

# 大肠杆菌琥珀酸和乙酸合成途径的删除及其重组菌株的D-乳酸发酵

周丽<sup>1</sup>, 田康明<sup>1</sup>, 左志锐<sup>1</sup>, 陈献忠<sup>1</sup>, 石贵阳<sup>1</sup>, Suren Singh<sup>2</sup>, 王正祥<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 江南大学生物工程学院 生物资源与生物能源研究中心 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

<sup>2</sup> Department of Biotechnology and Food Technology, Durban University of Technology, Durban, South Africa

**摘要:** 菌株 CICIM B0013-030 (B0013, *ack-pta*, *pps*, *pf1B*) 可积累 D-乳酸作为主要发酵产物, 然而副产物琥珀酸和乙酸的含量分别高达乳酸的 11.9% 和 7.1%。为构建副产物含量低的产 D-乳酸重组大肠杆菌菌株, 本研究删除了菌株 B0013-030 的琥珀酸 (*frdA*) 和乙酸 (*tdcDE*) 合成途径, 并考察了重组菌株在摇瓶和发酵罐中经两阶段发酵 (好氧生长菌体和厌氧发酵产酸) 利用葡萄糖发酵 D-乳酸的性能。结果表明, 分别构建含有 *frdA::difGm* 和 *tdcDE::difGm* 突变盒的重组质粒, 并利用 Red 重组系统将突变盒整合于染色体上的目的基因, 再利用 Xer 重组系统去除抗生素抗性基因, 依次获得了重组菌株 B0013-040B (B0013-030, *frdA*) 和 B0013-050B (B0013-040B, *tdcDE*)。摇瓶发酵结果表明, *frdA* 基因的删除使得菌株 B0013-040B 副产物琥珀酸的含量降低了 80.8%; 在 7 L 发酵罐中进行乳酸发酵, 菌株 B0013-040B 的 D-乳酸产量达 114.5 g/L, 光学纯度大于 99.9%, 但仍积累 1.0 g/L 琥珀酸和 5.4 g/L 乙酸。进一步删除了 *tdcD* 和 *tdcE* 基因的菌株 B0013-050B, 在 7 L 发酵罐中生产 111.9 g/L D-乳酸, 乙酸和琥珀酸的合成量分别降低为 0.4 g/L, 其他副产物含量也维持较低水平, 表明该菌株具有较优良的 D-乳酸发酵性能。

**关键词:** D-乳酸, 大肠杆菌, 琥珀酸, 乙酸

## Elimination of succinate and acetate synthesis in recombinant *Escherichia coli* for D-lactate production

Li Zhou<sup>1</sup>, Kangming Tian<sup>1</sup>, Zhirui Zuo<sup>1</sup>, Xianzhong Chen<sup>1</sup>, Guiyang Shi<sup>1</sup>, Suren Singh<sup>2</sup>, and Zhengxiang Wang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Center of Bioresource & Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

<sup>2</sup> Department of Biotechnology and Food Technology, Durban University of Technology, Durban, South Africa

**Abstract:** When *Escherichia coli* CICIM B0013-030 (B0013, *ack-pta*, *pps*, *pf1B*) was used for D-lactate production, succinate and acetate were the main byproducts (as much as 11.9 and 7.1% the amount of lactate respectively). In order to decrease the

**Received:** May 9, 2010; **Accepted:** August 11, 2010

**Supported by:** Sino-South Africa Cooperation Program (No. 2009DFA31300).

**Corresponding author:** Zhengxiang Wang. Tel: +86-510-85918121; E-mail: zxwang@jiangnan.edu.cn

中非国际合作重点项目 (No. 2009DFA31300) 资助。

byproduct levels, we inactivated succinate and acetate synthesis in B0013-030. Two recombinant plasmids containing mutation cassettes of *frdA::difGm* and *tdcDE::difGm* respectively were constructed first. The mutation cassettes were used to delete the target genes on the chromosomal by Red recombination. Subsequently, the antibiotic resistance gene was excised from the chromosomal by Xer recombination. Thereby, mutants B0013-040B (B0013-030, *frdA*) and B0013-050B (B0013-040B, *tdcDE*) were produced. D-lactate producing abilities of the engineered strains were tested both in shake flasks and in bioreactors using two-phase fermentation (aerobic growth and anaerobic fermentation) with glucose as the sole carbon source. When fermentation was carried out in shake flasks, inactivation of *frdA* in B0013-030 to produce B0013-040B reduced succinate accumulation by 80.8%. When tested in a 7-liter bioreactor, B0013-040B accumulated 114.5 g/L D-lactate of over 99.9% optical purity. However, 1.0 g/L succinate and 5.4 g/L acetate still remained in the broth. Further inactivation of *tdcD* and *tdcE* genes in B0013-040B to produce B0013-050B decreased acetate and succinate accumulation to 0.4 g/L and 0.4 g/L respectively, and lactate titer was as much as 111.9 g/L (tested in the 7-liter bioreactor). In light of the lower byproduct levels and high lactate production, strain B0013-050B may prove useful for D-lactate production.

**Keywords:** D-lactate, *Escherichia coli*, succinate, acetate

乳酸是世界上公认的三大有机酸之一，乳酸及其衍生物在酿造、食品、农业、医药、化工、皮革、烟草、印染、纺织等行业中用途广泛。乳酸异构体之一——D-乳酸是一种重要的手性中间体，同时也是合成生物可降解聚乳酸塑料的原料之一，其添加量对聚乳酸产品的机械强度、热稳定性等影响很大。随着人们环保意识的提升，聚乳酸高分子材料研究活跃，乳酸成为一个极具潜力的化学品，并有望成为继柠檬酸之后的又一大宗发酵产品。然而，外消旋型及低光学纯度、低化学纯度的乳酸在很多领域的应用受到限制，人们期望获得以高产量、高底物转化率、高生产强度生产高化学纯度和光学纯度 D-乳酸的方法。

大肠杆菌 *Escherichia coli* 可发酵产生高光学纯度的 D-乳酸，且生长速度快、营养需求简单。与乳酸细菌相比，重组大肠杆菌作为乳酸生产菌株的优越之处在于其转化率常常可超过 90%<sup>[1]</sup>。作为基因操作工具菌，*E. coli* 遗传背景清楚，易于进行基因操作，尤其是近年来大肠杆菌基因敲除技术的快速发展<sup>[2]</sup>，使得应用代谢工程策略在大肠杆菌中积累乳酸更易行。现有研究表明，具有 *pta* 和 *ppc* 基因突变的菌株 JP203 在有氧条件下生长到 10 g/L 干重菌体 (DWC)，再厌氧发酵，产生 62 g/L D-乳酸，转化率达 0.9 g/g，体积生产速度达 1.0 g/(L·h)<sup>[3]</sup>。日本研究者<sup>[4]</sup>发现 *E. coli* 的 *pflA* 或 *pflB* 基因突变株，在微

好氧条件下可以由葡萄糖生产大量的 D-乳酸。进一步构建 *pykF*、*ppc*、*pflA*、*pta* 和 *adhE* 单基因删除突变菌株，表明 *pta*、*ppc* 基因突变也能显著提高菌株 D-乳酸的产量<sup>[5]</sup>。Zhu 等<sup>[1]</sup>删除了 *E. coli* YYC202 (具有 *aceEF*、*pfl*、*poxB*、*pps* 基因突变) 菌株的 *frdABCD* 基因，获得菌株 ALS974，以乙酸和葡萄糖为底物生产了 138 g/L D-乳酸，转化率为 97%，生产强度为 6.3 g/(L·h)，并可以控制琥珀酸杂酸含量在 3 g/L (表 3)。菌株 TG114 能够合成 99.9% 以上光学纯度的 D-乳酸，该菌株在含有 1 mmol/L 甜菜碱的无机盐培养基中能将 12% (W/V) 葡萄糖转化为 118 g/L 乳酸，转化率达 98%<sup>[6]</sup> (表 3)。

同时，我们注意到，菌株 ALS974 虽已具有良好的生产性能，但需要以乙酸作为发酵原料，势必增加了生产成本。菌株 TG114 需要添加渗透压保护剂，培养条件要求较高。此外，在产酸阶段需通入氮气来控制绝对厌氧环境，也使得工艺条件复杂，生产成本低。针对以上问题，本中心以一株生长快速的野生型 *E. coli* CICIM B0013 作为代谢途径改造的出发菌株，该菌株是本中心 (<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn/>) 前期研究中筛选得到的<sup>[7]</sup>。在本研究前期工作中以 B0013 为出发菌株构建了具有 *ackA-pta*、*pps* 和 *pflB* 基因 (以葡萄糖为底物发酵乳酸的主要代谢反应见图 1) 突变的菌株 B0013-030。本研究在 B0013-030 的基础上删除了其琥珀酸合成

途径 (*frdA* 基因) 获得菌株 B0013-040B, 进而又删除了乙酸合成途径 (*tdcD* 和 *tdcE* 基因) 获得菌株 B0013-050B。经两阶段乳酸发酵摇瓶实验, 对比了野生型菌株 B0013 与其突变株 B0013-030、B0013-040B 和 B0013-050B 在无机盐培养基中, 以葡萄糖为唯一碳源, 生产 D-乳酸的性能。并进一步将菌株 B0013-040B 和 B0013-050B 进行发酵罐发酵实验, 考察它们的 D-乳酸发酵性能。在发酵过程不添加特殊底物, 厌氧阶段不需以氮气、氢气等惰性气体控制厌氧环境。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒与引物

菌株 *Escherichia coli* CICIM B0013 由本中心筛选、保藏 (<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn/>), 菌株 B0013-030 由本研究前期构建; 质粒 pKD46 (温度敏感型, 含有阿拉伯糖启动子调控的 *gam*、*bet* 和 *exo*

基因,  $\text{Amp}^r$ ) 购于 CGSC<sup>[2]</sup>, pSK-*EcdifGm* (含有两边带有 *dif* 位点<sup>[8]</sup>的庆大霉素抗性基因、 $\text{Amp}^r$ 、 $\text{Gm}^r$ ) 由本研究前期构建。本文所用菌株、质粒及引物序列见表 1。

pMD18-Tsimple、T4 DNA 聚合酶为 TaKaRa (大连) 公司产品, 各种限制性内切酶为 Fermentas 产品, *Taq* 酶、质粒提取、纯化和胶回收试剂盒为 Biodev 公司产品。

### 1.2 D-乳酸摇瓶发酵培养方法

一级种子的制备: 在 LB 平板上生长了 24 h 的单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中 (在 250 mL 三角瓶中), 37 °C、200 r/min 培养 10 h。

二级种子的制备: 离心收集一级种子菌体, 并以 0.1 g/L (菌体干重/培养基体积) 的接种量转接于含 5 g/L 葡萄糖的 50 mL 改良 M9 液体培养基中 (在 250 mL 三角瓶中), 37 °C、200 r/min 培养 10 h。

表 1 本研究中所使用的菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

	Relevant characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> strains		
CICIM B0013	Wild type	CICIM-CU
CICIM B0013-030	B0013, <i>ack-pta pps pflB</i>	CICIM-CU
CICIM B0013-040B	B0013-030, <i>frdA</i>	This study
CICIM B0013-050B	B0013-040B, <i>tdcDE</i>	This study
Plasmid		
pKD46	$\text{Ap}^r$ , $\gamma$ $\beta$ <i>exo</i> (red recombinase), temperature-conditional replicon	CGSC
pSKsym	$\text{Ap}^r$	[9]
pSK- <i>EcdifGm</i>	$\text{Ap}^r$ , $\text{Gm}^r$ , <i>dif-Gm-dif</i> cassette	CICIM-CU
pSKsym- <i>frdA'</i>	$\text{Ap}^r$ , <i>frdA'</i> fragment	This study
pSKsym- <i>frdA'::difGm</i>	$\text{Ap}^r$ , $\text{Gm}^r$ , <i>frdA1-dif-Gm-dif-frdA2</i> cassette	This study
T- <i>tdcDE'</i>	$\text{Ap}^r$ , <i>tdcDE'</i> fragment	This study
T- <i>tdcDE'::difGm</i>	$\text{Ap}^r$ , $\text{Gm}^r$ , <i>tdcD-dif-Gm-dif-tdcE</i> cassette	This study
Primers		
FrdA1	5'-CTTTCAAGCCGATCTTGCCATTG-3'	This study
FrdA2	5'-ACTCTTTACGTGCCATTGCGGAGT-3'	This study
FrdA3	5'-GGAGTTGCCGATGATGTACGGTT-3'	This study
TdCDE1	5'-TGACAGTGTGGCCTTAATTGGCC-3'	This study
TdcDE2	5'-TCAGAATCGACTGGGTAGGGACG-3'	This study
TdcDE3	5'-GAAGGTGCATTGAAGGCAATTGC-3'	This study

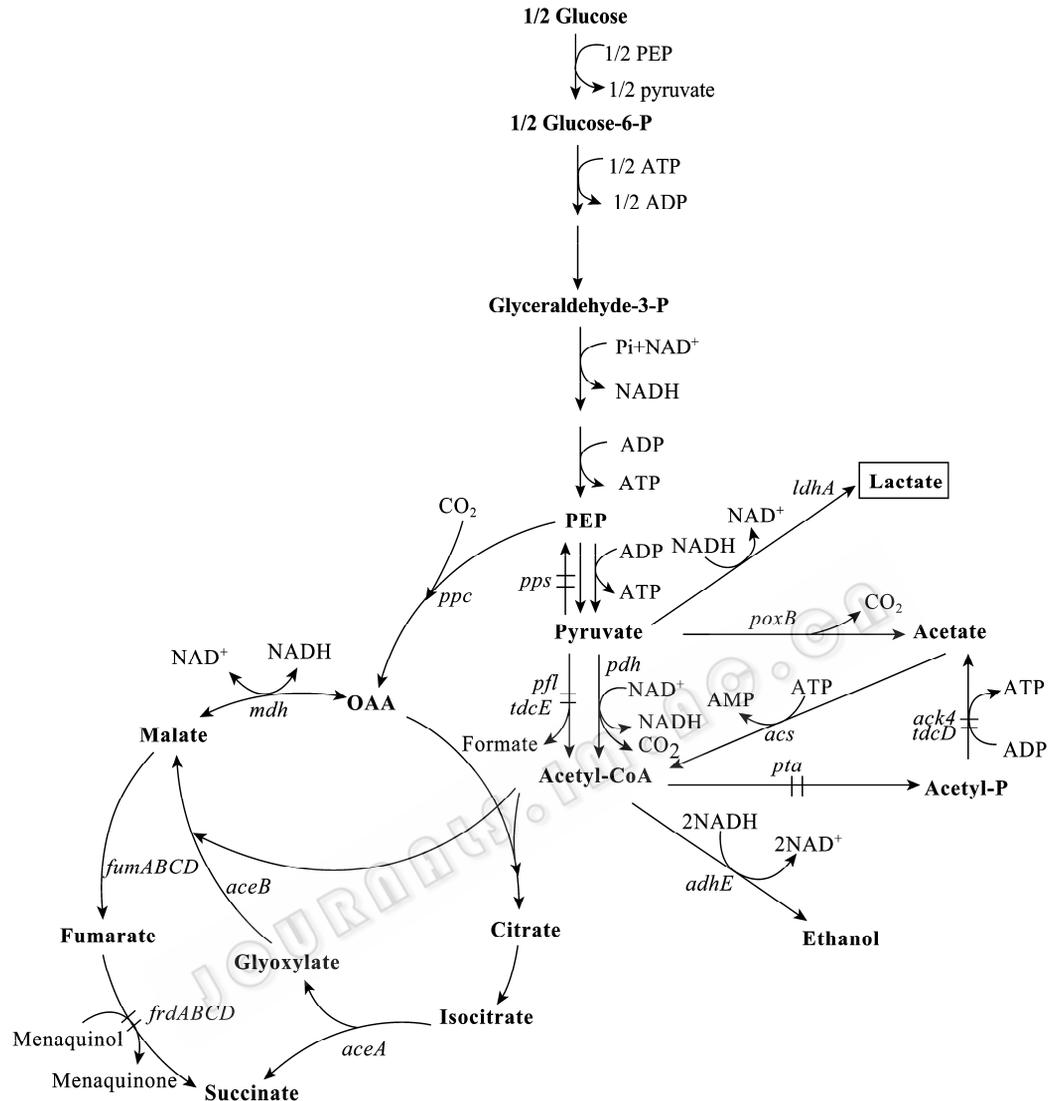


图1 大肠杆菌菌株发酵葡萄糖产乳酸过程中的主要代谢反应

Fig. 1 General reactions in lactate fermentation from glucose by *Escherichia coli* strains. *pps*: PEP synthase; *pfl*: pyruvate formate lyase; *tdcE*: pyruvate formate-lyase, homologous to *pflB*; *pdh*: pyruvate dehydrogenase complex; *ppc*: PEP carboxylase; *ldhA*: fermentative D-lactate dehydrogenase; *poxB*: pyruvate oxidase; *acs*: acetyl-CoA synthetase; *pta*: phosphotransacetylase; *ackA*: acetate kinase; *tdcD*: propionate kinase: homologous to *ackA*; *adhE*: alcohol dehydrogenase; *mdh*: malate dehydrogenase; *fumABCD*: fumarate hydratase; *frdABCD*: fumarate reductase; *aceA*: isocitrate lyase; *aceB*: malate synthase A.

摇瓶发酵：以 5% 接种量将二级种子转接于含有 5 g/L 葡萄糖的 50 mL 新鲜改良 M9 培养基中，37 °C、200 r/min 好氧培养菌株 12 h；厌氧发酵产酸阶段，补加 15 g/L 葡萄糖和 40 g/L CaCO<sub>3</sub>，37 °C 静置培养 36 h。

一级种子培养基为 LB 液体培养基，二级种子培养基和发酵培养基都为补加了一定浓度葡萄糖的改良 M9 液体培养基。改良 M9 培养基的基本成分为：

每升 M9 液体培养基<sup>[10]</sup>补加 1 mL 1 mol/L MgSO<sub>4</sub> 和 1 mL 微量元素母液。微量元素母液成分 (g/L)：2.400 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.300 CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.150 CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.300 ZnCl<sub>2</sub>, 0.300 Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.075 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.495 MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O。

### 1.3 D-乳酸发酵罐发酵培养方法

一级种子的制备：在 LB 平板上生长了 24 h 的单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中 (在 250 mL

三角瓶中), 37 °C、200 r/min 培养 10 h。

二级种子的制备: 离心收集一级种子菌体, 并以 0.1 g/L (菌体干重/培养基体积) 的接种量转接于含 5 g/L 葡萄糖的 150 mL 改良 M9 液体培养基中 (在 500 mL 三角瓶中), 37 °C、200 r/min 培养 9 h。

发酵罐发酵: 将上述二级种子液转接于 7 L 发酵罐 (Bioflo110; New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ), 接种量为 0.062 g/L (菌体干重/培养基体积), 发酵培养基为改良 M9 培养基, 接种后发酵液总体积为 3 L, 初始葡萄糖浓度为 30 g/L。第一阶段为好氧菌体生长阶段, 初始空气通量为 3 L/min, 搅拌转速为 200 r/min, 将此时溶解氧浓度标定为 100%, 发酵过程中调节通气量直至 7 L/min, 并将搅拌转速与 DO 值关联来维持溶解氧浓度大于 30%; 用 NH<sub>4</sub>OH 和 10% (V/V) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 维持 pH 值为 7.0, 并控制发酵温度为 37 °C。当菌体浓度在 600 nm 的吸光度 (OD<sub>600</sub>) 达到 30 时, 即进入第二阶段, 厌氧发酵产酸阶段。在第二阶段中, 将通气量调零, 搅拌转速控制为 100 r/min, 用 250 g/L Ca(OH)<sub>2</sub> 悬浊液控制 pH 值为 7.0, 发酵温度控制为 37 °C, 并补加浓度为 600 g/L 的葡萄糖, 补加的葡萄糖干物质量为 140 g, 当发酵过程中残糖浓度降为 10 g/L 左右, 再次补加相同量的葡萄糖, 共补加 4 批次, 当所有 4 批补加的葡萄糖耗尽后即结束发酵。

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 菌体量测定方法

菌体密度采用浊度法间接测量, 通过 OD<sub>600</sub> 来表示, 并通过下列公式换算为菌体干重 (X):

$$X(\text{g/L})=0.382 \times \text{OD}_{600}。$$

### 1.4.2 葡萄糖测定方法

葡萄糖用 SBA-40C 葡萄糖生物传感仪 (山东省科学院生物研究所) 进行分析。

### 1.4.3 进行高效液相分析的发酵液样品预处理方法

用 5% (V/V) 样品体积的浓硫酸将发酵液样品酸化, 释放由 Ca(OH)<sub>2</sub> 中和的有机酸, 离心去除 CaSO<sub>4</sub> 沉淀后用等体积 100 g/L 三氯乙酸沉淀蛋白

质, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行高效液相产物分析。

### 1.4.4 有机酸测定方法

有机酸含量用高效液相色谱进行分析, 检测器为 UV (210 nm) 检测器, 色谱柱为 SH1011 (Shodex), 流动相为 0.01 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 50 °C。

### 1.4.5 乙醇测定方法

乙醇含量用高效液相色谱进行分析, 检测器为示差检测器, 色谱柱为 SH1011 (Shodex), 流动相为 0.01 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 50 °C。

### 1.4.6 乳酸光学纯度测定方法

乳酸光学纯度用高效液相色谱进行分析, 检测器为 UV (254 nm) 检测器, 色谱柱为 CLC-L 手性柱 (Advanced Separation Technologies Inc.), 流动相为 5 mmol/L CuSO<sub>4</sub>, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为室温。

## 2 结果

### 2.1 大肠杆菌 CICIM B0013-030 菌株 *frdA* 基因的删除

以 *FrdA1*、*FrdA2* 为引物, PCR 扩增大肠杆菌的 *frdA* 基因片段 (1.6 kb), PCR 产物克隆入质粒 pSKsym 的 *Sma* I 酶切位点中, 获得重组质粒 pSKsym-*frdA'*。该重组质粒用 *Pst* I 酶切 (去除 *frdA* 基因中部部分序列), 并用 T4 DNA 聚合酶使粘性末端平滑化, 再克隆入 *dif-Gm* 片段 (重组质粒 pSK-EcdifGm 用 *Sma* I 酶切, 胶回收 1.0 kb 大小片段, 即获得 *dif-Gm* 基因片段) 获得重组质粒 pSKsym-*frdA'*::*difGm*。质粒 pSKsym-*frdA'*::*difGm* 用 *EcoR* I 酶切, 并胶回收 1.3 kb *frdA'*::*difGm* 基因片段。以该片段为模板, 再次用引物 *FrdA1*、*FrdA2* PCR 扩增, 获得高浓度的 *frdA'*::*difGm* 突变盒基因片段, 经试剂盒纯化后电击转化含有辅助质粒 pKD46 并经 2 mmol/L L-阿拉伯糖诱导的目的菌株 B0013-030, 在庆大霉素抗性平板筛选具有 *frdA* 基因突变的转化子, 并用引物 *FrdA1*、*FrdA3* 菌落 PCR 验证, 转化

子 B0013-041B (B0013-030, *frdA::difGm*) 获得 1.8 kb 大小电泳图谱 (图 2)。该转化子进一步在无抗生素的 LB 液体培养基中传代培养, 使 *Gm* 基因两端的 *dif* 位点重组, 环化去除 *Gm* 基因, 并挑选庆大霉素抗性丢失的菌株用引物 *FrdA1*、*FrdA3* 菌落 PCR 扩增 *frdA* 突变基因进行验证, 转化子 B0013-040B (B0013-030, *frdA::dif*) 获得 0.8 kb 大小电泳图谱 (如图 2), 而原始菌株 B0013 PCR 产物电泳图谱大小为 2.1 kb (图 2), 即菌株 B0013-030 的 *frdA* 部分基因已被 *dif* 序列替换。

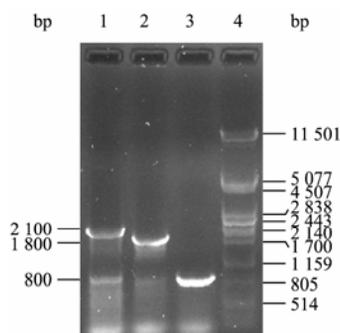


图 2 *frdA* 基因突变转化子的 PCR 鉴定电泳图

Fig. 2 Identification of *frdA* gene mutants by PCR. 1: B0013 PCR product; 2: B0013-041B PCR product; 3: B0013-040B PCR product; 4:  $\lambda$  DNA/*Pst* I marker.

## 2.2 大肠杆菌 CICIM B0013-040B 菌株 *tdcDE* 基因的删除

以 *TdcDE1*、*TdcDE2* 为引物, PCR 扩大大肠杆菌的 *tdcDE* 基因片段 (2.8 kb), PCR 产物克隆入 pMD18-Tsimple 载体中, 获得重组质粒 T-*tdcDE'*。该重组质粒用 *Hind* III 酶切 (去除 *tdcDE* 基因中部分序列), 并补平粘性末端, 克隆入 *dif-Gm* 片段获得重组质粒 T-*tdcDE'::difGm*。质粒 T-*tdcDE'::difGm* 用引物 *TdcDE1*、*TdcDE2* PCR 扩增, 并胶回收 1.5 kb *tdcDE'::difGm* 基因片段。将 *tdcDE'::difGm* 突变盒基因片段电击转化含有辅助质粒 pKD46 并经 L-阿拉伯糖诱导的目的菌株 B0013-040B, 在庆大霉素抗性平板筛选具有 *tdcDE* 基因突变的转化子, 并用引物 *TdcDE3*、*TdcDE2* 菌落 PCR 验证, 转化子 B0013-051B (B0013-040B, *tdcDE::difGm*) 获得 1.5 kb 大小

电泳图谱 (图 3)。该转化子进一步在无抗生素的 LB 液体培养基中传代培养, 去除 *Gm* 基因, 并挑选庆大霉素抗性丢失的菌株用引物 *TdcDE3*、*TdcDE2* 菌落 PCR 进行验证, 转化子 B0013-050B (B0013-040B, *tdcDE::dif*) 获得 0.6 kb 大小电泳图谱 (图 3), 而原始菌株 B0013 PCR 产物电泳图谱大小为 2.9 kb (图 3), 即菌株 B0013-030 的 *tdcDE* 部分基因已被 *dif* 序列替换。

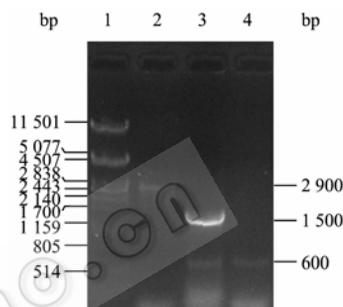


图 3 *tdcDE* 基因突变转化子的 PCR 鉴定电泳图

Fig. 3 Identification of *tdcDE* gene mutants by PCR. 1:  $\lambda$  DNA/*Pst* I marker; 2: B0013 PCR product; 3: B0013-051B PCR product; 4: B0013-050B PCR product.

## 2.3 D-乳酸摇瓶发酵实验

菌株 B0013、B0013-030、B0013-040B 和 B0013-050B 经两阶段摇瓶发酵实验, 各产物含量和乳酸转化率如表 2 所示。野生型菌株 B0013 经两阶段摇瓶发酵实验, 获得 9.6 g/L D-乳酸, 乙酸和琥珀酸是主要的副产物, 此外还有甲酸、丙酮酸和乙醇积累, 由于这些副产物的大量合成, 厌氧阶段乳酸转化率仅为 51.0% (厌氧阶段乳酸转化率=厌氧阶段乳酸产量/厌氧阶段葡萄糖消耗量, 表 2)。菌株 B0013-030 丙酮酸积累量因其分解代谢支路的受阻而有所增加, 乙酸产量显著降低了 63.5%, 不形成甲酸, 副产物合成量的减少为乳酸的合成节约了碳源, D-乳酸产量比出发菌株提高了 31.9%, 厌氧阶段乳酸转化率因而增加了 45.1% (表 2)。然而菌株 B0013-030 所合成的琥珀酸副产物含量仍高达乳酸含量的 11.9%, 本文在菌株 B0013-030 中删除了琥珀酸合成途径 (*frdA* 基因), 使得琥珀酸含量显著降低了 80.8%,

D-乳酸产量进一步增加了 12.2%，转化率升高了 16.5% (表 2)。为了进一步降低菌株 B0013-040B 的乙酸含量，我们一次性删除了其 *tdcD* 和 *tdcE* 基因，获得菌株 B0013-050B。*tdcDE* 基因的删除将乙酸的含量降低了 23.8%，而对其他产物的含量无显著影响 (表 2)。在摇瓶发酵实验中各菌株乙醇的合成量很少，且无显著差异 (表 2)。

#### 2.4 菌株 CICIM B0013-040B 发酵罐发酵 D-乳酸性能

经两阶段发酵罐发酵实验，菌株 B0013-040B 好氧生长约 9.5 h， $OD_{600}$  达到 30，厌氧发酵阶段仅耗时 26 h (图 4A)。

好氧菌体生长阶段即积累了 5.6 g/L 的乳酸和 8.8 g/L 的乙酸，进入厌氧发酵阶段后快速产生乳酸 (图 4A)，发酵结束时发酵液中葡萄糖耗尽，乳酸含量高达 114.5 g/L。在厌氧阶段初期副产物乙酸继续产生，并在发酵过程中逐渐被消耗，发酵结束时乙

酸含量达 5.4 g/L，成为发酵液中的主要副产物。其他副产物如琥珀酸、丙酮酸和乙醇的含量在整个发酵过程中都较低，发酵液中不能检测出甲酸，如图 4A 和表 3。此外，菌株 B0013-040B 厌氧阶段葡萄糖对乳酸的转化率为 83.0%，乳酸单位体积生产速率达 4.6 g/(L·h) (厌氧阶段乳酸体积生产速率=厌氧阶段乳酸产量/发酵液体积/厌氧发酵时间，表 3)。

#### 2.5 菌株 CICIM B0013-050B 发酵罐发酵 D-乳酸性能

在两阶段发酵罐发酵实验中，菌株 B0013-050B 的好氧生长速度受到 *tdcDE* 基因突变的影响，好氧生长至  $OD_{600}$  值为 20 左右时，溶氧浓度突然上升，菌体生长速度开始变慢，同时对中和剂氨水的需求量增加，表明产酸速度开始变快，此时菌体微环境更类似于厌氧发酵，因此  $OD_{600}$  值达到 25.4 即人工将其转入厌氧发酵阶段。厌氧发酵阶段耗时 18 h (图 4B)，显著快于 B0013-040B。

表 2 各菌株两阶段摇瓶发酵 D-乳酸性能比较

Table 2 Comparison of *E. coli* strains for D-lactate production using shake flask fermentation<sup>a</sup>

Strains	Final concentration for indicated agent (g/L)						Lactate yield (g/g, %) <sup>b</sup>
	Lactate	Acetate	Succinate	Formate	Pyruvate	Ethanol	
B0013	9.6	2.6	1.1	1.0	0.2	0.4	51.0
B0013-030	12.7	0.9	1.5	–	0.5	0.3	74.0
B0013-040B	14.2	0.8	0.3	–	0.4	0.3	86.3
B0013-050B	14.2	0.6	0.3	–	0.3	0.3	83.9

<sup>a</sup> The values were averages of three fermentations; <sup>b</sup> Anaerobic lactate yield; – Not detected.

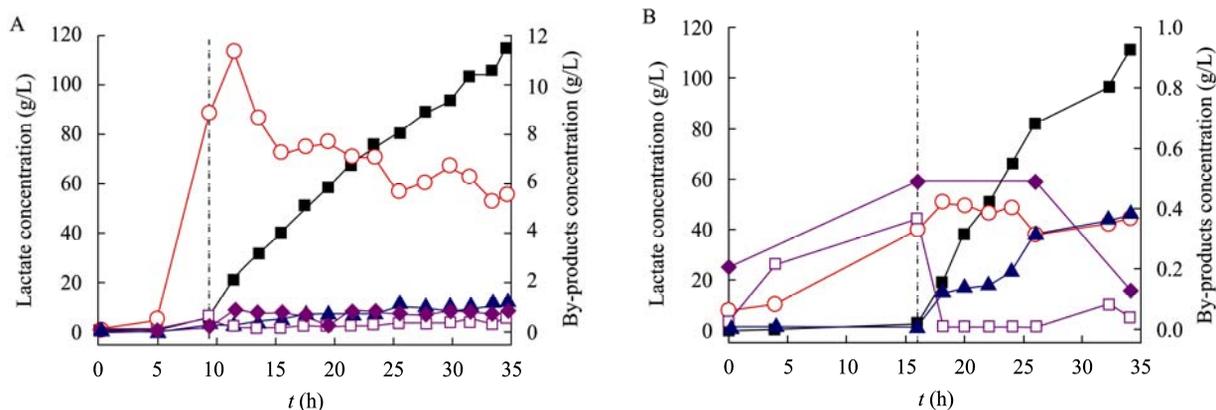


图 4 两阶段发酵罐发酵产 D-乳酸过程中各产物的变化

Fig. 4 Productions of organic compounds during the two-phase lactate fermentation. The figure shows concentrations of lactate (■), acetate (○), succinate (▲), pyruvate (□), and ethanol (◆). (A) Strain B0013-040B. (B) Strain B0013-050B.

表3 同型 D-乳酸发酵重组大肠杆菌比较

Table 3 Comparison of D-lactate producing *E. coli* strains

Organisms (relevant genotype)	Substrate; process conditions	Lactate (g/L)	Yield (g/g, %)	Fermentation time (h); productivity (g/(L·h))	Concentration of by-products (g/L)					Reference
					Acetate	Succinate	Formate	Pyruvate	Ethanol	
B0013-040B <sup>a</sup> ( <i>ack-pta</i> , <i>pps</i> , <i>pflB</i> , <i>frdA</i> )	Glucose; two-stage, fed-batch	114	82 <sup>b</sup>	34; 4.6 <sup>c</sup>	5.4	1.0	–	0.5	0.8	This study
B0013-050B <sup>a</sup> ( <i>ack-pta</i> , <i>pps</i> , <i>pflB</i> , <i>frdA</i> , <i>tdcDE</i> )	Glucose; two-stage, fed-batch	112	79 <sup>b</sup>	34; 6.2 <sup>c</sup>	0.4	0.4	–	<0.1	0.1	This study
SZ63 ( <i>focA</i> , <i>pflB</i> , <i>frd</i> , <i>adhE</i> , <i>ackA</i> )	50 g/L glucose; batch	48	98	168; 0.5	0.1	<0.1	<0.1	Not reported	<0.1	11
TG114 ( <i>pflB</i> , <i>frdBC</i> , <i>adhE</i> , <i>ackA</i> , <i>mgsA</i> )	120 g/L glucose; 1mmol/L betaine, batch	118	98	41; 2.9	<0.2	<0.1	Not reported	Not reported	<0.1	6
ALS974 ( <i>aceEF</i> , <i>pfl</i> , <i>poxB</i> , <i>pps</i> , <i>frdABCD</i> )	Glucose, acetate; two-stage, fed-batch	138	99 <sup>b</sup>	39; 6.3 <sup>c</sup>	–	2.3	Not reported	1.5	0.3	1

<sup>a</sup> The values were obtained using 7-liter bioreactor; <sup>b</sup> Anaerobic lactate yield; <sup>c</sup> Anaerobic lactate productivity; – Not detected.

好氧菌体生长阶段有少量的乳酸及副产物产生, 乙酸的合成量仅为 0.3 g/L。进入厌氧发酵阶段后快速积累乳酸 (图 4B), 厌氧发酵末期高浓度乳酸、Ca(OH)<sub>2</sub> 中存在的杂质以及有粘性的葡萄糖使得发酵液产生结晶, 因此提前结束发酵, 菌株 B0013-050B 发酵结束时发酵液中尚存在一定浓度的葡萄糖, 乳酸含量达 111.9 g/L, 厌氧阶段乳酸单位体积生产速率高达 6.2 g/(L·h) (表 3)。发酵液中无甲酸积累, 仅有少量的琥珀酸、丙酮酸和乙醇积累, 如表 3。通过抑制好氧阶段乙酸的生成量, 发酵结束时, 菌株 B0013-050B 仅积累 0.4 g/L 乙酸。

### 2.6 发酵液 D-乳酸光学纯度的测定

经高效液相分析, 发酵液中 D-乳酸与 L-乳酸含量之比大于 99.9%。

## 3 讨论

在厌氧条件下, 大肠杆菌糖酵解途径中产生的大量 NADH 不能通过电子传递链进行氧化, 须通过还原丙酮酸为还原末端产物 (如乳酸、乙醇、琥珀酸等) 来释放, 实现 NAD<sup>+</sup> 的回复利用并维持氧化还原平衡 (如图 1)。然而, 野生型大肠杆菌中大量还原末端产物的产生减少了用于生成乳酸的碳架, 并降低了乳酸产品的化学纯度, 增加了后续纯化成本。

菌株 B0013-030 中, 编码乙酸激酶 (*ackA*) 和磷酸转乙酰酶 (*pta*) 基因的删除大幅度降低了副产物

乙酸合成 (表 2); 编码丙酮酸甲酸裂解酶基因 (*pflB*) 和编码磷酸烯醇式丙酮酸合酶基因 (*pps*) 的删除阻断了与乳酸脱氢酶竞争利用丙酮酸的代谢途径 (图 1), 代谢流在丙酮酸代谢节点进行重新分配, 使得乳酸合成代谢流增加, 乳酸产量、转化率得到大幅度提高 (表 2)。

大肠杆菌厌氧条件下琥珀酸产生的主要途径为: 葡萄糖经 EMP 途径形成磷酸烯醇式丙酮酸, 再进一步代谢为草酰乙酸 (由磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化; *ppc* 基因编码)、苹果酸、富马酸, 并形成琥珀酸。*ppc* 基因删除能够完全去除琥珀酸的合成, 但突变菌株不能在以葡萄糖为唯一碳源的无机盐培养基上生长<sup>[1,11]</sup>。富马酸还原酶催化富马酸合成琥珀酸 (图 1), 由 A、B、C、D 四个亚基构成, *frdABCD* 基因编码。本研究只删除了 *frdA* 基因即使得该酶所催化的代谢途径阻断。所获得菌株 B0013-040B 的琥珀酸合成量显著降低了, 仅经乙醛酸循环等代谢途径合成少量的琥珀酸以维持其生长需求。

大肠杆菌以葡萄糖为底物厌氧发酵过程中, 主要经丙酮酸甲酸裂解酶途径合成乙酰-CoA, 进而经磷酸转乙酰酶途径合成乙酰磷酸, 乙酸主要是由乙酰磷酸经乙酸激酶合成的 (图 1)。虽然菌株 B0013-040B 已具有 *ackA*、*pta* 和 *pflB* 基因突变, 其乳酸发酵产物中, 乙酸含量仍高达 5.4 g/L。*tdcD* 基因编码丙酮酸激酶, 同时具有乙酸激酶的活性; 与

*tdcD* 基因相邻且同一操纵子的 *tdcE* 基因与 *pflB* 基因相似<sup>[12-13]</sup>, 编码  $\alpha$ -酮戊二酸裂解酶, 同时具有丙酮酸甲酸裂解酶的活性。在菌株 KJ091 中删除 *tdcDE* 基因使得乙酸含量降低了 50%<sup>[14]</sup>。本文删除 *tdcDE* 基因后, 所获得的菌株 B0013-050B 乙酸的含量比菌株 B0013-040B 降低了 93.2%。说明除 ACK、PTA 途径外, TDC 途径是乙酸合成的主要途径。

即使在氧供应充足的情况下, 如果糖消耗速率大于将还原力重新氧化的速率, 则细胞的代谢行为更类似于在厌氧条件下的, 这一现象被称为过速代谢。虽然这一机制尚不清楚, 较为合理的解释称: 由乙酰-CoA 合成乙酸不产生 NADH, 而乙酰-CoA 流经 TCA 循环会产生 8 个 NAD(P)H 和 2 个 FADH<sub>2</sub>, 所以合成乙酸可以被视为一个降低 NAD(P)H 积累的方式<sup>[15]</sup>。菌体在对数生长中后期快速生长, 耗糖速率高, 乙酸在这一时期大量产生 (如菌株 B0013-040B)。而菌株 B0013-050B 因具有 *tdcDE* 基因突变, 不能通过形成乙酸来降低 NAD(P)H 的合成, 促使细胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 的水平进一步增加, 菌体代谢因此类似于在厌氧条件下的, 生长速度开始变得缓慢, 溶解氧浓度逐渐上升。然而, 溶解氧浓度的上升相对于细胞内的变化是有滞后性的, 当人为将发酵阶段转变为厌氧阶段时, 细胞内的 NADH/NAD<sup>+</sup> 的水平已积累到很高, 以至于菌体快速将葡萄糖转化为乳酸, 来降低 NADH/NAD<sup>+</sup> 的水平。而 NADH 的产生与糖酵解是同步的, 高的产酸速率带来高的耗糖速率和 NADH 产生速率, 如此形成良性循环。因此, 菌株 B0013-050B 在厌氧阶段的乳酸生产速率远快于 B0013-040B 的。

与表 3 所列出的相关研究比较, 本文所构建的重组菌株 B0013-050B 未经过基于菌体生长速度的代谢进化<sup>[16]</sup>即具有较快的生长速度, 且利用无机盐培养基, 以葡萄糖为唯一碳源, 不需添加特殊底物和保护剂, 合成光学纯度的 D-乳酸, 发酵周期较短, 乳酸产量较高, 副产物含量能够维持在较低水平, 具有较优良的生产性能。

## REFERENCES

- [1] Zhu Y, Eiteman MA, DeWitt K, et al. Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(2): 456-464.
- [2] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [3] Chang DE, Jung HC, Rhee JS, et al. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1384-1389.
- [4] Zhu J, Shimizu K. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(3): 367-375.
- [5] Zhu JF, Shimizu K. Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. *Metab Eng*, 2005, 7(2): 104-115.
- [6] Grabar TB, Zhou S, Shanmugam KT, et al. Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(-)-lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(19): 1527-1535.
- [7] Sun JF, Zhuge J, Wang ZX. Screening and transformation of enteric bacteria utilizing xylose efficiently. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2003, 22(1): 21-24.  
孙金凤, 诸葛健, 王正祥. 有效利用木糖的肠道细菌的筛选及转化. *无锡轻工大学学报*, 2003, 22(1): 21-24.
- [8] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2520-2525.
- [9] Overhage J, Priefert H, Rabenhorst J, et al. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(6): 820-828.
- [10] Ma XJ, Shu YL. *Short Protocols in Molecular Biology*. 4th Ed. Beijing: Science Press, 2005: 2.  
马学军, 舒跃龙译. 精编分子生物学实验指南. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005: 2.
- [11] Zhou SD, Causey TB, Hasona A, et al. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by

- metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 399–407.
- [12] Sawers G, Watson G. A glycol radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. Mol Microbiol, 1998, 29(4): 945–954.
- [13] Hesslinger C, Fairhurst SA, Sawers G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. Mol Microbiol, 1998, 27(2): 477–492.
- [14] Jantama K, Zhang XL, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. Biotechnol Bioeng, 2008, 101(5): 881–893.
- [15] Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, et al. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5): 3653–3661.
- [16] Zhou S, Yomano LP, Shanmugam KT, et al. Fermentation of 10% (w/v) sugar to D(-)-lactate by engineered *Escherichia coli* B. Biotechnol Lett, 2005, 27(23/24): 1891–1896.



### 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如 DNA、ATP 等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。