

• 工业生物技术 •

## 短链硫酯酶缺失对大肠杆菌合成聚羟基丁酸乳酸酯的影响

魏香菊, 吴桦, 郭鹏业, 周胜敏, 吴辉

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

魏香菊, 吴桦, 郭鹏业, 等. 短链硫酯酶缺失对大肠杆菌合成聚羟基丁酸乳酸酯的影响. 生物工程学报, 2021, 37(1): 196-206.  
Wei XJ, Wu J, Guo PY, et al. Effect of short-chain thioesterase deficiency on P(3HB-co-LA) biosynthesis in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 196-206.

**摘要:** 聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是一种具有优质生物相容性的可降解生物基材料, 其理化性质优越, 具备替代石油基塑料的潜力。P(3HB-co-LA) 是 PHAs 的一种, 融合了聚乳酸 (Polylactic acid, PLA) 和聚 3-羟基丁酸 (poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB)) 共同的优点, 具有更好的韧性和透明度。文中首先在大肠杆菌 MG1655 中通过质粒表达外源基因 *phaA*、*phaB*、*phaCm* 和 *pct<sub>th</sub>*, 发酵生产出乳酸含量为 23.8 mol% 的 P(3HB-co-LA), 在此基础上缺失 *dld* 基因得到菌株 WXJ01-03, 其合成的聚合物中乳酸组分含量提升至 37.2 mol%。当硫酯酶基因 *ydjI* 和 *yciA* 基因继续被敲除后, 生产的共聚物中乳酸组分进一步提升至 42.3 mol% 和 41.1 mol%。最后将 3 个基因 *dld*、*yciA* 和 *ydjI* 同时缺失得到重组菌株 WXJ03-03, 并通过该重组菌株获得了乳酸组分含量为 46.1 mol% 的共聚物。通过比较不同碳源的发酵结果得知, 木糖有利于提高共聚物中乳酸组分含量。上述实验结果表明, 在木糖发酵中短链硫酯酶基因缺失阻碍了大肠杆菌胞内的 LA-CoA 被降解, 可有效提高聚合物中乳酸组分的摩尔百分比。

**关键词:** 聚羟基脂肪酸酯, 聚羟基丁酸乳酸酯, 大肠杆菌, 木糖发酵, 硫酯酶

## Effect of short-chain thioesterase deficiency on P(3HB-co-LA) biosynthesis in *Escherichia coli*

Xiangju Wei, Ju Wu, Pengye Guo, Shengmin Zhou, and Hui Wu

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) have obtained much attention in biomaterial fields due to their similar physicochemical properties to those of the petroleum-derived plastics. Poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) [P(3HB-co-LA)] is

**Received:** May 1, 2020; **Accepted:** May 27, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21776083), National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFB0309302), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 22221818014), the 111 Project (No. B18022).

**Corresponding author:** Hui Wu. Tel: +86-21-64253701; Fax: +86-21-64252250; E-mail: hwu@ecust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21776083), 国家重点研发计划 (No. 2017YFB0309302), 中央高校基本科研业务费项目 (No. 22221818014), “111”计划 (No. B18022) 资助。

网络出版时间: 2020-06-08

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200605.1153.001.html>

one member of the PHAs family, and has better toughness and transparency compared to existing polylactic acid (PLA) and poly[(R)-3-hydroxybutyrate] [P(3HB)]. First, we confirmed the one-step biosynthesis of P(LA-co-3HB) with the lactate fraction of 23.8 mol% by introducing P(3HB-co-LA) production module into *Escherichia coli* MG1655. Then, the lactate fraction was increased to 37.2 mol% in the *dld* deficient strain WXJ01-03. The genes encoding the thioesterases, *ydiI* and *yciA*, were further knocked out, and the lactate fraction in the P(3HB-co-LA) was improved to 42.3 mol% and 41.1 mol% respectively. Strain WXJ03-03 with *dld*, *ydiI* and *yciA* deficient was used for the production of the LA-enriched polymer, and the lactate fraction was improved to 46.1 mol%. Notably, the lactate fraction in P(3HB-co-LA) from xylose was remarkably higher than from glucose, indicating xylose as a potent carbon source for P(3HB-co-LA) production. Therefore, the deficiency of thioesterase may be considered as an effective strategy to improve the lactate fraction in P(3HB-co-LA) in xylose fermentation.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, P(3HB-co-LA), *Escherichia coli*, xylose fermentation, thioesterase

塑料制品由于其出色的性能在现代社会扮演着越来越重要的角色<sup>[1]</sup>, 然而市场上绝大多数塑料制品都是由石油衍生而来的<sup>[2]</sup>, 具有难以降解的特性, 废弃塑料的大量堆积对生态环境造成沉重的负担<sup>[3]</sup>。聚羟基脂肪酸酯是一种可以通过微生物发酵的方式在微生物体内以小颗粒的形式储存的生物材料<sup>[4]</sup>, 不仅具有与化学塑料类似的物理化学性质, 还具有良好的生物相容性和自然降解性, 是一种理想的化学塑料的替代品<sup>[3]</sup>。聚 3-羟基丁酸乳酸酯 (P(3HB-co-LA)) 是属于 PHAs 的一种共聚物, 在 PHA 合酶的作用下将 3-羟基丁酰辅酶 A(3HB-CoA) 和乳酰辅酶 A(LA-CoA) 聚合而成, PLA 和 P(3HB) 分别是以乳酸和 3-羟基丁酸为单体聚合而成的生物聚酯。PLA 具有坚硬透明的特点, P(3HB) 是不透明且易碎的, P(3HB-co-LA) 兼具了二者共同的优点, 具有更优的弹性和透明度<sup>[5-6]</sup>, 而且共聚物的性质会根据共聚物中单体成分变化而有所变化, 因此应用范围也更加广泛<sup>[7]</sup>。

由于无法找到对 LA-CoA 有活性的天然 PHA 合酶, 因此 Taguchi 等<sup>[8]</sup>科学家通过饱和突变的方法成功筛选到可以聚合 3HB-CoA 和 LA-CoA 两种单体的 PHA 合酶突变体 *Pseudomonas* sp. 61-3 (PhaC1PsST/QK), 但是产物中乳酸含量仅有 6 mol%。当乳酸含量较低时, 共聚物呈现出不透明状, 随着乳酸组分的提高, 共聚物的透明度增加且脆性

下降, 从而具有更好的韧性和延长率, 当乳酸组分达到 33 mol% 时, 延长率可增加 4 倍, 几乎达到市场上聚乙烯塑料的水平<sup>[9]</sup>。

为了进一步提高共聚物中乳酸组分含量, 近年来科学家们主要从关键酶进化、底盘细胞改造、发酵过程优化几种途径研究。为了增加 Pct<sub>cp</sub> 对乳酸以及 PhaC1ps6-19 对乳酰辅酶 A 的催化活性, 韩国科学家 Yang 等<sup>[10]</sup>通过易错 PCR 突变和定点饱和突变的方法进行酶的进化, 最终在添加 3HB 的情况下利用葡萄糖发酵生产出乳酸组分含量为 49 mol%、聚合物含量为 53.5 wt% 的 P(3HB-co-LA)。Jung 等<sup>[11]</sup>利用基因工程手段敲除基因 *ackA*、*adhE* 和 *ppc* 间接增加胞内乳酰辅酶 A 和乳酸的合成量, 同时替换乳酸脱氢酶和乙酰辅酶 A 合成酶的启动子, 合成的共聚物 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分含量达到 70 mol%, 聚合物占菌体干重为 46 wt%。Park 等<sup>[12]</sup>尝试利用丰富而廉价的蔗糖为碳源发酵生产 P(3HB-co-LA), 在罗尔斯通氏菌 *Ralstonia eutropha* 中引入来自产琥珀酸曼氏杆菌 *Mannheimia succiniciproducens* 的 *sacC* 基因构建蔗糖利用途径, 引入大肠杆菌 *Escherichia coli* 的 *ldhA* 保证乳酸的合成, 发酵生产的 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分含量为 21.5 mol%, 聚合物占菌体干重为 19.5 wt%。

Yamada 等<sup>[7]</sup>通过缺失丙酮酸甲酸裂解酶 (PFL) 且上调乳酸脱氢酶 (LDH), 减少丙酮酸到

乙酰辅酶 A 的流量且增加胞内乳酸的积累量<sup>[13]</sup>, 在厌氧条件下发酵生产 P(3HB-co-LA), 使乳酸组分含量提高至 47%, 但聚合物含量较少。Nduko 等<sup>[14]</sup>研究了木糖作为碳源对高乳酸组分 P(3HB-co-LA) 生产的作用, 选用进化后的 PHA 合酶[*phaC1 Ps(ST/FS/QK)*]在重组大肠杆菌中进行发酵, 在葡萄糖为碳源时获得的聚合物 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分为 47 mol%, 当碳源换成木糖时, 乳酸组分便提高至 60 mol%。

在提高乳酸组分的研究中, 改造底盘细胞的目的—般是为了增加胞内乳酸的积累, 然后在外源基因 *pct<sub>th</sub>* 作用下转化为乳酰辅酶 A, 乳酰辅酶 A 作为 P(3HB-co-LA) 的直接前体可以增加共聚

物中乳酸组分含量。然而有文献<sup>[15]</sup>提出, 在合成 P(3HB-co-LA) 的大肠杆菌体内乳酰辅酶 A 的含量处于检测值以下的水平, 推测大肠杆菌体内具有某种降解乳酰辅酶 A 作用的酶使其刚合成即被部分降解, 因此仅增加胞内乳酸积累仍具有一定的局限性。通过进一步文献调研发现大肠杆菌内源性硫酯酶 YciA 和 YdiI 对于广泛的短链脂肪酰辅酶 A 具有一定的降解作用<sup>[16-18]</sup>。因此本研究区别于以往增加胞内乳酸积累的方法, 提出了一种新的大肠杆菌改造策略, 即敲除大肠杆菌内源性的可降解乳酰辅酶 A 的硫酯酶, 阻止胞内乳酰辅酶 A 的降解, 使之更多地走向聚合物的合成途径, 具体代谢途径见图 1。

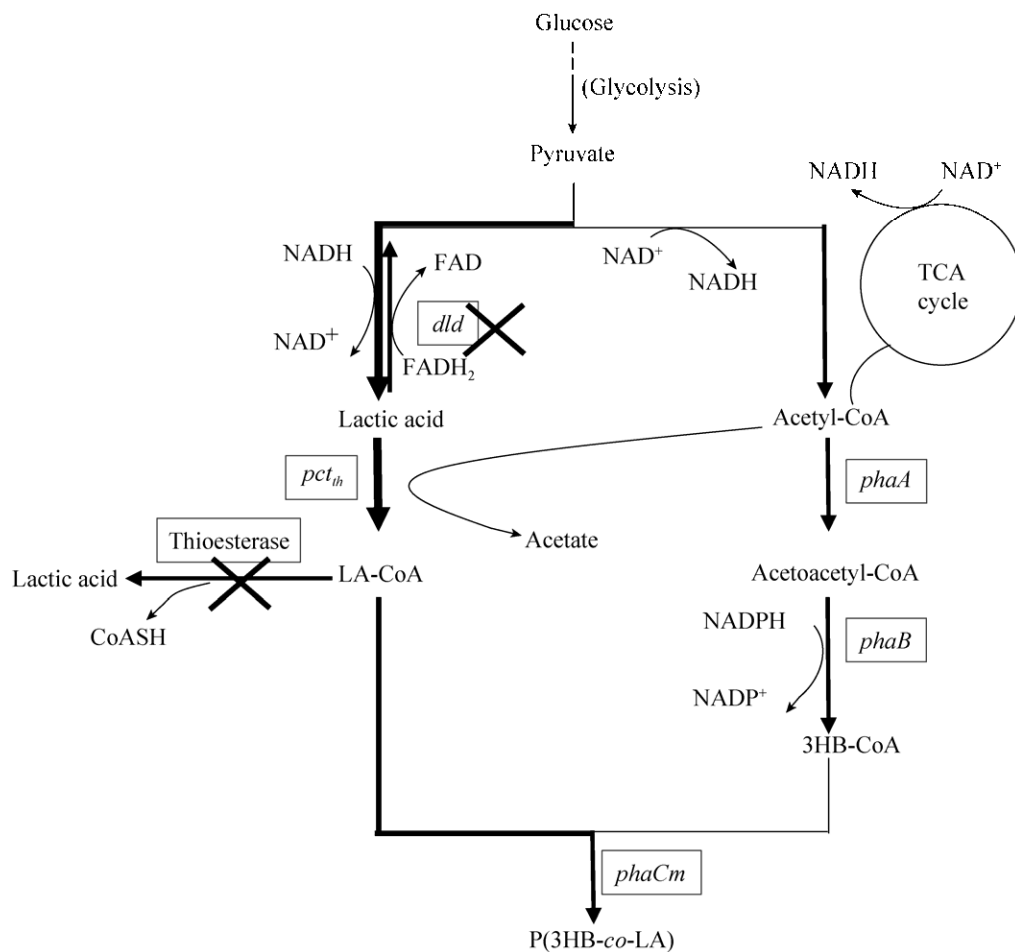


图 1 基因工程大肠杆菌合成 P(3HB-co-LA)

Fig. 1 Biosynthesis of P(3HB-co-LA) by genetically engineered *E. coli*.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

本研究所用到的菌株和质粒见表 1, 构建菌株所用到的引物见表 2。

### 1.2 重组菌株改造

底盘细胞的基因敲除是根据  $\lambda$ -red 重组系统介导的 PCR 产物一步法敲除原理<sup>[19]</sup>进行的。在改造菌株 MG1655 $\Delta$ dld 的基础上分别将 *E. coli*

MG1655 内源性的硫酯酶基因 *ydiI* 和 *yciA* 由含有 FRT 位点的 *kan* 基因代替, 分别获得改造菌株 MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *ydiI* 和 MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *yciA*, 再利用同样的方法在 MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *ydiI* 的基础上敲除基因 *yciA* 获得改造菌株 MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *yciA*  $\Delta$ *ydiI*, 并将 MG1655 $\Delta$ dld、MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *ydiI*、MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *yciA* 和 MG1655 $\Delta$ dld  $\Delta$ *yciA*  $\Delta$ *ydiI* 分别命名为 WXJ01、WXJ02、WXJ021 和 WXJ03。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Description	Source
Plasmids		
pTrc99a	Cloning vector, <i>trc</i> promoter, Amp <sup>R</sup>	Our laboratory
pBAD- <i>Ptrc</i>	Cloning vector, <i>trc</i> promoter, Chl <sup>R</sup>	Our laboratory
pTrc99aABC	pTrc99a containing <i>phaA</i> , <i>phaB</i> and <i>phaCm</i> gene, <i>trc</i> promoter, Amp <sup>R</sup>	Our laboratory
pBAD- <i>Ptrc-pct<sub>th</sub></i>	pBAD33- <i>Ptrc</i> containing <i>pct<sub>th</sub></i> gene, <i>trc</i> promoter, Amp <sup>R</sup>	Our laboratory
Strains		
MG1655	Wild-type	Our laboratory
WXJ01	MG1655 $\Delta$ dld	Our laboratory
WXJ02	MG1655 $\Delta$ dld $\Delta$ <i>ydiI</i>	This study
WXJ021	MG1655 $\Delta$ dld $\Delta$ <i>yciA</i>	This study
WXJ03	MG1655 $\Delta$ dld $\Delta$ <i>yciA</i> $\Delta$ <i>ydiI</i>	This study
MG1655-03	MG1655 carrying pTrc99aABC and pBAD- <i>Ptrc-pct<sub>th</sub></i>	This study
WXJ01-03	WXJ01 carrying pTrc99aABC and pBAD- <i>Ptrc-pct<sub>th</sub></i>	This study
WXJ02-03	WXJ02 carrying pTrc99aABC and pBAD- <i>Ptrc-pct<sub>th</sub></i>	This study
WXJ021-03	WXJ021 carrying pTrc99aABC and pBAD- <i>Ptrc-pct<sub>th</sub></i>	This study
WXJ03-03	WXJ03 carrying pTrc99aABC and pBAD- <i>Ptrc-pct<sub>th</sub></i>	This study

表 2 文中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence(5'-3')	Size (bp)
<i>yciA</i> -KO-F	AAATCATAGTAGCATCGCGCCTGTGATTTTCCTTTTAAAGTCGGTTTTACCCGT CTTGAGCGATTGTGTAG	70
<i>yciA</i> -KO-R	AAATTCAGTAAGCAGAAAAGTCAAAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTACTAG ATGTAACGCACTGAGAAGC	70
<i>ydiI</i> -KO-F	GAAGGCACGGGGGTACGCCATCCTGTGCAGGCTTTACTGGAGATTATTAAC GTCTTGAGCGATTGTGTAG	70
<i>ydiI</i> -KO-R	TGCAGATAATGACCAAAAAGCAATATGCGTCACACTTTTCTGGTGACAACGGA TGTAACGCACTGAGAAGC	70
<i>yciA</i> -jd-F	ATGGTCGAAGCTGAATCTGGCCTGG	25
<i>yciA</i> -jd-R	CGCGCATTAAGCCGTAATCAGCCGC	25
<i>ydiI</i> -jd-F	CTGTACCGAAGTTACCGCCTTGCCG	25
<i>ydiI</i> -jd-R	ATTAAGTCAGGATCAATGCACGCC	25

### 1.3 培养基与培养方法

LB 培养基: 每升含酵母提取物 5 g, 蛋白胨 10 g 和氯化钠 10 g。

二级种子培养基: M9 培养基中添加木糖或葡萄糖 10 g/L, 酵母提取物 2 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L,  $\text{NaCl}$  0.5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.011 g/L, 1% (W/V) 维生素 B1 0.2 mL/L。

发酵培养基: M9 培养基中添加木糖或葡萄糖 20 g/L, 酵母提取物 2 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L,  $\text{NaCl}$  0.5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.011 g/L, 1% (W/V) 维生素 B1 0.2 mL/L。

一级种子培养方法: 将单菌落接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素和 34 mg/L 氯霉素的 3 mL LB 的试管中, 在 37 °C 培养 12 h。

二级种子培养方法: 将一级种子接种到 50 mL 含有 100 mg/L 的氨苄青霉素和 34 mg/L 的氯霉素的二级种子培养基中 30 °C 培养 12 h。

发酵培养方法: 将二级种子接种到含有 100 mg/L 氨苄青霉素和 34 mg/L 氯霉素的发酵培养基中, 30 °C 培养 60 h。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 碳源、乳酸和乙酸分析

本研究涉及到的碳源及代谢中间物如乳酸和乙酸, 经过适当的稀释和过滤后通过岛津公司生产的 LC-20A 高效液相色谱进行检测, 色谱柱为 HPX-87X, 流动相为 5 mmol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 柱温为 65 °C, 流速为 0.6 mL/min。

#### 1.4.2 聚合物及单体成分分析

本研究生成的聚合物需要先进行预处理。

首先是酯化反应: 向提前冷冻干燥的已知重量 (约 15 mg) 的菌体中加入 1.5 mL 氯仿和 1.5 mL 的酯化液 (由 15% 硫酸、85% 甲醇、1 g/L 苯甲酸配制而成) 在 100 °C 下酯化 4 h。然后冷却后加入 0.75 mL 去离子水振荡萃取, 低温低速离心取下

层有机相过滤后进行气相色谱检测。气相色谱采用岛津 GC-2014 型号, 检测器是火焰化离子检测器, 以高纯氮为载气, 氢气为燃气, 空气为助燃气, 进样器为 AOC-20S 型自动化进样器。具体程序为: 首先在 54 °C 保留 4 min, 然后以 5 °C/min 的速率升温至 80 °C, 以 10 °C/min 的程序升温至 125 °C, 再以 30 °C/min 的速率升温至 180 °C, 最后以 20 °C/min 的速率升温至 220 °C 并保留 5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫酯酶缺失菌株构建

在本研究中, 通过表达 P(3HB-co-LA) 合成所需要的基因来构建重组大肠杆菌, 如表 1 所示, 即在大肠杆菌中引入 3HB-CoA 合成所需的  $\beta$ -酮硫解酶 (*phaA*) (来自罗尔斯通氏菌 *Ralstonia eutropha*) 和乙酰乙酰 CoA 还原酶 (*phaB*) (来自罗尔斯通氏菌 *Ralstonia eutropha*), 聚合物合成所需的突变后的 PHA 合成酶 (*phaCm*) (来自荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* strain 2P24) 以及合成 LA-CoA 所需的突变的丙酸 CoA 转移酶 (*pct<sub>m</sub>*) (来自丙酸梭菌 *Clostridium propionicum*)<sup>[20]</sup>。通过文献 [5] 调研发现, 对于同一套合成 P(3HB-co-LA) 的基因, 以谷氨酸棒杆菌作为底盘细胞, 合成的 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分含量最高可达 96.8 mol%, 远高于以大肠杆菌作为底盘细胞所合成的共聚物, 日本研究者 Taguchi 等<sup>[15]</sup> 通过实验证明, 相比于谷氨酸棒杆菌, 大肠杆菌体内存在一种可以降解 LA-CoA 的酶, 使之脱去 CoA 重新生成乳酸, 降低了胞内 LA-CoA 水平, 使得大肠杆菌合成的 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分低于谷氨酸棒杆菌, 但具体降解机制不清楚。

前期有研究者报道<sup>[21-22]</sup>, 大肠杆菌体内的硫酯酶对于各种代谢途径中的酰基辅酶 A 类中间体具有降解作用, 但是对于具体降解某一种特定的酰基辅酶 A 中间体的硫酯酶却没有具体研究, 大肠杆菌体内的硫酯酶种类很多, 由于大多数都具有广泛的底物特异性, 所以很难预测某种硫酯酶

对于具体的酰基辅酶 A 中间体的生理作用。Lin 等<sup>[23]</sup>在大肠杆菌中建立了一个人工途径用于四羟基香豆素的合成,在合成过程中需要中间体水杨酸酰基辅酶 A,为了防止该中间体被硫酯酶所降解,确定了大肠杆菌内源性的一种相关硫酯酶并将其敲除,最终使四羟基香豆素的产量得到提升。*YciA* 是大肠杆菌内源性的硫酯酶, Gonzalez 等<sup>[16]</sup>通过体外比活性检测得出,该硫酯酶对于碳四脂肪酰辅酶 A 具有较好的降解作用,对于乙酰辅酶 A 也具有一定的降解作用。*YdiI* 对于广泛的酰基 CoA 均具有较高的活性<sup>[18]</sup>。

为实现提高 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分的目的,首先选用缺失 D-乳酸脱氢酶基因 (*ldh*) 的改造菌株 WXJ01,防止发酵后期乳酸合成丙酮酸<sup>[24]</sup>。然后在 WXJ01 菌株的基础上分别敲除 *ydiI* 和 *yciA*,获得改造菌株 WXJ02 (图 2) 和 WXJ021 (图 3),在 WXJ02 菌株的基础上敲除 *yciA*,获得改造菌株 WXJ03 (图 4)。在图 2-4 中,泳道 C 均表示以未敲除目标基因为模板通过验证引物进行的 PCR 扩增结果,片段大小依次为 1 011 bp、999 bp 和 999 bp,当待敲除基因被 *kan* 基因替换后,片段大小均会增加至 2 180 bp。

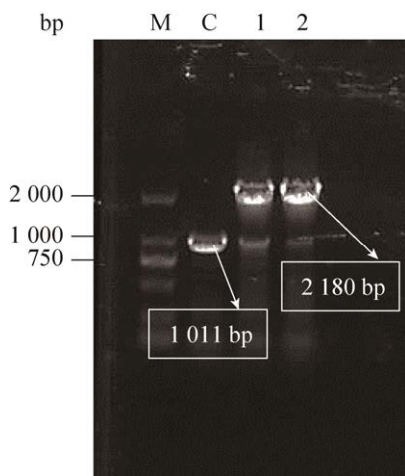


图 2 *ydiI* 基因敲除菌落 PCR 验证电泳图

Fig. 2 Colonies PCR validation of the *ydiI* knockout. M: DL 2000 marker, C: WXJ01, 1-2: WXJ02.

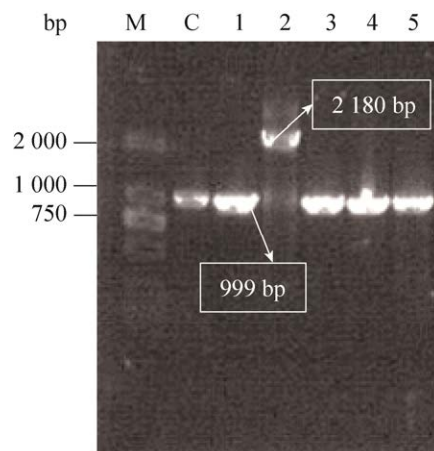


图 3 *yciA* 基因敲除菌落 PCR 验证电泳图

Fig. 3 Colonies PCR validation of the *yciA* knockout. M: DL 2000 marker, C: WXJ01, 1-5: WXJ021.

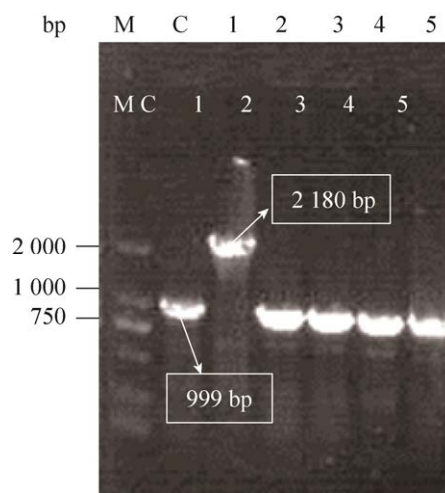


图 4 硫酯酶双敲除菌落 PCR 验证电泳图

Fig. 4 Colonies PCR validation of the MG1655 $\Delta$ *ldh*  $\Delta$ *ydiI*  $\Delta$ *yciA*. M: DL 2000 marker, C: WXJ02, 1-5: WXJ03.

## 2.2 硫酯酶缺失菌株木糖发酵

将 pTrc99aABC 和 pBAD-P<sub>trc</sub>-pct<sub>th</sub> 双质粒转化进入底盘细胞 MG1655、WXJ01、WXJ02、WXJ021 和 WXJ03 中,获得的重组菌株依次命名为 MG1655-03、WXJ01-03、WXJ02-03、WXJ021-03 和 WXJ03-03。将上述重组菌株经过一级种子和二级种子培养后,接种到 M9 发酵培养基中发酵,添加 0.1 mmol/L IPTG 诱导质粒的

表达。发酵 60 h 后检测聚合物生产情况。由于木糖是一种性价比较高的碳源，同时是一种非粮碳源，是自然界第二大丰富的糖类<sup>[25]</sup>，已有研究证明木糖发酵有利于胞内乳酸的积累<sup>[26]</sup>，因此本研究选用木糖发酵生产 P(3HB-co-LA)。具体结果见图 5 和图 6。

图 5A 表示菌株的生长状况，从生长趋势以及最终生长  $OD_{600}$  值来看，5 种重组菌株没有表现出明显差别，说明基因 *dld* 以及硫酯酶基因 *yciA* 和 *ydiI* 的缺失没有对菌株的生长造成负面影响。图 5B 表示发酵过程中木糖的消耗情况，MG1655-03、WXJ01-03、WXJ02-03、WXJ021-03 和 WXJ03-03 重组菌株剩余的木糖分别为 2.2 g/L、4.0 g/L、4.5 g/L、4.6 g/L 和 4.5 g/L，说明 *dld* 基因的缺失可以在不影响菌株生长的前提下减少木糖的消耗量，硫酯酶基因缺失后进一步减少了耗糖量。可能因为缺失 *dld* 基因后降低了大肠杆菌木糖代谢中乳酸反向通过丙酮酸进入 TCA 循环，

使菌体的碳源利用率得到提高。图 5C 表示发酵过程中乳酸的分泌量，当大肠杆菌缺失基因 *dld* 时，菌株 WXJ01-03、WXJ02-03、WXJ021-03、WXJ03-03 的乳酸含量明显比野生型菌株 MG1655-03 (乳酸含量最高为 0.5 g/L) 高，缺失 *dld* 后胞内积累的乳酸不会由 D-乳酸脱氢酶催化生成丙酮酸，从而增加了胞内的乳酸积累量。没有缺失硫酯酶基因的菌株 WXJ01-03 的乳酸水平在 36 h 达到最高 (图 5C)，硫酯酶基因的缺失阻碍了部分乳酰辅酶 A 转化为乳酸，从而导致了发酵液中乳酸含量的降低。图 5D 表示发酵过程中乙酸的代谢变化情况，5 种重组菌株的乙酸含量并没有明显区别，发酵过程中乙酸始终处于上升趋势，存在一定的溢流代谢，最高乙酸含量均在 0.9 g/L 左右。

图 6 表示 5 种不同重组菌株的聚合物产量以及乳酸组分在聚合物中所占的比例情况。各突变株中聚合物占菌体干重的比例没有明显变化，聚合物中乳酸组分含量有了明显的提升，其中重组

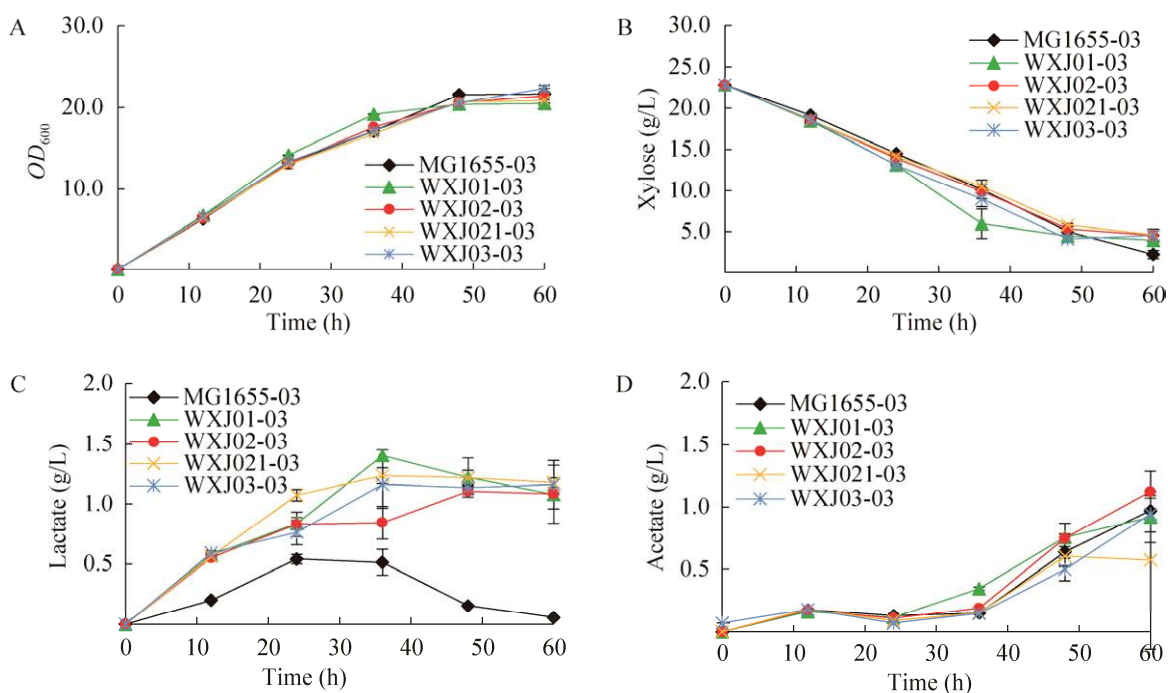


图 5 不同重组菌株木糖发酵的生长和代谢

Fig. 5 The growth and metabolism of different recombinant strains in xylose.



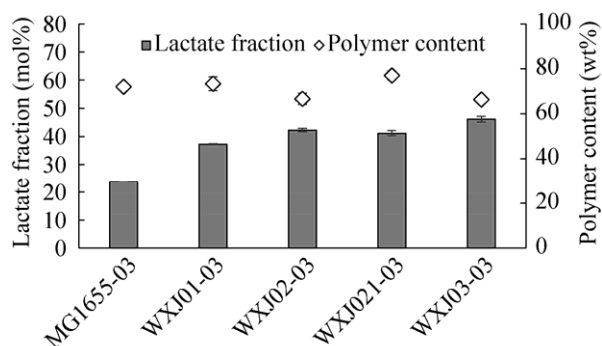


图6 不同重组菌株木糖发酵的聚合物生产  
Fig. 6 The production of P(3HB-co-LA) of different recombinant strains in xylose.

菌株 WXJ01-03 的乳酸含量为 37.2 mol%，比 MG1655-03 菌株的乳酸含量 (23.8 mol%) 提高了 56%，说明 *dld* 的缺失可以使大肠杆菌胞内乳酸含量增加，进而增加聚合物中乳酸组分含量。Ndoko 等<sup>[27]</sup>利用木糖发酵生产 P(3HB-co-LA) 时，发现缺失 *dld* 基因的重组菌株以相同的耗糖量可以生产更高得率的聚合物，*dld* 基因的缺失对利用木糖生产乳酸基聚合物具有促进作用。

在 WXJ01-03 的基础上，分别进一步缺失 *ydiI* 和 *yciA* 得到重组菌株 WXJ02-03 和 WXJ021-03，他们发酵合成的聚合物中乳酸含量分别为 42.3 mol% 和 41.1 mol%，相对于没有缺失硫酯酶的菌株 WXJ01-03 分别提高了 14% 和 10%，当两种硫酯酶都缺失后，重组菌株 WXJ03-03 的乳酸含量达到了最高值 46.1 mol%，比 WXJ01-03 菌株提高了 24%，比野生型菌株 MG1655-03 菌株生产的聚合物中乳酸组分含量提高了 94%。说明硫酯酶基因的缺失减少了胞内乳酰辅酶 A 被降解，从而更多地走向共聚物 P(3HB-co-LA) 的合成方向，而且双硫酯酶缺失后，这种作用更加明显。YdiI 和 YciA 都是对短链脂肪酰辅酶 A 具有降解作用的酶，文中通过实验间接证明两种酶对乳酰辅酶 A 可能具有降解作用，但对于 3HB-CoA 是否有作用目前不能确定。因为大肠杆菌体内积累的 3HB-CoA 水平远高于 LA-CoA 水平<sup>[15]</sup>，即使部分

3HB-CoA 被硫酯酶降解，也可能在合成聚合物的过程中影响不会很大，所以单从聚合物产物中 3HB 的含量无法判断硫酯酶是否降解了 3HB-CoA。

### 2.3 硫酯酶缺失菌株葡萄糖发酵

为比较硫酯酶缺失菌株利用不同碳源的发酵结果，本研究将同样的重组菌株在相同的条件下进行葡萄糖发酵，结果见图 7 和图 8。

图 7A 展示了重组菌株的生长状况，5 种菌株的最终生长 *OD* 值均在 20 左右，与木糖发酵的生长状况类似，且基因的缺失同样没有影响菌株的生长。图 7B 表示葡萄糖的消耗情况，与木糖发酵过程相比，葡萄糖的消耗在前期经历了约 12 h 的延迟期。图 7C 表示发酵过程中乳酸变化情况，在发酵过程中，MG1655-03 重组菌株的乳酸含量在 24 h 达到最高值为 0.6 g/L，敲除 *dld* 基因之后，重组菌株 WXJ01-03 的胞外分泌的乳酸含量明显提高，最高达到了 1.3 g/L，是野生型乳酸含量的 2.2 倍，当继续敲除硫酯酶之后，代谢过程中分泌的乳酸含量继续增加，其中 WXJ02-03、WXJ021-03 和 WXJ03-03 重组菌株乳酸含量最高都达到 1.5 g/L，比 WXJ01-03 菌株提高了 15%。图 7D 表示菌体生长过程中乙酸积累情况，由图中看出，代谢过程中乙酸含量始终处于上升趋势，即在碳源充足的情况下，存在一定的溢流代谢，乙酸含量最高在 1.0 g/L 左右，与木糖发酵乙酸的积累量和趋势相似。

在葡萄糖发酵中不同的重组菌株聚合物的生产情况以及聚合物中乳酸含量如图 8 所示。野生型菌株 MG1655-03 生产的聚合物中，乳酸组分含量为 18 mol%，当缺失 *dld* 之后，WXJ01-03 菌株生产的聚合物中乳酸含量提高至 26.7 mol%，但是相对于重组菌株 WXJ01-03，当继续缺失硫酯酶基因时，菌株 WXJ02-03、WXJ021-03 和 WXJ03-03 生产的聚合物中乳酸组分含量没有明显的提高，这一现象与在木糖发酵中不同，以葡萄糖为碳源



发酵合成的聚合物 P(3HB-co-LA) 中乳酸含量低于以木糖为碳源的发酵。

聚合物合成结果显示, 在葡萄糖发酵中共聚物 P(3HB-co-LA) 的乳酸组分含量变化较小, 但利用木糖发酵聚合物中乳酸含量变化显著, 且共聚

物中乳酸组分含量较高, 主要原因可能是不同碳源对细胞代谢的影响差异性非常大; 综合发酵过程的代谢情况以及聚合物生产情况分析, 木糖发酵更有利于高乳酸组分含量的 P(3HB-co-LA) 的生产。

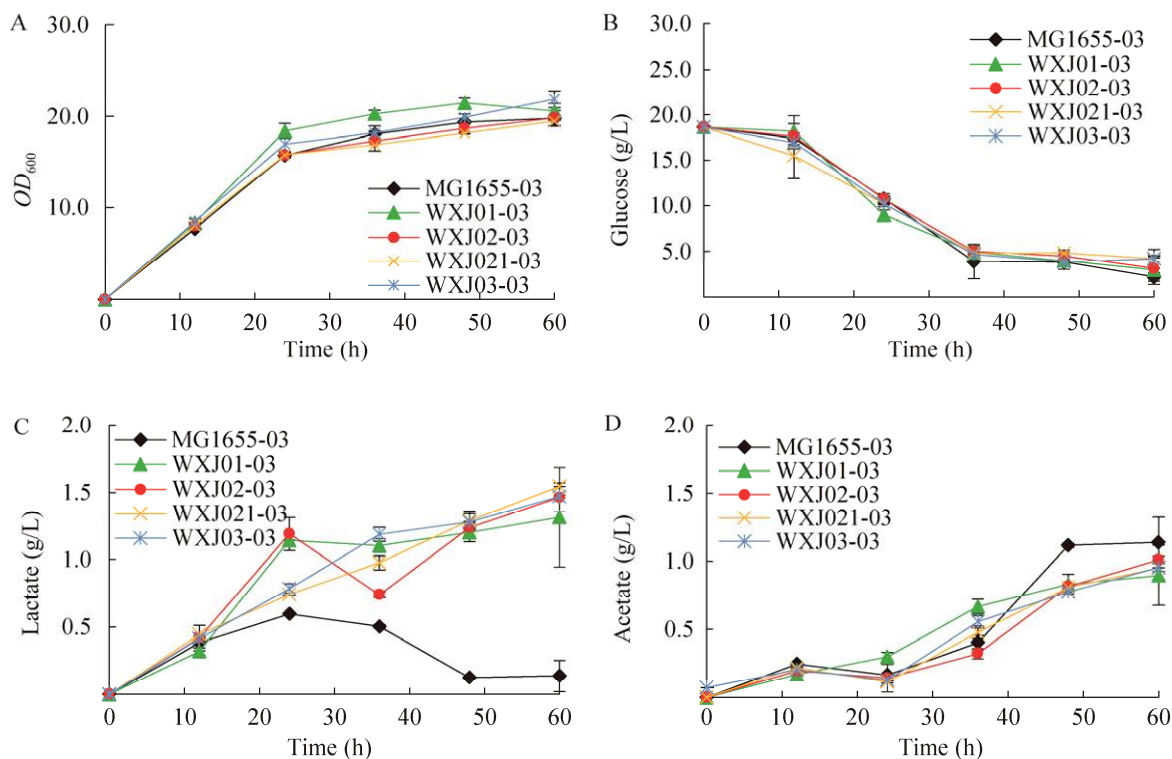


图7 不同重组菌株葡萄糖发酵的生长和代谢

Fig. 7 The growth and metabolism of different recombinant strains in glucose.

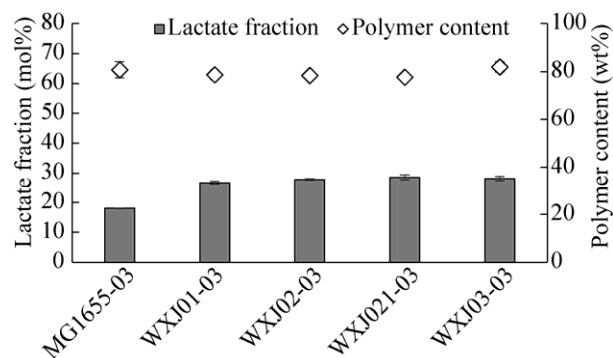


图8 不同重组菌株葡萄糖发酵的聚合物生产

Fig. 8 The production of P(3HB-co-LA) of different recombinant strains in glucose.

### 3 小结

本研究通过表达外源基因 *phaA*、*phaB* 供应 3HB-CoA 的合成, 表达外源基因 *pct<sub>th</sub>* 供应 LA-CoA 的合成, 最终在 *phaCm* 作用下合成共聚物 P(3HB-co-LA), 在 MG1655-03 重组菌株利用木糖合成的共聚物中乳酸组分含量为 23.8 mol%, 在缺失 *dld* 基因的菌株 WXJ01-03 中获得共聚物中乳酸组分含量为 37.2 mol%。为了进一步增加共聚物中乳酸组分含量, 本研究从防止 LA-CoA 被降解的角度出发, 将具有短链脂肪酰辅酶 A 降

解作用的酶 YdiI 和 YciA 分别在 MG1655 中敲除, 在此基础上转入带有共聚物合成相关基因的质粒, 获得重组菌株 WXJ02-03 和 WXJ021-03, 这两种菌产生的共聚物中乳酸含量有了明显提升, 分别为 42.3 mol% 和 41.1 mol%。最后为了考察双硫酯酶基因缺失对聚合物合成的影响, 将 ydiI 和 yciA 均敲除掉, 获得的菌株 WXJ03-03 合成的共聚物达到了最高乳酸组分含量, 为 46.1 mol%。Nduko 等<sup>[14]</sup>选用大肠杆菌 JW0885 (*pflA*<sup>-</sup>) 为底盘细胞, 以 20 g/L 木糖为碳源进行发酵获得乳酸组分为 34 mol% 的 P(3HB-*co*-LA), 聚合物占菌体干重为 61%, 与本研究结果相比具有一定的劣势。当 Nduko 等<sup>[27]</sup>选择 BW25113 菌株并缺失基因 *pflA* 和 *dld* 以 20 g/L 木糖为碳源进行发酵时, 获得乳酸组分为 73 mol% 的共聚物, 但总的聚合物占菌体含量仅有 58 wt%, 低于本研究的结果, 且基因缺失后菌体的生长受到抑制, 菌体干重仅为亲本菌株的 51%, 本研究中基因缺失不会对菌株生长造成抑制现象, 具有一定的优势。本研究还探索了硫酯酶缺失菌株利用不同碳源发酵对聚合物生产的影响, 发现相比于葡萄糖, 木糖在提高共聚物中乳酸组分方面具有一定的优势。在木糖发酵中硫酯酶的缺失对于共聚物 P(3HB-*co*-LA) 中乳酸组分的提高具有重要作用, 此结果为微生物合成乳酸基聚合物提供了一个新的代谢工程改造思路。

## REFERENCES

- [1] Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, 82(3): 233-247.
- [2] Kaur L, Khajuria R, Parihar L, et al. Polyhydroxyalkanoates: biosynthesis to commercial production-A review. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 2017, 6(4): 1098-1106.
- [3] Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 1991, 54(4): 450-472.
- [4] Chen GQ, Wu Q, Xi JZ, et al. Microbial production of biopolyesters-polyhydroxyalkanoates. *Progr Nat Sci*, 2000, 10(11): 847-850.
- [5] Song YY, Matsumoto K, Yamada M, et al. Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5): 1917-1925.
- [6] Yamada M, Matsumoto K, Shimizu K, et al. Adjustable mutations in lactate(LA)-polymerizing enzyme for the microbial production of LA-based polyesters with tailor-made monomer composition. *Biomacromolecules*, 2010, 11(3): 815-819.
- [7] Yamada M, Matsumoto K, Uramoto S, et al. Lactate fraction dependent mechanical properties of semitransparent poly(lactate-*co*-3-hydroxybutyrate)s produced by control of lactyl-CoA monomer fluxes in recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2011, 154(4): 255-260.
- [8] Taguchi S, Yamada M, Matsumoto K, et al. A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17323-17327.
- [9] Ishii D, Takisawa K, Matsumoto K, et al. Effect of monomeric composition on the thermal, mechanical and crystalline properties of poly[(*R*)-lactate-*co*-(*R*)-3-hydroxybutyrate]. *Polymer*, 2017, 122: 169-173.
- [10] Yang TH, Kim TW, Kang HO, et al. Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(1): 150-160.
- [11] Jung YK, Kim TY, Park SJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(1): 161-171.
- [12] Park SJ, Jang YA, Noh W, et al. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(3): 638-643.
- [13] 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.
- [14] Nduko JM, Matsumoto K, Ooi T, et al. Effectiveness of xylose utilization for high yield production of

- lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme. *Metabol Eng*, 2013, 15: 159-166.
- [15] Matsumoto K, Iijima M, Hori C, et al. *In vitro* analysis of D-lactyl-CoA-polymerizing polyhydroxyalkanoate synthase in poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) syntheses. *Biomacromolecules*, 2018, 19(7): 2889-2895.
- [16] Clomburg JM, Vick JE, Blankschien MD, et al. A synthetic biology approach to engineer a functional reversal of the  $\beta$ -oxidation cycle. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(11): 541-554.
- [17] Guevara-Martínez M, Perez-Zabaleta M, Gustavsson M, et al. The role of the acyl-CoA thioesterase “YciA” in the production of (*R*)-3-hydroxybutyrate by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(9): 3693-3704.
- [18] Wu R, Latham JA, Chen DQ, et al. Structure and catalysis in the *Escherichia coli* hotdog-fold thioesterase paralogs YdiI and YbdB. *Biochemistry*, 2014, 53(29): 4788-4805.
- [19] 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.
- [20] 陆静娴, 李志敏, 叶勤, 等. 弱化呼吸链水平对代谢工程大肠杆菌聚羟基丁酸乳酸酯合成的影响. *生物工程学报*, 2019, 35(1): 66-76.
- Lu JX, Li ZM, Ye Q, et al. Effect of reducing the activity of respiratory chain on biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(1): 66-76 (in Chinese).
- [21] Beuerle T, Pichersky E. Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme A esters. *Anal Biochem*, 2002, 302(2): 305-312.
- [22] Watts KT, Lee PC, Schmidt-Dannert C. Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *ChemBioChem*, 2004, 5(4): 500-507.
- [23] Lin YH, Shen XL, Yuan QP, et al. Microbial biosynthesis of the anticoagulant precursor 4-hydroxycoumarin. *Nat Commun*, 2013, 4: 2603.
- [24] Choi SY, Park SJ, Kim WJ, et al. One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(4): 435-440.
- [25] Lopes MSG, Rocha RCS, Zanotto SP, et al. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(10): 1751-1756.
- [26] Adsul MG, Singhvi MS, Gaikawai SA, et al. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2011, 102(6): 4304-4312.
- [27] Nduko JM, Matsumoto K, Ooi T, et al. Enhanced production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from xylose in engineered *Escherichia coli* overexpressing a galactitol transporter. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(6): 2453-2460.

(本文责编 陈宏宇)