

代谢工程大肠杆菌利用甘油高效合成 L-乳酸

田康明¹, 石贵阳², 路福平³, Suren Singh⁴, 王正祥³

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

3 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

4 德班理工大学 生物工程与食品技术学院应用科学系, 南非 德班 4001

田康明, 石贵阳, 路福平, 等. 代谢工程大肠杆菌利用甘油高效合成 L-乳酸. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1268-1277.

Tian KM, Shi GY, Lu FP, et al. High-efficiency L-lactate production from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1268-1277.

摘 要: 以甘油为碳源高效合成 L-乳酸有助于推进油脂水解产业和生物可降解材料制造业的共同发展。为此, 首先分别从凝结芽胞杆菌 *Bacillus coagulans* CICIM B1821 和大肠杆菌 *Escherichia coli* CICIM B0013 中克隆了 L-乳酸脱氢酶基因 *BcoaLDH* 和 D-乳酸脱氢酶 (*LdhA*) 的启动子片段 P_{ldhA} 。将两条 DNA 片段连接组成了表达盒 P_{ldhA} -*BcoaLDH*。然后将上述表达盒通过同源重组删除 FMN 为辅酶的 L-乳酸脱氢酶编码基因 *lldD* 的同时克隆入 *ldhA* 基因缺失菌株 *E. coli* CICIM B0013-080C (*ack-pta pps pflB dld poxB adhE frdA ldhA*) 的染色体上, 获得了 L-乳酸高产菌株 *E. coli* CICIM B0013-090B (B0013-080C, *lldD::P_{ldhA}-BcoaLDH*)。考察了菌株 CICIM B0013-090B 不同培养温度下代谢利用甘油和合成 L-乳酸的特征后, 建立并优化了一种新型 L-乳酸变温发酵工艺。在 7 L 发酵罐上, 发酵 27 h, 积累 L-乳酸 132.4 g/L, 产酸强度 4.90 g/(L·h), 甘油到 L-乳酸的得率为 93.7%, L-乳酸的光学纯度达到 99.95%。

关键词: L-乳酸, 甘油, L-乳酸脱氢酶, 途径工程, 大肠杆菌

Received: January 23, 2013; **Accepted:** March 14, 2013

Supported by: China-South Africa Native Cooperation Program (No. CS06-L11).

Corresponding author: Zhengxiang Wang. Tel: +86-22-60602949; E-mail: zx.wang@tust.edu.cn

国际科技合作项目 (No. CS06-L11) 资助。

网络出版时间: 2013-05-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130523.2025.003.html>

High-efficiency L-lactate production from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*

Kangming Tian¹, Guiyang Shi², Fuping Lu³, Suren Singh⁴, and Zhengxiang Wang³

¹ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

³ College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

⁴ Faculty of Applied Sciences, Department of Biotechnology & Food Technology, Durban University of Technology, P.O. Box 1334, Durban, 4001, South Africa

Abstract: High-efficient conversion of glycerol to L-lactate is beneficial for the development of both oil hydrolysis industry and biodegradable materials manufacturing industry. In order to construct an L-lactate producer, we first cloned a coding region of gene *Bcoa*LDH encoding an L-lactate dehydrogenase from *Bacillus coagulans* CICIM B1821 and the promoter sequence (P_{ldhA}) of the D-lactate dehydrogenase (*LdhA*) from *Escherichia coli* CICIM B0013. Then we assembled these two DNA fragments *in vitro* and yielded an expression cassette, P_{ldhA} -*Bcoa*LDH. Then, the cassette was chromosomally integrated into an *ldhA* mutant strain, *Escherichia coli* CICIM B0013-080C, by replacing *lldD* encoding an FMN-dependent L-lactate dehydrogenase. An L-lactate higher-producer strain, designated as *E. coli* B0013-090B, possessing genotype of $lldD::P_{ldhA}$ -*Bcoa*LDH, Δ *ack-pta* Δ *pps* Δ *pfkB* Δ *dld* Δ *poxB* Δ *adhE* Δ *frdA* and Δ *ldhA*, was generated. Under the optimal condition, 132.4 g/L L-lactate was accumulated by B0013-090B with the lactate productivity of 4.90 g/L·h and the yield of 93.7% in 27 h from glycerol. The optical purity of L-lactate in broth is above 99.95%.

Keywords: L-lactate, glycerol, L-lactate dehydrogenase, pathway engineering, *Escherichia coli*

在石油资源日趋紧张和全球气候变暖的大背景下, 油脂水解产业和生物可降解材料制造业的发展将极大地推动工业制造走向能源绿色化和材料环保化^[1-4]。合理有效地将油脂水解产业副产的甘油用于生物可降解聚乳酸材料前体 D-乳酸和 L-乳酸的发酵生产, 则是推动油脂水解产业和生物可降解材料制造业共同发展的理想选择之一^[1-3,5-6]。

高光学纯度 L-乳酸的发酵生产在以米根霉、重组酵母或重组大肠杆菌为生产菌株的生产体系中均已实现^[7-9]。其中, 重组大肠杆菌在甘油代谢利用方面和代谢途径改善方面的优势使其更加适合工业化规模下制造极高光学纯度的 L-乳酸^[3]。

作者所在的课题组前期致力于将甘油转化为极高光学纯度 D-乳酸的研究, 获得了可高效转化甘油为 D-乳酸的重组大肠杆菌及其配套的发酵工艺^[4,10-11]。在此基础上, 通过途径工程改造, 成功构建了可高效利用甘油合成极高光学纯度 L-乳酸的重组大肠杆菌, 研究并建立了配套的发酵工艺。以大肠杆菌为平台菌株实现甘油到极高光学纯度 D-乳酸或 L-乳酸的高效转化对于两种聚乳酸前体的规模化生产具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株、质粒和引物列表见表 1。相关菌株和质粒均保藏在江南大学中国高校工业微生物资

表 1 所用菌株、质粒和引物

Table 1 Strains, plasmids and primers in this study

	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi1, hsdR17</i> (rk-,mk+), <i>relA1, supE44, Δ(proAB, lac, F'(proAB, lacI^q, lacZΔM15, traD</i>	CICIM-CU
<i>E. coli</i> CICIM B0013	Wild type	CICIM-CU
<i>E. coli</i> CICIM B0013-070	B0013, <i>Δack-pta, Δpps, Δpf1B, Δdld, ΔpoxB, ΔadhE, ΔfrdA</i>	CICIM-CU
<i>E. coli</i> CICIM B0013-080C	B0013-070, <i>ΔldhA</i>	This study
<i>E. coli</i> CICIM B0013-090B	B0013-080C, <i>ΔlldD::P_{ldhA}-BcoaLDH-dif</i>	This study
<i>Bacillus coagulans</i> CICIM B1821	A facultative thermophile which is the source of L-lactate dehydrogenase gene <i>BcoaLDH</i>	CICIM-CU
Plasmids		
pSK	Vector used for subcloning, Ap ^r	CICIM-CU
pSK- <i>BcoaLDH</i>	Subcloning vector containing L-lactate dehydrogenase gene (<i>BcoaLDH</i>), Ap ^r	This study
pSK- <i>difGM</i>	Subcloning vector containing <i>difGM</i> gene, Gm ^r	CICIM-CU
pSK- <i>BcoaLDH-difGM</i>	Subcloning vector containing L-lactate dehydrogenase gene (<i>BcoaLDH</i>) and <i>difGM</i> gene, Ap ^r , Gm ^r	This study
pUC19	Vector used for subcloning, Ap ^r	CICIM-CU
pUC- <i>ldhA</i>	Subcloning vector containing D-lactate dehydrogenase gene (<i>ldhA</i>), Ap ^r	This study
pUC- <i>P_{ldhA}-BcoaLDH-difGM</i>	Subcloning vector containing the promoter of D-lactate dehydrogenase gene, L-lactate dehydrogenase gene (<i>BcoaLDH</i>) and <i>difGM</i> gene, Ap ^r , Gm ^r	This study
PMD 18T-simple	Vector used for subcloning, Ap ^r	Takara
pMD- <i>lldD::P_{ldhA}-BcoaLDH-difGM</i>	Subcloning vector containing part sequence of <i>lldD</i> gene harboring the promoter of D-lactate dehydrogenase gene, L-lactate dehydrogenase gene (<i>BcoaLDH</i>) and <i>difGM</i> gene, Ap ^r , Gm ^r	This study
Primers		
	Sequence and restriction endonuclease sites	This study
<i>BcoaLDH1</i>	5'-CCC <u>GGATCC</u> GGGCTTGCAAAACTGCTTTCATA-3' <i>Bam</i> H I	This study
<i>BcoaLDH2</i>	5'-GCC <u>GAAATC</u> CCCGGGCTTCCGGCAACACACAGAGA-3' <i>Eco</i> R I	This study
<i>ldhA1</i>	5'-GGGCAGCCCAGCGTCATCAG-3'	This study
<i>ldhA2</i>	5'-CTTGAATTCAAGCTTGCTGCCGGAAATCATCATTTTTT-3' <i>Eco</i> RI	This study
R <i>ldhA1</i>	5'-GGA <u>AGATCT</u> TCCGCGAGTTTCATAAGACTT-3' <i>Bgl</i> I II	This study
R <i>ldhA2</i>	5'-CGGAATTCCGAACGAAGTGGTTTA-3' <i>Eco</i> R I	This study
<i>lldD1</i>	5'-CCA <u>AGCTT</u> ATGATTATTTCCGCAGCCA-3' <i>Hind</i> III	This study
<i>lldD2</i>	5'-GCAGGCAACTCTTACCCAGCCC-3'	This study

Ap^r: Ampicillin resistance; Gm^r: Gentamycin resistance.

源和信息中心(CICIM-CU, <http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn>)。

1.2 培养基

LB 培养基^[4], 添加琼脂 2% 即为固体培养基。发酵培养基^[4]: M9 培养基添加 0.1% 的 MgSO_4 母液 (1 mol/L) 和 0.1% 的微量元素母液。M9 培养基基本组成包括 (每升): 15.11 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 0.5 g NaCl 。微量元素母液包括 (每升): 2.400 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.300 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.150 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.300 g ZnCl_2 , 0.300 g $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g H_3BO_3 , 0.495 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。LB 培养基和 M9 培养基采用 121 °C 蒸汽灭菌 20 min, 微量元素母液采用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌。

甘油添加量根据不同发酵方式进行确定。

1.3 重组大肠杆菌中 L-乳酸合成途径的构建

参照文献[12], 对来源于 *B. coagulans* CICIM B1821 的 L-乳酸脱氢酶结构基因进行克隆, 将所克隆的 L-乳酸脱氢酶克隆入大肠杆菌 D-乳酸脱氢酶编码基因的启动子下游。再将表达盒整合到大肠杆菌基因组的 *lldD* 基因中间 (图 1)。PCR 扩增采用 *Pfu* DNA 聚合酶、PCR 产物纯化采用博大泰克的 DNA 纯化试剂盒。限制性内切酶、DNA 片段的连接参考宝公司 (TaKaRa) 的产品说明书。质粒的分离参考 Qiagen 质粒分离试剂盒的产品说明书。遗传转化按照文献[12]进行, 基因整合与抗性筛选标志删除按照文献[13]进行。

1.4 发酵实验

种子平板培养采用 LB 固体培养基, 37 °C 静置培养过夜。

单菌落接种液体 LB 培养基。250 mL 三角瓶中分装 50 mL 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 用于菌体收集和接种发酵培养基。

1.4.1 不同温度下菌体生长性能

取上述菌悬液 1 mL, 常温无菌条件下离心收集菌体 (8 000 r/min, 5 min), 收集后的菌体用 M9 重悬, 接种到发酵培养基, 接种后初始 OD_{600} 为 0.05。发酵试验采用 250 mL 三角瓶中分装 50 mL 培养基, 接种时添加甘油至终浓度 5 g/L。接种后, 分别在 30 °C、34 °C、37 °C、40 °C、42 °C 和 45 °C 条件下 200 r/min 摇床培养。每小时测定菌体生长情况直至菌体生长进入稳定期。每个参数设置 3 个平行试验, 测定结果取平均值。

1.4.2 发酵产酸阶段菌体生长特征分析

采用上述菌体生长方式, 37 °C、200 r/min 好氧培养菌体 11 h (菌体处于对数生长期中后期), 获得高活性的菌体; 分别在 30 °C、34 °C、37 °C、40 °C、42 °C 和 45 °C 条件下 150 r/min 摇床培养。补加终浓度 50 g/L 的甘油和终浓度 75 g/L 的碳酸钙 (用于调节 pH), 继续发酵至 22 h。每 2 h 测定菌体量、甘油消耗量及乳酸浓度。每个参数设置 3 个平行试验, 测定结果取平均值。

1.4.3 发酵罐中乳酸发酵实验

种子培养方式: LB 平板 37 °C 静置培养过夜后, 接单菌落于 LB 液体培养基 200 r/min、37 °C 摇床过夜培养。收集菌体后, 用 M9 培养基重悬并接种发酵培养基。500 mL 三角瓶中分装 150 mL 发酵培养基, 37 °C 条件下 200 r/min 培养 10 h, 作为二级种子用于发酵罐接种, 接种量为 5%。

发酵过程控制: 7 L 搅拌式发酵罐, 初始装

液量 3 L, 罐体灭菌 (121 °C, 20 min)。甘油单独灭菌后分批补加, 控制补加后终浓度不高于 10%, 总添加量根据具体实验要求确定。发酵过程采用两阶段发酵法^[4], 好氧阶段发酵温度 37 °C, 充分供氧控制 DO 值不低于 30%, 采用氨水调节 pH 为 7.0。菌体量达到 OD_{600} 值约 30 即转入发酵产酸阶段。发酵产酸阶段采用发酵温度 42 °C, 低供氧方式, 维持恒定搅拌转速 600 r/min, 通风量维持 3 L/min。25% 的 $Ca(OH)_2$ 调节 pH 为 7.0。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体量的测定

吸取 0.5 mL 发酵液于具塞刻度试管中, 加 0.5 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸将发酵液中过量的 $CaCO_3$ 全部溶解, 去离子水定容到所需刻度。以水为空白, 于 600 nm 处测定 OD_{600} 值。1.0 OD_{600} 相当于 0.38 g/L 的细胞干重。

1.5.2 甘油的测定、总乳酸和副产物的测定

甘油浓度采用甘油试剂盒测定 (FG0100-1KT; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA)。

高压液相色谱法测定总乳酸发酵样品 5 mmol/L H_2SO_4 酸化处理后, 离心取上清, 经 10% 三氯乙酸沉淀, 再次离心, 上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用于高压液相分析。仪器: dionex p680, Shodex RSpak KC-811; 柱温: 50 °C; 流动相: 0.01 mol/L H_3PO_4 0.8 mL/min; 检测器: dionex UVD170U; 检测波长: 210 nm。

1.5.3 乳酸光学纯度的测定

高压液相色谱法测定乳酸的光学纯度。仪器: Dionex p680, Astec CLC-L; 柱温: 24 °C;

流动相: 5 mmol/L $CuSO_4$ 1 mL/min; 检测器: Dionex UVD170U; 检测波长: 254 nm。

1.5.4 乳酸脱氢酶活性的测定

菌体接种于 M9 培养基, 在 37 °C、200 r/min 培养 11 h。用 GEMED 细菌总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 用 GEMED 细菌乳酸脱氢酶 (LDH) 总活性酶动力比色法定量检测试剂盒, 测定 34 °C、37 °C 和 42 °C 条件下的 LDH 活力。LDH 酶活力单位 (U) 定义为: 在 25 °C、pH 7.5 条件下, 每分钟内转化 1 μmol 丙酮酸至乳酸所需的酶量。粗酶液中蛋白含量用 Bradford 比色法进行测定。乳酸脱氢酶比活性为粗酶液的乳酸脱氢酶酶活性与蛋白含量的比值, 单位为 U/ μg 。

2 结果与分析

2.1 L-乳酸高产菌的构建

2.1.1 *ldhA* 基因的删除

以大肠杆菌 B0013 染色体 DNA 为模板, *ldhA1* 和 *ldhA1* 为引物, 利用 PCR 扩增获得了乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*), 将此 PCR 产物克隆入 pUC19 的 *EcoR* I 位点中, 获得重组质粒 pUC-*ldhA*。用 *Pst* I 酶切去除其中的 400 bp 的片段并用 T4 DNA 多聚酶将粘性末端补平, 再与 *difGm* 片段连接, 获得重组质粒 pUC-*ldhA*::*Gmdif*。用 *EcoR* I 酶切该重组质粒, 获得乳酸脱氢酶的基因删除序列, *ldhA*'-*dif*-*Gm*-*dif*-*ldhA*, 即: *ldhA*::*Gmdif*。将此基因删除序列转化入 *E. coli* B0013-070。在选择性培养基上选择培养出转化子。再在非选择性培养基上传代, 筛选出选择性标记消失的菌株。提取其染色体 DNA, 用 PCR 验证目的基因突变。最终获得了 *ldhA* 基因突变的突变株 B0013-080C, 用于后续研究。

2.1.2 *Bcoa*LDH 基因的整合表达及 *lldD* 基因的删除

运用 PCR 技术扩增获得的 *Bcoa*LDH 基因片段克隆入 pBlueScript SK(-) 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点, 获得重组质粒 pSK-*Bcoa*LDH。然后将 *dif*Gm 片段克隆入重组质粒 pSK-*Bcoa*LDH 的 *Sma* I 位点。获得重组质粒 pSK-*Bcoa*LDH-*dif*Gm。

以 *E. coli* CICIM B0013 染色体 DNA 为模板, 扩增 (引物 *ldhA*1 和 *ldhA*2) 获得 *ldhA* 基因的全部启动子和部分结构区片段, 并将片段 *ldhA* 克隆入亚克隆载体 pUC19 的 *Sma* I 位点获得重组质粒 pUC-*ldhA*'。以重组质粒 pUC-*ldhA*' 为模板反向扩增 (引物 *RldhA*1 和 *RldhA*2) 获得线性 pUC-*ldhA*', 并与经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切获得的 *Bcoa*LDH-*dif*Gm 片段连接, 获得重组质粒 pUC-*P_{ldhA}*-*Bcoa*LDH-*dif*Gm。该重组质粒包含了 294 bp 的 *ldhA* 基因启动子序列片段和 170 bp 的 *Bcoa*LDH 基因的结构基因序列。

编码 FMN 为辅酶的 L-乳酸脱氢酶基因的结构基因 *lldD* 基因, 被选定为 *Bcoa*LDH 基因整合

在重组菌染色体上的目标基因。该过程可以同步实现 L-乳酸分解形成丙酮酸代谢途径的阻断和外源 L-乳酸合成途径的引入。首先通过 PCR 扩增 (引物 *lldD*1 和 *lldD*2) 获得 *lldD* 基因片段, 并将该片段克隆入亚克隆载体 pMD18T-simple 的 *Eco*R V 位点获得重组质粒 pMD-*lldD*。然后将 *P_{ldhA}*-*Bcoa*LDH-*dif*Gm 片段克隆入重组质粒 pMD-*lldD* 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点。获得重组质粒 pMD-*lldD*::*P_{ldhA}*-*Bcoa*LDH-*dif*Gm。纯化表达突变盒 *lldD*::*P_{ldhA}*-*Bcoa*LDH-*dif*Gm 片段, 电击转化其入菌株 B0013-080C, 筛选获得重组菌株 B0013-090B (B0013, Δ *ack-pta*, Δ *pps*, Δ *pf1B*, Δ *dld*, Δ *poxB*, Δ *adhE*, Δ *frdA*, Δ *ldhA*, Δ *lldD*::*P_{ldhA}*-*Bcoa*LDH-*dif*) (图 1), 再经过培养传代, 删除其中的抗生素选择性标记。

2.2 菌株 090B 生长特征

乳酸合成过程与菌体生长过程存在相互竞争的关系, 甘油作为碳源用于乳酸的发酵生产过程中这一矛盾尤为突出^[14]。构建 L-乳酸合成途径的过程中如何兼顾对 L-乳酸合成过程的阶段性调控是实现甘油高效转化为 L-乳酸关键。

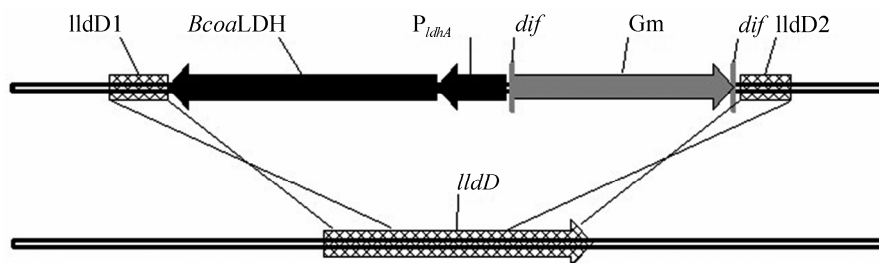


图 1 *ldhA* 启动子替换 *Bcoa*LDH 基因自身启动子并将其整合在大肠杆菌染色体上的 *lldD* 基因的部分序列

Fig. 1 Sketch map of *Bcoa*LDH gene expressed under the downstream of *ldhA* promoter. The genetic screening marker of *dif*Gm gene was cloned into the upstream of *ldhA* promoter. Then the mutant cassette was placed between the two homologous arms of *lldD* gene.

在引入了嗜热菌的 L-乳酸脱氢酶基因的同时组建了大肠杆菌原有 D-乳酸脱氢酶基因启动子调控下的 L-乳酸脱氢酶表达盒, 获得了重组菌 090B。首先在 30 °C~45 °C 条件下确认菌株 090B 的最适菌体生长温度, 结果如图 2A 所示。在 37 °C 下表现出最优的生长性能。因此选择 37 °C 培养温度为菌体生长的最适温度。

前期的研究显示, 菌株 090B 的亲本菌株 070 最适生长温度为 34 °C^[10]。这一改变的机理尚不清楚。可能的原因是, 在 D-乳酸脱氢酶合成途径被阻断的背景下, 37 °C 条件下嗜热菌来源 L-乳酸脱氢酶活力相对较低 (图 2B), 有助于减轻生长阶段 L-乳酸的合成对菌体生长所需丙酮酸的竞争。这方面的详细机理有待进一步研究。

2.3 发酵阶段适度提升发酵温度更利于 L-乳酸的合成

与甘油合成 D-乳酸的过程相似, 甘油为碳源合成 L-乳酸的发酵过程同样需要通入适量氧气用于保证甘油代谢过程的顺利进行^[4, 10]。氧气的存在必然会导致细胞在产酸阶段继续生长而

竞争用于合成 L-乳酸的丙酮酸。因此, 考察了提高产酸阶段发酵温度对 L-乳酸合成的影响。如图 3 所示, 42 °C 条件下, 菌体生长受到发酵温度提高的限制, 而 L-乳酸积累量和得率均在 42 °C 条件下获得了最高值。可见, 引入了嗜热菌的 L-乳酸脱氢酶后, 菌株 090B 在 42 °C 条件下表现出了最优的产酸性能。因此选择 42 °C 培养温度为发酵产酸阶段的最适温度。

此外, 对发酵液中乳酸的光学构型分析显示, 其 L-乳酸的光学纯度均高于 99.9%。可见, *ldhA* 基因的敲除有效阻断了 D-乳酸的合成途径。

2.4 变温工艺下重组菌合成 L-乳酸的效率得到显著提升

在 7 L 发酵罐中, 细胞生长阶段使用 37 °C 培养, 发酵产物形成阶段使用 42 °C 培养。如图 4 所示, 发酵 27 h, 积累 L-乳酸 132.4 g/L, 产酸强度 4.90 g/(L·h)。其 L-乳酸的光学纯度达到 99.95%。低供氧发酵产酸阶段甘油到乳酸的得率为 93.7%。成功实现了甘油到 L-乳酸的高效转化。

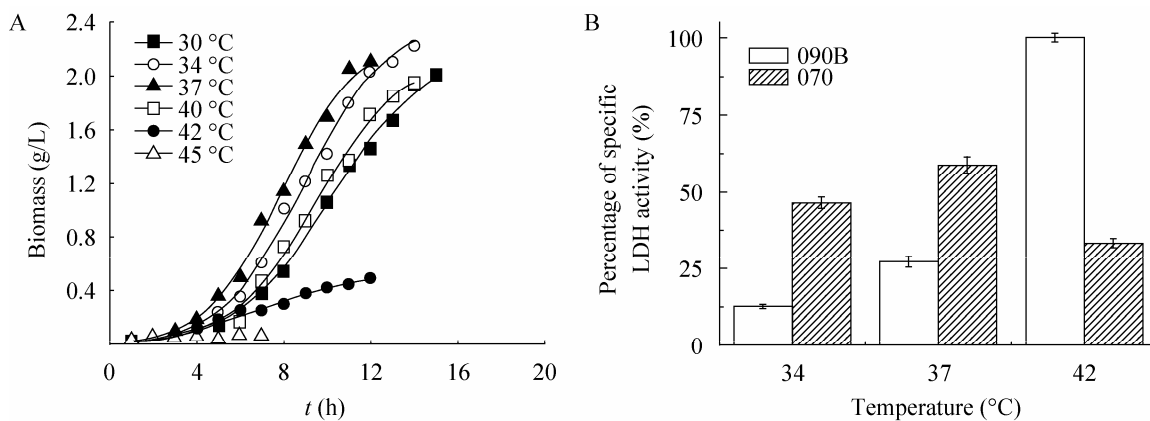


图 2 不同温度下 *E. coli* B0013-090B 的生长特征和乳酸脱氢酶活性

Fig. 2 Growth and L-LDH activity of B0013-090B under different temperatures. (A) Cell growth. (B) L-LDH activity.

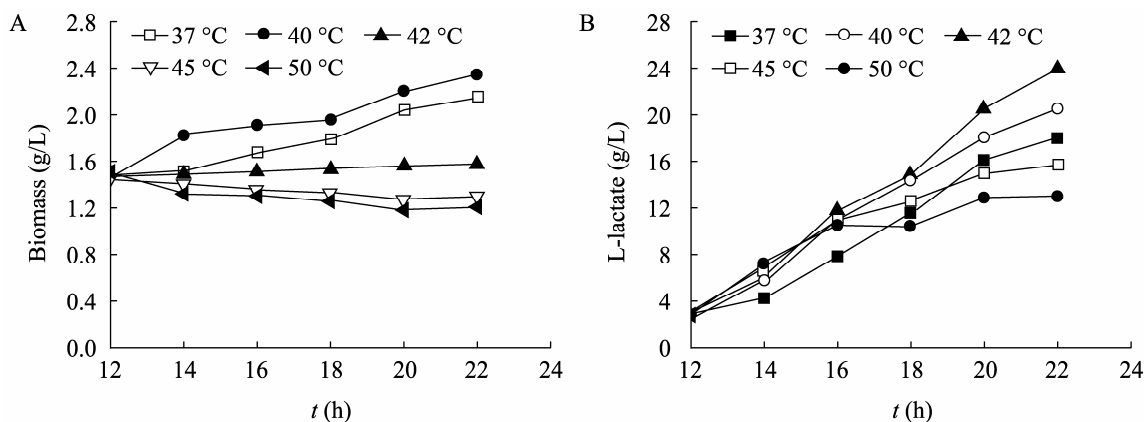


图3 发酵产酸阶段不同发酵温度下 *E. coli* B0013-090B 菌体量积累和乳酸生成

Fig. 3 Biomass accumulation and L-lactate production of *E. coli* B0013-090B during the fermentation phase under different temperature. (A) Cell growth. (B) L-lactate accumulation.

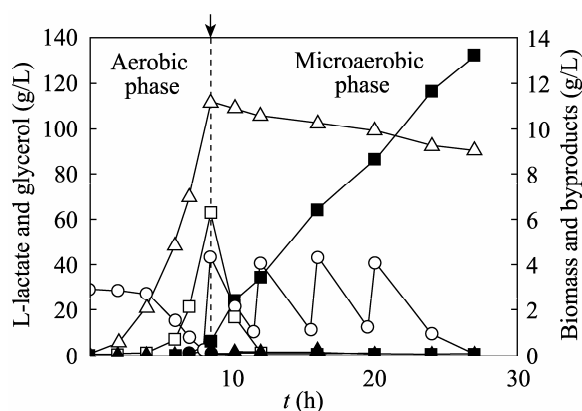


图4 变温工艺下重组菌在7 L发酵罐中的生长和产酸情况

Fig. 4 Cell growth and L-lactate production of *E. coli* B0013-090B using temperature-switched fermentation process. The arrow indicates the time when the culture was switched from the aerobic cultivation at 34 °C to the microaerobic production phase at 42 °C. ○: glycerol; ■: L-lactate; ●: acetate; ▲: succinate; □: pyruvate; △: cell mass.

在菌株 090B 中, 通过引入嗜热菌的 L-乳酸脱氢酶, 在细胞生长温度条件下, L-乳酸脱氢酶的活性处于较低水平 (图 2), 细胞生成过程因为 L-乳酸合成的减少而得到显著改善。

解决了细胞生长的问题后, 如何恢复或增强 L-乳酸的合成强度便成了产酸阶段的首要问题。在引入来源于嗜热微生物的 L-乳酸脱氢酶后, 发酵温度的提高可更好地让重组的 L-乳酸脱氢酶发挥作用 (更接近于其最适作用温度), 进而促进 L-乳酸的生物合成。另外由于 L-乳酸脱氢酶的转录和表达过程在细胞生长阶段后期便已经开始, 因此发酵温度升高后前期积累的丙酮酸也主要流向 L-乳酸的合成 (图 4)。

清华大学的刘德华教授研究团队首次报道了野生大肠杆菌利用甘油合成 D-乳酸的情况^[2]。美国 Rice 大学的 Mazumdar 等通过对大肠杆菌甘油代谢利用途径的增强和 D-乳酸合成竞争途径的阻断成功构建了利用甘油同型合成 D-乳酸的重组大肠杆菌^[15]。作者所在的课题组前期通过建立两阶段发酵工艺, 并引入温度开关控制策略, 实现了甘油到 D-乳酸的高效转化^[10]。

尽管多个 L-乳酸脱氢酶基因在大肠杆菌中成功表达, 但是相关菌株的 L-乳酸合成途径没有得到合理的改造^[5,16]。因此, 获得的相关菌株不

具备工业应用价值。在前期构建的 D-乳酸高产菌株的基础上,通过引入嗜热菌的 L-乳酸脱氢酶并采用发酵工业生产过程中温度调控这一主要控制因素,技巧性地实现了 L-乳酸生产菌种与发酵工艺控制间的协调与联动,实现了 L-乳酸在保证其最高光学纯度与化学纯度的前提下的高效合成。构建获得的 L-乳酸高产菌株 090B,在甘油代谢利用和乳酸合成方面均表现出了优异的性能,这主要归因于以下三点。其一,引入的 L-乳酸脱氢酶在正常的培养温度下酶活力较低,更有利于获得高活性的菌体。其二,菌株 090B 在细胞生长阶段不仅仅完成了高活性菌体的积累,丙酮酸的后期积累和 L-乳酸脱氢酶在生长阶段后期的表达都为产酸阶段的高效催化提供了动力储备,有助于发酵产酸阶段 L-乳酸脱氢酶活性的快速启动和乳酸的快速合成。其三,发酵温度提高后,菌体生长受到了有效限制。丙酮酸主要甚至全部流向 L-乳酸,保证了甘油到 L-乳酸的转化效率。

最近,美国 Rice 大学的 Mazumdar 等报道了在构建代谢利用甘油合成 L-乳酸的重组大肠杆菌研究所取得新的进展^[17]。他们一方面删除 L-乳酸分解代谢相关基因,另一方面表达了来源于牛链球菌 *Streptococcus bovis* 的 L-乳酸脱氢酶,用于 L-乳酸的合成。再则他们通过敲除 *mgs* 基因阻断了大肠杆菌中可能形成消旋乳酸发酵的所谓“甲基乙二醛支路”。由此可以理论转化率的 93% 形成光学纯度 99.9% 和化学纯度 97% 的 L-乳酸 (实际底物转化率为 89.3%)^[17]。同时可以看出,84 h 的发酵周期显示此研究成果未能突破已有研究成果,也不太可能为工业化过程所采纳。

另外,已有的研究显示,甜菜碱的添加有助于提高菌株代谢利用葡萄糖和合成 D-乳酸的效率,但同时会降低 D-乳酸的光学纯度^[18]。原因是甜菜碱减轻渗透压对细胞生长和代谢的不利影响的同时增强了丙酮醛为底物合成 L-乳酸的途径,因此敲除 *mgs* 基因有助于提高甜菜碱添加情况下的 D-乳酸光学纯度^[19]。在不添加甜菜碱的发酵过程中,保留 *mgs* 基因则同样可以实现高光学纯度 D-乳酸的合成^[20-21]。菌株 090B 发酵获得高光学纯度 L-乳酸的结论,也证实重组菌在没有敲除 *mgs* 基因的遗传背景下,可以在不添加甜菜碱的无机盐培养基中合成光学纯度高于 99.9% 的 L-乳酸。

REFERENCES

- [1] Yazdani SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(3): 213-219.
- [2] Hong AA, Cheng KK, Peng F, et al. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *J Chem Technol Biotechnol*, 2009, 84(10): 1576-1581.
- [3] Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(1): 148-161.
- [4] Tian KM, Chen XZ, Shen W, et al. High-efficiency conversion of glycerol to D-lactic acid with metabolically engineered *Escherichia coli*. *Afri J Biotechnol*, 2012, 11(21): 4860-4867
- [5] Tian KM, Zhou L, Chen XZ, et al. Fermentation of L-lactic acid and synthesis of poly(L-lactic acid). *China Biotechnol*, 2011, 31(2): 102-115 (in Chinese).
田康明, 周丽, 陈献忠, 等. L-乳酸的发酵生产和聚 L-乳酸的化学加工. *中国生物工程杂志*, 2011,

- 31(2): 102–115.
- [6] Zhou L, Tian KM, Chen XZ, et al. Advance in the production of optically pure D-lactic acid by microbial fermentation. *China Biotechnol*, 2010, 30(10): 114–124 (in Chinese).
周丽, 田康明, 陈献忠, 等. 微生物发酵产光学纯度 D-乳酸研究进展. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(10): 114–124.
- [7] Bai DM, Jia MZ, Zhao XM, et al. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chem Eng Sci*, 2003, 58(3): 785–791.
- [8] Bulut S, Elibol M, Ozer D. Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J*, 2004, 21(1): 33–37.
- [9] Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, et al. Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4): 1964–1970.
- [10] Tian KM, Zhou L, Chen XZ, et al. Temperature-switched high-efficient D-lactate production from glycerol. *Chin J Biotech*, 2013, 29(1): 111–114 (in Chinese).
田康明, 周丽, 陈献忠, 等. 利用温度调节实现新型重组菌高效转化甘油为 D-乳酸. *生物工程学报*, 2013, 29(1): 111–114.
- [11] Zhou L, Niu DD, Tian KM, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2012, 14(5): 560–568.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- [13] Zhou L, Tian KM, Zuo ZR, et al. Elimination of succinate and acetate synthesis in recombinant *Escherichia coli* for D-lactate production. *Chin J Biotech*, 2011, 27(1): 31–40 (in Chinese).
周丽, 田康明, 左志锐, 等. 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. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 31–40.
- [14] Zhou L, Tian KM, Niu DD, et al. Improvement of D-lactate productivity in recombinant *Escherichia coli* by coupling production with growth. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(6): 1123–1130.
- [15] Mazumdar S, Clomburg JM, Gonzalez R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4327–4336.
- [16] Evans JD, Martin SA. Cloning of the L-lactate dehydrogenase gene from the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium* HD4. *Curr Microbiol*, 2002, 44(3): 155–160.
- [17] Mazumdar S, Blankschien MD, Clomburg JM, et al. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2013, doi:10.1186/1475-2859-12-7.
- [18] Zhou S, Grabar TB, Shanmugam KT, et al. Betaine tripled the volumetric productivity of D(-)-lactate by *Escherichia coli* strain SZ132 in mineral salts medium. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(9): 671–676.
- [19] 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.
- [20] Zhou L, Zuo ZR, Chen XZ, et al. Evaluation of genetic manipulation strategies on D-lactate production by *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 2011, 62(3): 981–989.
- [21] Zhu Y, Eiteman MA, DeWitt K, et al. Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(2): 456–464.

(本文责编 陈宏宇)