCAGGATAAAACCCG
	F- <i>gltA</i> down119	AGGTATAATGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTGATACAAAAGCAAAACTCAC
	R- <i>gltA</i> up119	TCTAGAGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAGGATCACTGTTTCAGGATAAAACCCG
	F-crRNA-yan	CACGCATTGATTTGAGTCAGTC
	R-crRNA-yan	TCCCAGAGCCTGATAAAAACGAG
	F- <i>gltA</i> -crRNA1	AGCAAAACTCACNNTCAACGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTT
	R- <i>gltA</i> -crRNA1	CGTTGANNGTGAGTTTTGCTGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGT
	F- <i>gltA</i> -crRNA2	CTGTGGGGACCTNNGCACGGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTT
	R- <i>gltA</i> -crRNA2	CCGTGCNNAGGTCCCCACAGGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGT
	F- <i>icdA</i> -crRNA1	GCGCTCGAAGGANNGTGAAGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTT
	R- <i>icdA</i> -crRNA1	TTCACCNTCCTTCGAGCGCGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGT
	F- <i>icdA</i> -crRNA2	GAAGGAGCGTTTNNAGACTGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTT
	R- <i>icdA</i> -crRNA2	CAGTCTNNAACGCTCCTTCGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGT
	F- <i>gltA</i> -crRNA2*	CTGTGGGGACCTCAGCACGGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAACTTCAGCACACTGAGACTT
	R- <i>gltA</i> -crRNA2*	CCGTGCTGAGGTCCCCACAGGTTTTGGGACCATTCAAAACAGCATAGCTCTAAAACCTCGTAGACTATTTTTGT
	F-16sRNAq	AACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
	R-16sRNAq	CGGACTACGACGCACTTTATGAGG
	F- <i>gltA</i> q	GATGACCTGCTGGAAGTGGCTATG
	R- <i>gltA</i> q	GACGGAATACCCATCGCTTTCAGG
Promoter	J23101	TTTACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATTATGCTAGC
	J23108	CTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC
	J23112	CTGATAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTATGCTAGC
	J23113	CTGATGGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTATGCTAGC
	J23114	TTTATGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAATGCTAGC
	J23119	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGC
RBS	B0034	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAG

1.2 培养基

Luria-Bertani(LB) 培养基(g/L): 蛋白胨 10、NaCl 10、酵母提取物 5。

发酵培养基(g/L): KH_2PO_4 3.0、 Na_2HPO_4 15.12、 NH_4Cl 1.0、NaCl 0.5、 CH_3COONa 10、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49、 CaCl_2 11.1、酵母提取物 2、微量元素母液(TE) 0.000 1、VB₁ 0.002。

按照需要额外添加抗生素,各抗生素在培养基中的终质量浓度(mg/L): 氨苄西林(Amp)100、氯霉素(Cm)34、大观霉素(Spe)100。

1.3 实验方法

1.3.1 摇瓶发酵 一级种子: 在平板上挑取 3~6 个单菌落接种到含 4 mL LB 培养基的试管中,于 37 ℃、220 r/min 条件下过夜培养。二级种子: 以 2% 的比例接种,将一级种子接种到含 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角摇瓶中,于 37 ℃、220 r/min 条件下培养 10 h。发酵过程: 以 2% 的比例接种,将二级种子接种到 50 mL 发酵培养基中,于 37 ℃、220 r/min 条件下培养 3.5 h,加入终浓度 0.1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导,诱导后发酵温度降低至 25 ℃。每 8 h 取样,并且使用 3 mol/L H_2SO_4 将摇瓶中发酵液的 pH 调至 7 左右,取出的样品一部分用于测量 OD₆₀₀,另一部分离心取上清于 -20 ℃ 保存。

1.3.2 CRISPR-Cas9 基因编辑技术 使用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术替换目的基因的启动子。该系统由两个质粒构成: pRedCas9 和 pGRB,其中 pRedCas9 负责表达 Cas9 蛋白, pGRB 负责表达 sgRNA。sgRNA 序列使用 Benchling 网站的在线 sgRNA 工具设计。一般情况下, DNA 供体序列为: 上游同源臂-替换后启动子-核糖体结合位点(RBS)-下游同源臂,如果没有特殊说明,本文中使用的 RBS 都为 B0034。

1.3.3 质粒构建 使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司(简称南京诺唯赞)的 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V2 C116 进行质粒构建。构建过程中活化等步骤在大肠杆菌 DH5 α 中进行。

1.3.4 相对荧光强度测定 挑取转化 pTed-HPR 或 pET28a-HPR 的 BW25113 单菌落,接种到含 4 mL 发酵培养基(根据需求额外添加不同浓度 R-3HB)试管中, 37 ℃、220 r/min 下培养 12 h。吸取 200 μL 菌液转移到 96 孔板中,每个试管 3 个平行,并将 96 孔板放到酶标仪中, 37 ℃ 振荡培养,每 6 h 测量一次 OD₆₀₀ 和荧光值(RFU, Relative Fluorescence Units), 荧光值测量条件: 激发波长 585 nm, 发射波长 620 nm, 荧光增益因子 100%。最后, 计算相对荧光强度(RFU/OD₆₀₀)。

1.3.5 CRISPRi 技术 首先, 使用 Benchling 网站的在线 sgRNA 工具设计 crRNA, 并根据设计的 crRNA

(crRNA 的 7 位和 8 位替换为随机碱基)设计引物, 通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 pSC101-smr 获得线性化片段。使用钙离子转化法将线性片段转入大肠杆菌 DH5 α 中进行环化, 将同一平板上的所有质粒接种到同一个试管, 提取含有不同 crRNA 的混合质粒。随后, 将上述混合质粒转入 BW25113(pTrcAB7, pBADP2) 中, 在固体 LB 平板上涂布获得单菌落。挑取单菌落分别接种到 4 mL LB 培养基中, 在 37 ℃、220 r/min 条件下培养 12 h。转接到终浓度 10 nmol/L 的脱水四环素和 0.1 mmol/L IPTG 的 4 mL 发酵培养基中, 接种量为 10%, 在 37 ℃、220 r/min 条件下培养 32 h。将试管中的菌液转移到 96 孔板中, 每孔添加 200 μL 菌液, 在酶标仪中 37 ℃ 振荡培养 6 h, 测量 OD₆₀₀ 和荧光值, 并计算相对荧光强度。

1.3.6 转录水平测定 柠檬酸合酶基因(*gltA*)的转录水平使用荧光定量 PCR 测量。取摇瓶发酵 16 h 时的发酵液稀释到合适浓度后, 加入溶菌酶(DE103-01, 南京诺唯赞公司)使大肠杆菌菌体溶解。然后, 使用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2(南京诺唯赞公司)提取 RNA。使用翌圣生物科技(上海)股份有限公司(简称翌圣生物)的 Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 将 RNA 反转录为 cDNA。选择 16sRNA 作为内参基因, 使用 Hieff UNICON[®] ColorGPS qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox) (翌圣生物)进行荧光定量 PCR。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度测定 使用 V1800 可见分光光度计测量菌液 OD₆₀₀, 通过稀释使测量值在 0.2~0.8 之间。

1.4.2 乙酸和 R-3HB 等物质的浓度测定 使用高效液相色谱(LC20A 型, 岛津公司)测定物质浓度, 该过程使用折光示差检测器和色谱柱 Aminex[®] HPX-87H Column 300 mm $\times$ 7.8 mm(Bio-Rad 公司, 美国), 流动相使用 5 mmol/L 硫酸, 柱温箱温度 65 ℃, 流速 0.6 mL/min。流动相使用前用真空抽滤装置过滤(滤膜孔径 0.45 μm), 并超声除气泡。测试前将保存的样品上清液用 0.22 μm 水相膜过滤, 测试后将峰面积代入标准曲线(通过标准品的测量结果进行绘制), 计算各物质浓度。

2 结果与讨论

2.1 通过替换启动子调节 TCA 循环强度对 R-3HB 合成的影响

实验室前期实验中, 在大肠杆菌 BW25113 内成

功构建并优化了从乙酸到 *R*-3HB 的生产途径^[29]。在生产 *R*-3HB 的工程大肠杆菌内, TCA 循环和 *R*-3HB 合成途径都需要以乙酰-CoA 为前体。TCA 循环中催化入口反应的柠檬酸合酶(*GltA*)是 TCA 循环的限速步骤^[32-33], 针对 *gltA* 的表达, 选择不同强度的组成型启动子替换其天然启动子, 进而调节 TCA 循环的强度, 期望促进 *R*-3HB 合成。本文中使用 J23100 系列的启动子 P_{J23101} 、 P_{J23108} 、 P_{J23112} 、 P_{J23113} 、 P_{J23114} 和 P_{J23119} 替换 BW25113 中 *gltA* 的天然启动子, 分别得到菌株 FP26、FP27、FP28、FP29、FP30 和 FP31。所用启动子按从弱到强的顺序排列为: P_{J23112} 、 P_{J23113} 、 P_{J23114} 、 P_{J23108} 、 P_{J23101} 和 P_{J23119} ^[34-36]。更换启动子后, *gltA* 的转录水平基本与启动子强度呈正相关, 并且改造菌株 *gltA* 转录水平均低于野生型菌株(图 1(f))。如图 1(b)~(d) 所示, 相较于原始菌株 BW25113($pTrcAB7$, $pBADP2$), 所有替换 *gltA* 启动子后的菌株生长都明显变差, 乙酸利用速度显著减慢,

并且 *R*-3HB 的产量大幅度降低。其中, 使用较弱启动子的 FP28($pTrcAB7$, $pBADP2$) 和 FP29($pTrcAB7$, $pBADP2$), 诱导后几乎不能生长, 也不能利用乙酸生产 *R*-3HB。可以推测这两个菌株替换 *gltA* 启动子后导致 TCA 强度过低, 不足以维持其在发酵培养基中的生存。而其他 4 个菌株, 虽然 *R*-3HB 的得率相较于原始菌株 BW25113($pTrcAB7$, $pBADP2$) 提升明显(图 1(e)), 但由于乙酸消耗过慢, 最终 *R*-3HB 的产量反而低于原始菌株。其中, FP31($pTrcAB7$, $pBADP2$) 在 64 h 时得率最高, 为 0.47 g/g, 但 *R*-3HB 产量仅为 0.79 g/L。总的来说, 虽然通过替换 *gltA* 的启动子成功提高了得率, 但 *R*-3HB 的产量明显降低, 将 *gltA* 的天然启动子替换为 J23100 系列启动子并没有将菌株的 TCA 循环调整到更适合 *R*-3HB 生产的强度。

2.2 构建 *R*-3HB 高产菌株的高效筛选方法

为了提高 *R*-3HB 的产量, 需要进一步筛选合适的 TCA 循环强度, 由于筛选需要大量的工作和尝试,

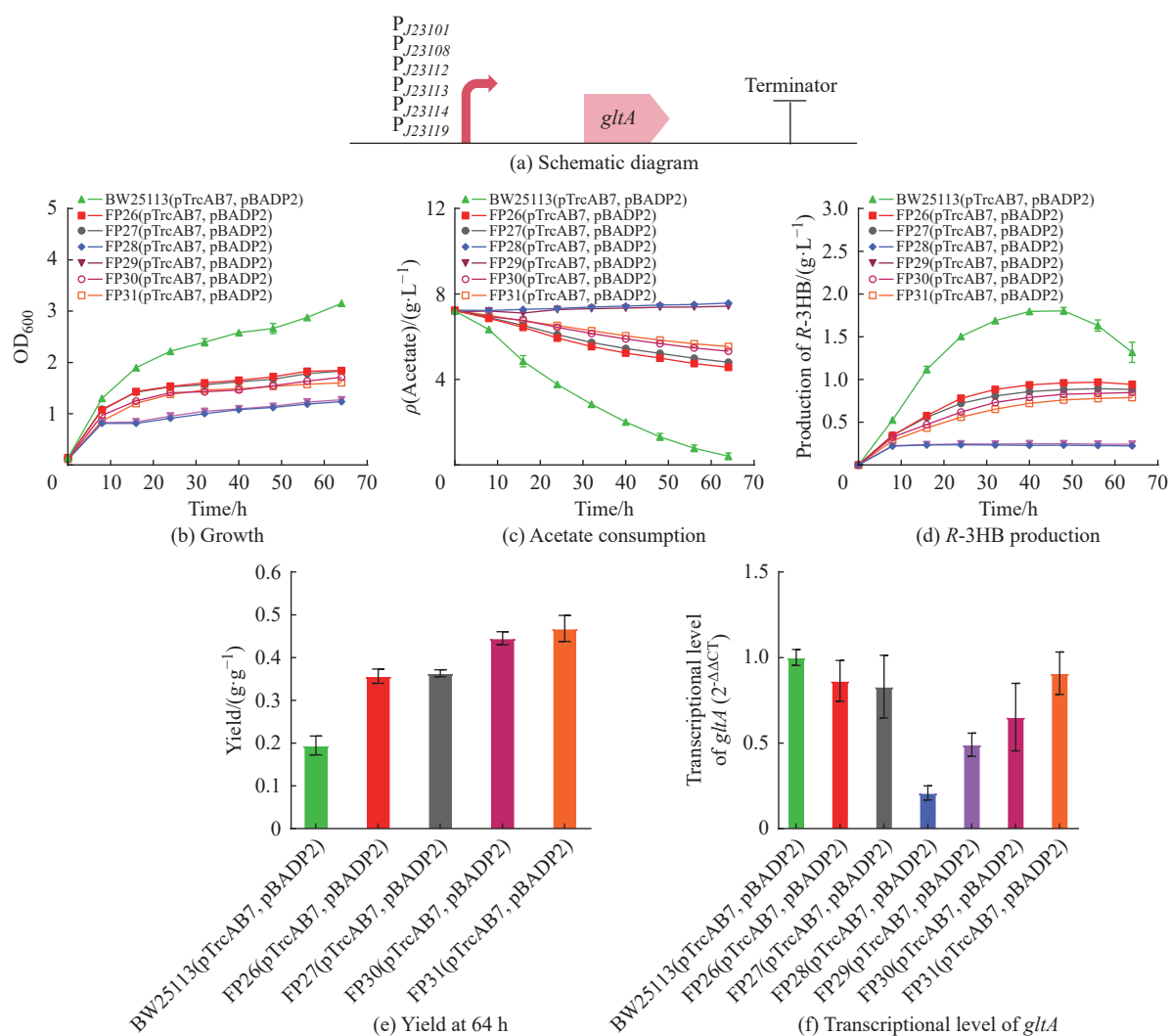


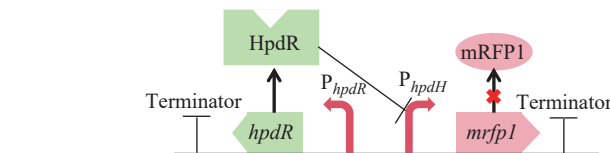
图 1 替换 *gltA* 启动子对 *R*-3HB 生产的影响

Fig. 1 Effect of replacing the *gltA* promoter on *R*-3HB production

因此构建一种高效筛选方法是非常有必要的。根据已有报道^[37], 来自恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* KT2440d)的 P_{hpdH} (需要同时表达 HpdR), 在大肠杆菌利用葡萄糖合成 3-HP 的研究中能够感应 3-HP 的浓度, 在一定范围内 3-HP 的浓度越高该启动子强度越强, 并且在以葡萄糖为碳源的情况下, 该启动子对 *R*-3HB 浓度也具有一定感应能力。因此, 本研究使用这套系统用于检测工程大肠杆菌内 *R*-3HB 的生产情况。该系统中, 在 P_{hpdH} 后面连接红色荧光蛋白基因 *mrfp1*, 将启动子强度转化为荧光值(图 2), 以相对荧光强度的高低判断 *R*-3HB 的产量。为验证该高效筛选方法在以乙酸为底物时的可行性, 在高拷贝的 pET28a 和低拷贝的 JBEI-18 703 质粒上构建这套检测系统, 分别命名为 pET28a-HPR 和 pTed-HPR。

为了检测这套系统在生产环境下的灵敏性, 将 pET28a-HPR 和 pTed-HPR 分别转入大肠杆菌 BW25113 中, 并接种到含有不同质量浓度 *R*-3HB 的 4 mL 发酵培养基试管中培养 12 h, 发酵液分装到 96 孔板后在酶标仪中连续培养并定期检测荧光值和 OD_{600} 。最终, BW25113(pET28a-HPR) 和 BW25113(pTed-HPR) 测试结果分别如图 3 和图 4 所示。培养 6 h 之后, 当 *R*-3HBNa 质量浓度高于 0.5 g/L (相当于 *R*-3HB 产量大于 0.41 g/L) 时, BW25113(pET28a-HPR) 的 RFU/OD_{600} 随着 *R*-3HB 质量浓度升高明显增加。而 *R*-3HB 质量浓度较低(*R*-3HBNa 质量浓度小于 0.5 g/L)

When *R*-3HB does not exist



When *R*-3HB exists

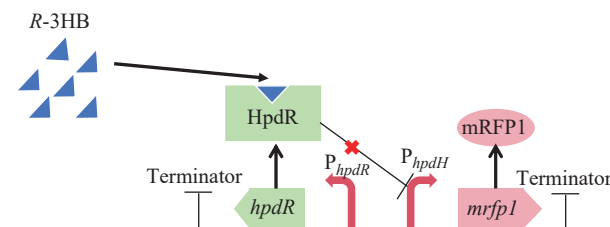


图 2 基于 *R*-3HB 响应启动子的高效筛选原理示意图

Fig. 2 Schematic diagram of efficient screening method based on *R*-3HB responsive promoter

时, 相对荧光强度差异不明显, 原因可能是底物乙酸对该启动子有一定影响^[37]。因为在 2.1 节中, 野生型菌株的 *R*-3HB 最大产量为 1.80 g/L (图 1(d)), 远大于 0.41 g/L, 所以在以乙酸为底物的培养基中, 高拷贝的 pET28a-HPR 可作为筛选 *R*-3HB 合成能力的元件。而 BW25113(pTed-HPR) 仅在 18 h 且 *R*-3HBNa 质量浓度高于 0.5 g/L 时, 相对荧光强度随 *R*-3HB 质量浓度升高而增大, 其他时候未表现出明显正相关性, 这可能是质粒拷贝数过低使得表达的 HpdR 浓度不够导致的。总的来说, 以乙酸为底物生产 *R*-3HB 的实验中, pET28a-HPR 能够用于初步筛选高产 *R*-

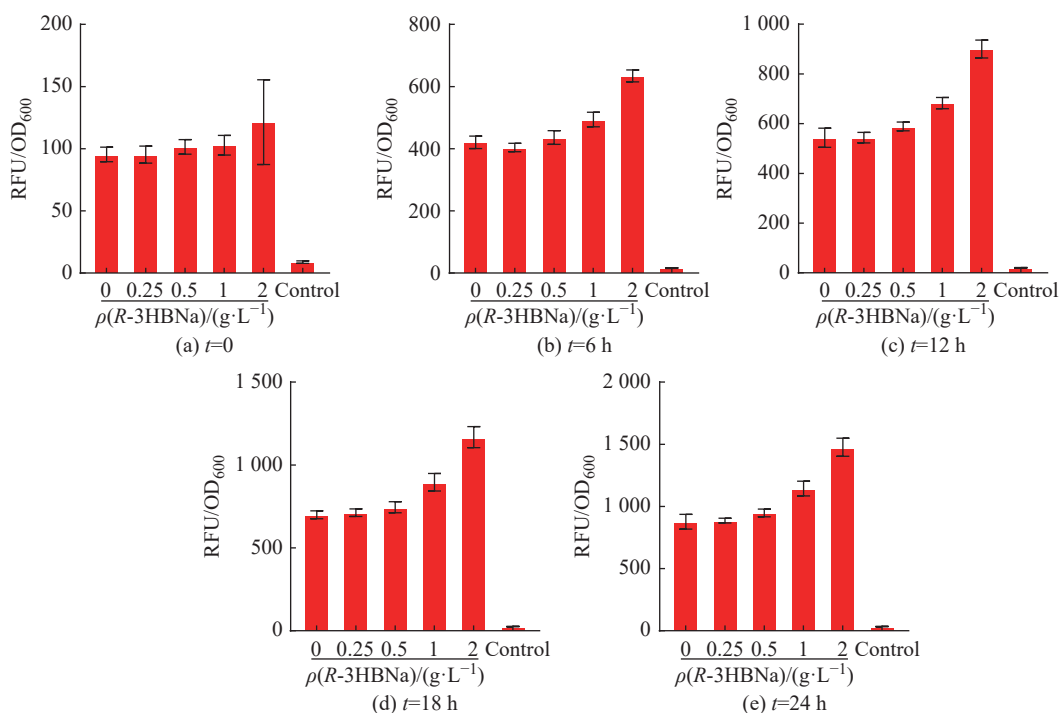


图 3 含 pET28a-HPR 的大肠杆菌在乙酸培养基中的相对荧光强度

Fig. 3 Relative fluorescence intensity of *E. coli* containing pET28a-HPR in acetate medium

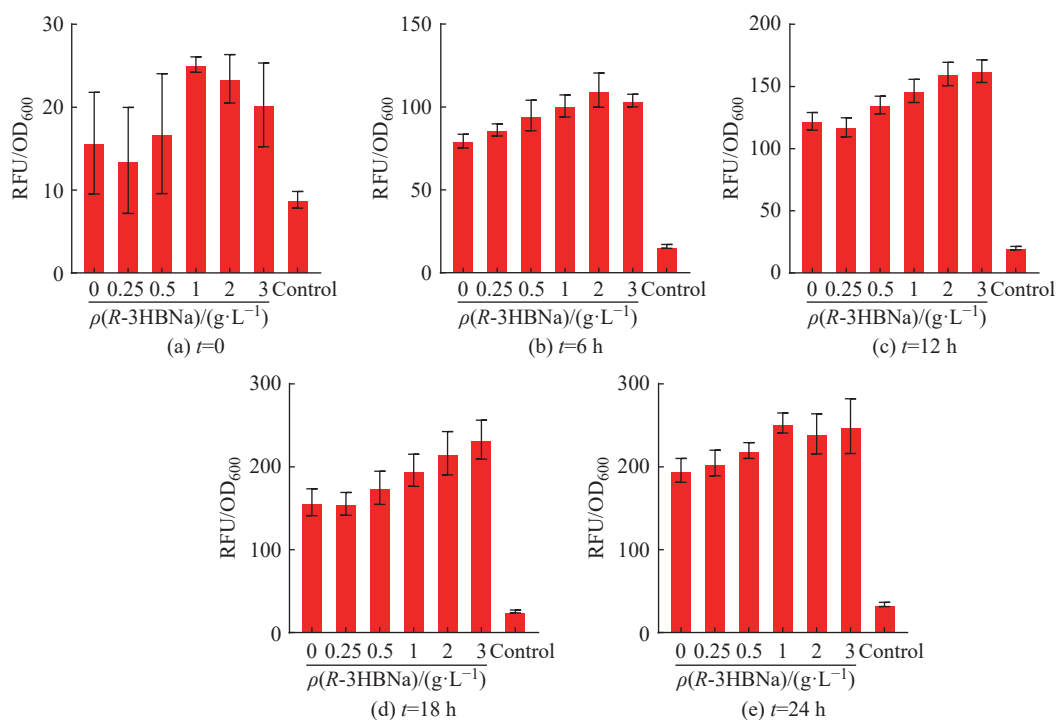


图4 含 pTed-HPR 的大肠杆菌在乙酸培养基中的相对荧光强度

Fig. 4 Relative fluorescence intensity of *E. coli* containing pTed-HPR in acetate medium

3HB 的菌株。

在成功构建高效筛选方法后,需要快速构建大量具有不同 TCA 循环强度的 *R*-3HB 生产菌株用于筛选。本研究拟通过 CRISPRi 技术抑制代谢工程菌株中 TCA 循环关键基因表达,得到具有不同 TCA 循环强度的工程菌株(图 5)。在 CRISPRi 抑制策略中,sgRNA(或 crRNA)处在基因上游或启动子序列中时抑制强度较高,而处在基因中游或下游时抑制强度较弱^[31],且 sgRNA(或 crRNA)的第 7 位和第 8 位错配能够使 CRISPRi 抑制强度减弱但不会完全消失^[38]。因此,综合考虑后选择 *gltA* 和 *icdA* 作为调节 TCA 循环强度的位点,分别在 *gltA* 和 *icdA* 的启动子序列(或基因上游)处设计 crRNA,命名为 *gltAcrRNA1* 和 *icdAcrRNA1*;分别在 *gltA* 和 *icdA* 基因的中游处设计 crRNA,命名为 *gltAcrRNA2* 和 *icdAcrRNA2*。随后,将上述 4 个 crRNA 的第 7 位和第 8 位用随机碱基替换,理论上可以合成 64 种不同的 crRNA(表 4)。

由于之前构建的高效筛选方法中使用的质粒 pET28a-HPR 和生产质粒 pTrcAB7 具有相同的复制子(两个质粒的复制子都是 pBR322),属于不相容质粒,不能共同在同一个菌株中稳定存在,因此将两个质粒进行合并,将 pET28a-HPR 上的检测基因转移到生产质粒 pTrcAB7 上,得到新质粒 pTrcAB7-HPR 用于后续实验。通过将理论上最多 64 种含有不同 crRNA 的 CRISPRi 质粒混合提取物转入菌株 BW25113

(pTrcAB7-HPR, pBADP2) 中,得到菌株 SX1~SX39,在平板中挑取单菌落用于筛选,最终筛选结果如图 6 所示,SX1~SX39 菌株的相对荧光强度在对照菌株上下浮动。其中,相对荧光强度最高的 5 个菌株为 SX13、SX39、SX10、SX11 和 SX30。

为了验证筛选出的菌株以乙酸为底物时生产 *R*-3HB 的性能,使用菌株 SX10、SX11、SX13、SX30 和 SX39 在摇瓶水平进行发酵测试,结果如图 7 所示。在引入 CRISPRi 系统抑制 TCA 循环后,相对于对照组 BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2),所有菌株生长均在不同程度上变差,这也从侧面证实含有不同 crRNA 的 CRISPRi 系统对 TCA 循环形成不同强度的抑制。此外,相对于对照组,其他 5 个菌株的乙酸利用速率都有所减慢,并且 *R*-3HB 在 64 h 时的得率显著提高。其中, SX11 和 SX13 的 *R*-3HB 产量相对于对照组有所增加。对照组在 48 h 时 *R*-3HB 产量达到最高,为 1.61 g/L,相较于 BW25113(pTrcAB7, pBADP2) 的 1.80 g/L(图 1(d))有所降低,这可能是因为筛选系统(HPR 相关基因)的表达造成了额外的代谢负担。此外,64 h 时对照组菌株得率为 0.19 g/g(图 7(d)),与 BW25113(pTrcAB7, pBADP2) 得率(图 1(e))相同。在 *R*-3HB 产量提高的菌株中, SX11 的 *R*-3HB 产量最高,64 h 时能够达到 2.12 g/L,相对对照组提高 31.7%;并且该菌株 64 h 得率为 0.41 g/g,相较于对照组提升 115.8%; SX13 在 56 h 时 *R*-3HB 产量达到最

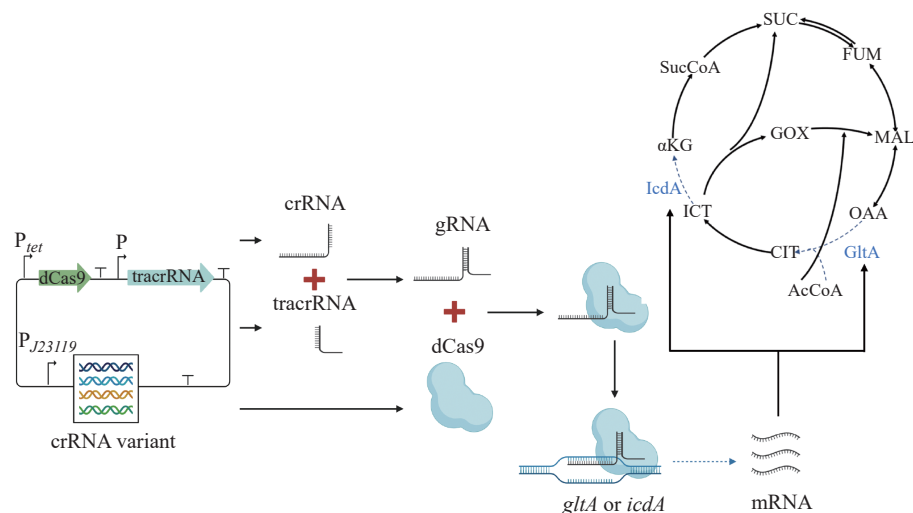


图 5 CRISPRi 抑制调控的原理示意图(蓝色虚线代表减弱)

Fig. 5 Schematic diagram of the inhibition principle via CRISPRi (The blue dotted line represents weakening)

表 4 设计的 crRNA 序列

Table 4 Designed crRNA sequence

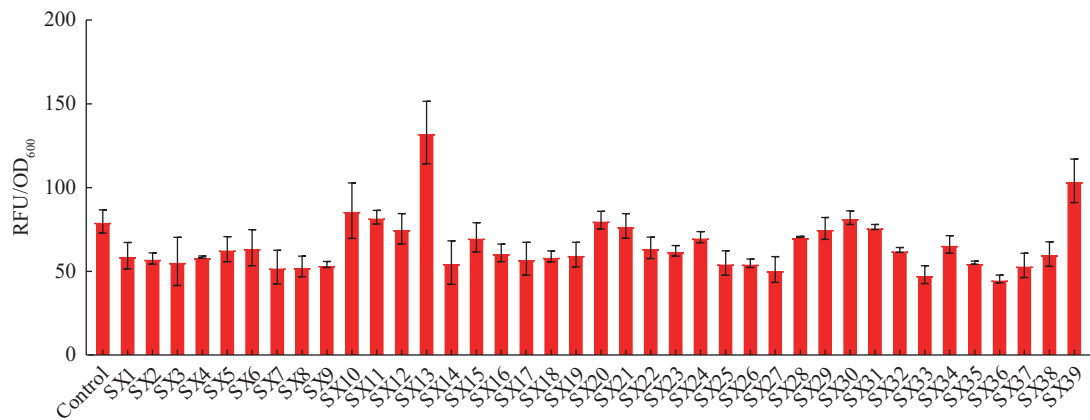
Name	Sequence(5'→3')
<i>gltAcrRNA1</i>	AGCAAACTCACNTCAACG
<i>gltAcrRNA2</i>	CTGTGGGGACCTNNGCACGG
<i>icdAcrRNA1</i>	GCGCTCGAAGGANNGGTGAA
<i>icdAcrRNA2</i>	GAAGGAGCGTTTNNAGACTG

高,为 1.73 g/L,相较于对照菌株提高 7.5%,但其产量低于 BW25113(pTrcAB7, pBADP2)(图 1(d))。而其他 3 个菌株仅得率高于对照组, *R*-3HB 产量都有不同程度的降低。最终,测量 SX11 中 CRISPRi 系统所包含的 crRNA 序列(CTGTGGGGACCTCAGCACGG),并将该 crRNA 序列命名为 *gltAcrRNA2**。总的来说,本文通过高效筛选与 CRISPRi 系统相结合方法,成功筛选出能够生产更多 *R*-3HB 的工程大肠杆菌,并测

得了菌株中所含有的 crRNA 序列。

2.3 针对高产菌株的回补验证

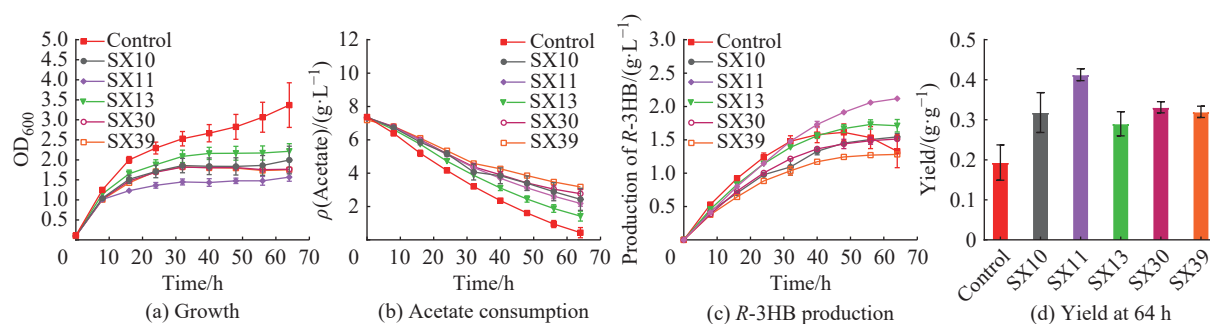
为了证实是含有 *gltAcrRNA2** 的 CRISPRi 系统导致 SX11 的 *R*-3HB 产量和得率相较于对照菌 BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2)有所提高,本文构建了含有 *gltAcrRNA2** 的 CRISPRi 质粒(pSC101-*gltA*),并将该质粒与不带检测系统的生产质粒 pTrcAB7 和 pBADP2 共同转入大肠杆菌 BW25113。结果如图 8 所示,成功回补 CRISPRi 系统的 BW25113 (pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 在 56 h 时能够生产 2.04 g/L 的 *R*-3HB,相较 SX11 没有明显差异,相较 BW25113(pTrcAB7, pBADP2)提高 13.3%。BW25113 (pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 的生长情况明显不如 BW25113(pTrcAB7, pBADP2),主要是由于 CRISPRi 系统抑制菌株的 TCA 循环导致菌体生长变差。而 BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*)相较 SX11



Control: BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2); SX1—SX39: BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2) transformed by the random CRISPRi plasmid

图 6 CRISPRi 抑制 TCA 循环的筛选结果

Fig. 6 Screening results of TCA cycle via CRISPRi inhibiting



Control: BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2); SX10—SX39: BW25113(pTrcAB7-HPR, pBADP2) transformed by the random CRISPRi plasmid

图7 筛选出的菌株生产 R-3HB

Fig. 7 Screened strains to produce R-3HB

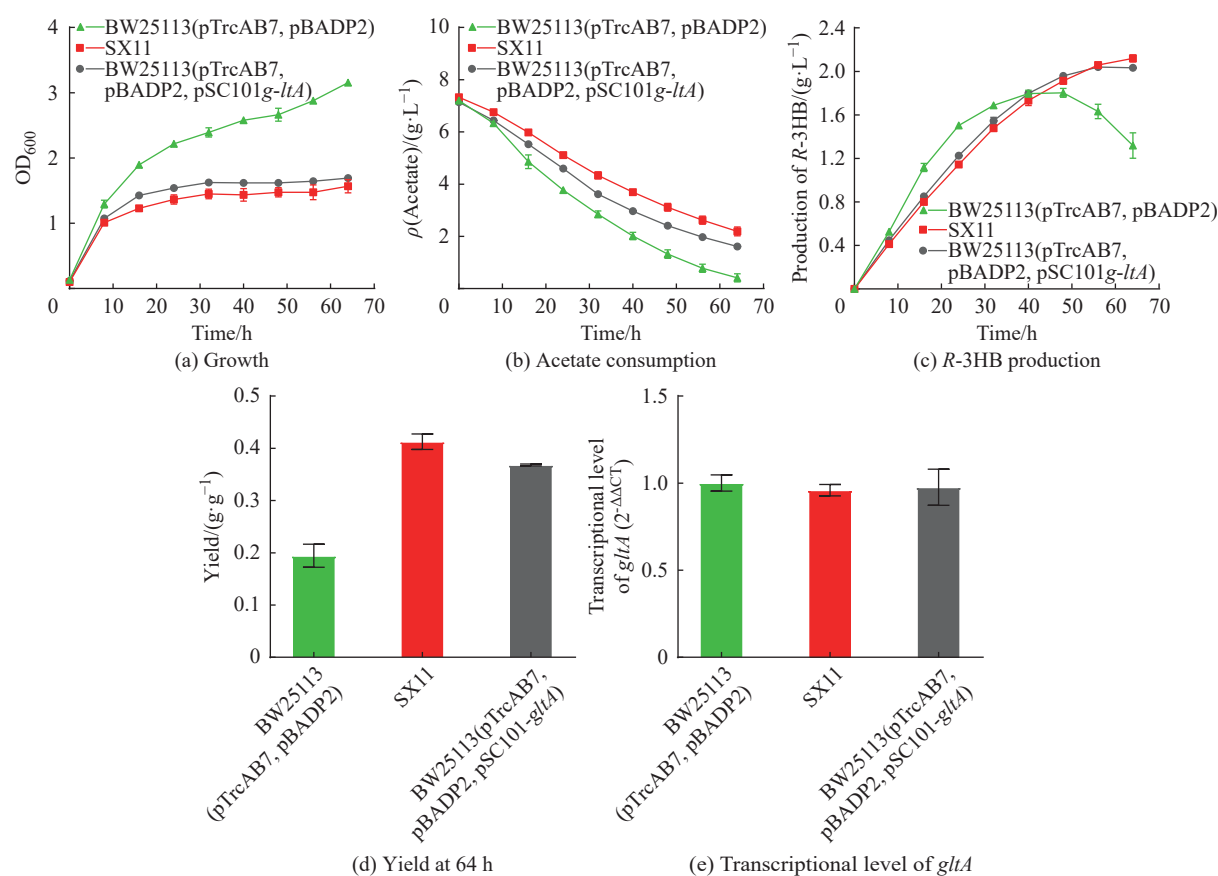


图8 CRISPRi 质粒回补验证的菌株生产 R-3HB

Fig. 8 Strains with replenishment CRISPRi plasmid to produce R-3HB

生长情况略有改善,最高 OD_{600} 从 1.57 提高到 1.69,这可能是由于去除了荧光检测系统的代谢负担。此外, BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 在 64 h 时 R-3HB 的得率为 0.37 g/g, 为 SX11 的 90.2%, 得率略微下降的原因可能是由于更多乙酸被用于菌体生长导致,但其得率相较于原始菌株仍有 94.7% 的提升。如图 8(e) 所示, BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 和 SX11 的 *gltA* 转录水平基本一致,回补 CRISPRi 系统后菌株 BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 的 TCA 循环强度与 SX11 相近。此外,

虽然 4 个菌株间 *gltA* 转录水平差距不显著,但 BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 和 SX11 的 *gltA* 转录水平均低于野生菌株 BW25113(pTrcAB7, pBADP2),且高于 FP31(pTrcAB7, pBADP2)(图 1(f)),从侧面证实了将 *gltA* 的天然启动子替换为 J23100 系列启动子后, R-3HB 产量下降的原因是 *gltA* 转录强度不合适导致。SX11 菌株测得的 crRNA 序列相较于原始序列是双突变的,双突变的 crRNA 抑制 *gltA* 转录能力较低^[37],符合 SX11 菌株中 *gltA* 转录水平相较于野生型菌株略微下降的现象。总的来说,含有 *gltAcrRNA2**

的 CRISPRi 系统可以适度地调节 TCA 循环强度, 进而提高菌株的 R-3HB 产量和得率。

3 结束语

在以乙酸为底物时, TCA 循环是工程大肠杆菌合成 R-3HB 的主要竞争途径之一, 适度调节 TCA 循环强度能够提高 R-3HB 的产量和得率。本研究中首先通过将 *gltA* 的天然启动子替换为 J23100 系列启动子调节 TCA 循环强度, 但替换启动子后的菌株 R-3HB 的产量全部降低、仅部分菌株 R-3HB 得率提高。为了提高筛选 R-3HB 高产菌株的效率, 本文构建了一种能够在以乙酸为底物时筛选 R-3HB 高产菌株的高效筛选方法。该方法中相对荧光强度会与 R-3HB 的质量浓度呈正相关性。因此, 依靠该高效筛选系统, 可以根据相对荧光强度初步筛选出高产 R-3HB 的菌株。本文使用最多 64 种含有不同 crRNA 的 CRISPRi 质粒抑制 *gltA* 或 *icdA*, 从而调节 TCA 循环强度, 并结合高效筛选方法初步筛选出 5 个可能的 R-3HB 高产菌株 (SX13、SX39、SX10、SX11 和 SX30)。随后, 在摇瓶水平验证初筛菌株的生产性能。其中, SX11 表现最为优异, 能够生产 2.12 g/L 的 R-3HB, 相较于对照组提高 31.7%; 且该菌株 64 h 时得率为 0.41 g/g, 相较于对照组提升 115.8%。

为了证实含有 *gltAcrRNA2** 的 CRISPRi 系统是 SX11 的 R-3HB 产量和得率提高的主要原因, 将 pSC101-*gltA* 转入到 R-3HB 生产菌株 BW25113 (pTrcAB7, pBADP2), 得到菌株 BW25113 (pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*)。BW25113 (pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 的最大 R-3HB 产量为 2.04 g/L, 与 SX11 相差不大; 且 64 h 时得率为 0.37 g/g, 为 SX11 的 90.2%。虽然 BW25113 (pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) 的 R-3HB 的产量和得率略低于 SX11, 但相较于原始菌株 BW25113 (pTrcAB7, pBADP2) 仍分别提高了 13.3% 和 94.7%。该现象证实含有 *gltAcrRNA2** 的 CRISPRi 系统调节 TCA 循环强度是相应菌株 R-3HB 产量和得率提高的主要原因。总的来说, 本研究通过高效筛选和 CRISPRi 技术调节 TCA 循环强度, 成功提高了以乙酸为底物时工程菌株的 R-3HB 产量和得率。

参考文献:

[1] LIM H G, LEE J H, NOH M H, *et al.* Rediscovering acetate metabolism: Its potential sources and utilization for biobased transformation into value-added chemicals[J].

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(16): 3998-4006.

- [2] SAKIMOTO K K, WONG A B, YANG P. Self-photo-sensitization of nonphotosynthetic bacteria for solar-to-chemical production[J]. Science, 2016, 351(6268): 74-77.
- [3] STRAUB M, DEMLER M, WEUSTER-BOTZ D, *et al.* Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*[J]. Journal of Biotechnol, 2014, 178: 67-72.
- [4] 黄良德, 童张法, 金庸, 等. 低含水量乙酸废液分离过程的模拟与能耗-经济性分析 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2025, 51(4): 468-475.
- [5] HARAHAP B M, AHRING B K. Acetate production from syngas produced from lignocellulosic biomass materials along with gaseous fermentation of the syngas: A review[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 995.
- [6] ANDREIDES D, LOPEZ M A, ZABRANSKA J. Selective syngas fermentation to acetate under acidic and psychrophilic conditions using mixed anaerobic culture[J]. Biore-sour Technology, 2024, 394: 130235.
- [7] CHEN X, LI Z, ZHANG X, *et al.* Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(3): 591-604.
- [8] HU P, RISMANI-YAZDI H, STEPHANOPOULOS G. Anaerobic CO₂ fixation by the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica*[J]. AIChE Journal, 2013, 59(9): 3176-3183.
- [9] WANG Y Q, YU S J, ZHANG F, *et al.* Enhancement of acetate productivity in a thermophilic (55 °C) hollow-fiber membrane biofilm reactor with mixed culture syngas (H₂/CO₂) fermentation[J]. Applied Microbiology and Bio-technology, 2017, 101(6): 2619-2627.
- [10] LAI N, LUO Y, FEI P, *et al.* One stone two birds: Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from CO₂ and syngas-derived acetic acid in *Escherichia coli*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(3): 144-152.
- [11] ZHANG W, ZHANG H, SHANG Y, *et al.* High-yield biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from acetate in metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2025, 14(5): 1654-1666.
- [12] NOH M H, LIM H G, WOO S H, *et al.* Production of itaconic acid from acetate by engineering acid-tolerant *Escherichia coli* W[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(3): 729-738.
- [13] HUANG B, YANG H, FANG G, *et al.* Central pathway engineering for enhanced succinate biosynthesis from acetate in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(4): 943-954.
- [14] XU X, XIE M, ZHAO Q, *et al.* Microbial production of

- mevalonate by recombinant *Escherichia coli* using acetic acid as a carbon source[J]. *Bioengineered*, 2018, 9(1): 116-123.
- [15] YANG H, ZHANG C, LAI N, *et al.* Efficient isopropanol biosynthesis by engineered *Escherichia coli* using biologically produced acetate from syngas fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 296: 122337.
- [16] GU P, ZHAO S, NIU H, *et al.* Synthesis of isobutanol using acetate as sole carbon source in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 196.
- [17] MA Y, SHANG Y, STEPHANOPOULOS G. Engineering peroxisomal biosynthetic pathways for maximization of triterpene production in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(5): e2314798121.
- [18] ZHU J, LIU W, WANG M, *et al.* Poly-3-hydroxybutyrate production from acetate by recombinant *Pseudomonas stutzeri* with blocked L-leucine catabolism and enhanced growth in acetate[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1297431.
- [19] CHEN G Q, WU Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(5): 592-599.
- [20] SEEBACH D, CHOW H F, JACKSON R F W, *et al.* (+)-11, 11'-Di-O-methylelaioaphyllidene-preparation from elaiophyllin and total synthesis from (R)-3-hydroxybutyrate and (S)-malate[J]. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1986, 1986(7): 1281-1308.
- [21] TASAKI O, HIRAIDE A, SHIOZAKI T, *et al.* The dimer and trimer of 3-hydroxybutyrate oligomer as a precursor of ketone bodies for nutritional care[J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1999, 23(6): 321-325.
- [22] MCNALLY M A, HARTMAN A L. Ketone bodies in epilepsy[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2012, 121(1): 28-35.
- [23] SIMEONE T A, SIMEONE K A, RHO J M. Ketone bodies as anti-seizure agents[J]. *Neurochemical Research*, 2017, 42(7): 2011-2018.
- [24] WANG C, XU W, JIANG S, *et al.* β -Hydroxybutyrate facilitates postinfarction cardiac repair via targeting PHD2[J]. *Circulation Research*, 2025, 136(7): 704-718.
- [25] SHIPPY D C, WILHELM C, VIHARKUMAR P A, *et al.* β -Hydroxybutyrate inhibits inflammasome activation to attenuate Alzheimer's disease pathology[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 280.
- [26] CHEN J, GUO L, ZHANG Y, *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for bioproduction of (R)-3-hydroxybutyric acid through a three-pronged approach[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(30): 16848-16859.
- [27] ZHAO M, LI Y, WANG F, *et al.* A CRISPRi mediated self-inducible system for dynamic regulation of TCA cycle and improvement of itaconic acid production in *Escherichia coli*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(3): 982-968.
- [28] LÖBS A K, SCHWARTZ C, THORWALL S, *et al.* Highly multiplexed CRISPRi repression of respiratory functions enhances mitochondrial localized ethyl acetate biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2647-2655.
- [29] FEI P, LUO Y, LAI N, *et al.* Biosynthesis of (R)-3-hydroxybutyric acid from syngas-derived acetate in engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 336: 125323.
- [30] FEI P, ZHANG W, SHANG Y, *et al.* Carbon-negative bioproduction of short-chain carboxylic acids (SCCAs) from syngas via the sequential two-stage bioprocess by *Moorella thermoacetica* and metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 416: 131714.
- [31] TIAN T, KANG J W, KANG A, *et al.* Redirecting metabolic flux via combinatorial multiplex crispr-mediated repression for isopentenol production in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 391-402.
- [32] XU S, ZHANG L, ZHOU S, *et al.* Biosensor-based multi-gene pathway optimization for enhancing the production of glycolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e0011321.
- [33] XU J Z, WU Z H, GAO S J, *et al.* Rational modification of tricarboxylic acid cycle for improving L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 105.
- [34] 邓通, 周海胜, 吴坚平, 等. 基于分子伴侣策略提高NADPH依赖型醇脱氢酶的异源可溶性表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(8): 24-32.
- [35] RADDE N, MORTENSEN G A, BHAT D, *et al.* Measuring the burden of hundreds of BioBricks defines an evolutionary limit on constructability in synthetic biology[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 6242.
- [36] SOLOMON K V, MOON T S, MA B, *et al.* Tuning primary metabolism for heterologous pathway productivity[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(3): 126-135.
- [37] HANKO E K R, MINTON N P, MALYS N. Characterisation of a 3-hydroxypropionic acid-inducible system from *Pseudomonas putida* for orthogonal gene expression control in *Escherichia coli* and *Cupriavidus necator*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1724.
- [38] WANG J, LI C, JIANG T, *et al.* Biosensor-assisted titratable CRISPRi high-throughput (BATCH) screening for over-production phenotypes[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 75: 58-67.

Adjusting the TCA Cycle for Promoting the Production of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid from Acetate in *Escherichia coli*

FEI Peng¹, SUN Junru¹, LUO Yuanchan¹, WU Hui^{1,2}

(1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. MOE Key Laboratory of Bio-Intelligent Manufacturing, School of Bioengineering,
Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract: Acetate is a common non-carbohydrate carbon source with the advantages of low cost and abundant supply. When engineered *Escherichia coli* is used to synthesize (*R*)-3-hydroxybutyric acid (*R*-3HB) with acetate as the sole carbon source, the TCA cycle acts as the major competitive metabolic pathway. Appropriately regulating the TCA cycle is therefore an effective strategy to improve the titer and yield of *R*-3HB. In this study, an efficient screening method was established, which could reflect the relative abundance of *R*-3HB via fluorescence intensity. A CRISPRi library containing random crRNA sequences was further applied to inhibit the TCA cycle at varying intensities. Combining the efficient screening method with the CRISPRi system, five candidate strains with potential high *R*-3HB production capacity were obtained and subsequently verified by shake-flask fermentation. Among them, strain SX11 produced 2.12 g/L *R*-3HB, representing a 31.7% increase compared with the control strain. At 64 h of fermentation, the yield of *R*-3HB in SX11 reached 0.41 g/g, which was 115.8% higher than that of the control group. Based on the crRNA sequence identified from strain SX11, a corresponding CRISPRi plasmid was constructed for validation. The recombinant strain BW25113(pTrcAB7, pBADP2, pSC101-*gltA*) achieved an *R*-3HB titer of 2.04 g/L and a yield of 0.37 g/g, which were 13.3% and 94.7% higher than those of the control, respectively. These results confirm that the CRISPRi system carrying *gltAcrRNA2** can effectively modulate the TCA cycle, thereby enhancing *R*-3HB titer and yield from acetate. This work provides a novel strategy for improving the production of acetyl-CoA-derived biochemicals.

Key words: *Escherichia coli*; acetate; (*R*)-3-hydroxybutyric acid; efficient screening; CRISPRi

(责任编辑: 张欣)