

利用五碳糖产高纯度 L-乳酸的大肠杆菌基因工程菌的构建

赵锦芳^{1,2}, 许丽媛¹, 王永泽¹, 赵筱¹, 王金华^{1,2*}

¹湖北工业大学, 发酵工程教育部重点实验室, 武汉 430068

²工业发酵湖北省协同创新中心, 武汉 430068

摘要: 【目的】本研究以已敲除多个产杂酸酶基因的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 乙醇工程菌 SZ470 ($\Delta frdBC \Delta ldhA \Delta ackA \Delta focA-pflB \Delta pdhR::pflBp6-pflBrbs -aceEF-lpd$) 为起始菌株, 进一步敲除其乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 基因, 同时插入带有自身启动子的乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 的 L-乳酸脱氢酶 (L-lactate dehydrogenase, LLDH) 基因, 构建可利用五碳糖同型发酵 L-乳酸重组大肠杆菌。【方法】利用 λ 噬菌体 Red 重组系统构建乙醇脱氢酶基因 (*adhE*) 缺失菌株 *Escherichia coli* JH01, 并克隆 *P. acidilactici* 的 *ldhL* 基因, 利用染色体插入技术将其整合到 JH01 基因组, 构建产 L-乳酸大肠杆菌基因工程菌 *Escherichia coli* JH12, 利用无氧发酵 15 L 发酵罐测定重组菌株 L-乳酸产量。【结果】工程菌 JH12 在 15 L 发酵罐中以 6% 的葡萄糖为碳源进行发酵, 发酵到 36 h 的过程中葡萄糖的消耗速率为 1.46 g/(L·h), 乳酸生产强度为 1.14 g/(L·h), 乳酸的产量达到 41.13 g/L。发酵产物中未检测到琥珀酸、甲酸的生成, 仅有少量乙酸生成, L-乳酸纯度达 95.69% (L-乳酸在总发酵产物的比率)。工程菌 JH12 以 6% 的木糖为碳源进行发酵, 发酵到 36 h 的过程中葡萄糖的消耗速率为 0.88 g/(L·h), 乳酸生产强度为 0.60 g/(L·h), 乳酸的产量达到 34.73 g/L。发酵产物中杂酸少, 乳酸的纯度高达 98%。【结论】本研究通过基因敲除、染色体插入及无氧进化筛选获得一株产 L-乳酸的大肠杆菌工程菌 JH12, 该菌株不需利用外源质粒, 稳定性好, 可利用五碳糖进行发酵, 发酵产物中杂酸少, L-乳酸的纯度高。本研究为 L-乳酸大肠杆菌工程菌的构建提供一定的技术支持, 同时也为大肠杆菌 L-乳酸的工业化生产提供了参考依据。

关键词: 大肠杆菌工程菌, L-乳酸, 同源重组, 染色体插入, 五碳糖

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 04-0328-10

L-乳酸是一种重要的有机酸, 广泛应用于食品、医药和化工领域, 作为合成可生物降解、环境友好新材料——聚乳酸 (poly-lactic acid, PLA) 的主要原料, L-乳酸已成为目前最重要的有机酸之一^[1]。但

是, 由于乳酸生产成本偏高, 使得聚乳酸制造成本居高不下, 难以在价格上与传统塑料竞争。因此, 如何高效低成本地生产 L-乳酸显得尤为重要^[2]。微生物发酵法生产乳酸因其原料来源广泛、生产成本低、

基金项目: 国家自然科学基金 (NSFC31070094); 湖北省科技厅科研项目 (2011CDA008, 2011CDB076); 湖北省教育厅优秀中青年人才项目 (Q20121405); 湖北省楚天学者专项基金

* 通信作者。Tel: +86-27-59750487, Fax: +86-27-88026461; E-mail: wangjinhua@mail.hbut.edu.cn

作者简介: 赵锦芳 (1980 -), 女, 山东省威海市人, 讲师, 在职博士研究生, 主要从事微生物分子遗传改良研究。E-mail: jinfangzhao@126.com

收稿日期: 2012-08-27; 修回日期: 2012-12-17

产品光学纯度高、安全性高等优点已成为生产乳酸的主要方法。目前应用发酵法生产 L-乳酸常用的微生物,一类为根霉菌属 (*Rhizopus*) 的米根霉,其发酵营养要求低,可直接利用淀粉质原料生产高光学纯度的 L-乳酸。国内目前主要采用此方法生产 L-乳酸,如上海工业微生物研究所筛选得到一株米根霉 (*Rhizopus oryzae*) Rs928,中试条件下 L-乳酸的产量可达到 140 g/L^[3]。然而,米根霉菌发酵乳酸存在的主要缺点是转化率低,产物中有大量副产物,且发酵过程需要通气搅拌,增加了生产成本^[4-5]。另一类为同型发酵乳酸细菌 (Lactic acid bacteria, LAB),主要有乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 以及肠球菌属 (*Enterococcus*)^[6-8]等,通过厌氧发酵或兼性厌氧发酵可以生产高光学纯度 L-乳酸,并能大规模降低能耗,有利于连续发酵。如江南大学报道的一株干酪乳杆菌诱变菌株 *Lactobacillus casei* G-04 具有较高的糖酸转化率,其 L-乳酸产量可达到 188 g/L^[9]。南京工业大学李玉燕等采用低能氮离子注入法诱变获得一株凝结芽胞杆菌 *Bacillus coagulans* BC-N6242,将其与干酪乳杆菌 LC-N235 按比例混合发酵 48 h 后,L-乳酸的产量达到 235 g/L^[10]。但是乳酸菌属于化能异养微生物,营养要求高,需添加复合氮源,从而增加了培养基、产物纯化和废弃物处理方面的成本。

近年来,国内外开始研究使用 *E. coli* 基因工程菌发酵生产 L-乳酸。大肠杆菌具有遗传背景清楚、易操作、易调控、培养基要求简单和生长迅速等优点,易于进行工业化大规模生产。野生大肠杆菌在糖酵解过程中产生一系列有机酸(甲酸、乙酸、琥珀酸、乳酸)和乙醇等^[11],乳酸占总代谢产物的不到 50%。通过代谢工程手段阻断乳酸的竞争性支路,将代谢流引向乳酸的产生,是构建高产量、高纯度乳酸菌株的主要研究思路。2007 年,Zhu 等人利用基因敲除技术构建了一株大肠杆菌同型 D-乳酸发酵工程菌 ALS974 ($\Delta aceEF$ 、 Δpfl 、 $\Delta poxB$ 、 Δpps 、 $\Delta frdABCD$),其 D-乳酸产量可达到 138 g/L^[12]。然而,天然的大肠杆菌没有 L-(+) -乳酸脱氢酶,只具有 D-乳酸脱氢酶 (D-lactate dehydrogenase, D-LDH),许多研究者利用分子生物学技术敲除编码 D-乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因,将外源 *ldhL* 基因引入大司,PCR 引物合成由上海生工生物工程技术服务有

肠杆菌,使其能转化葡萄糖生产 L-乳酸。目前,多数研究者是通过外源质粒表达引入 *ldhL* 基因,其在工业化生产中需要添加抗生素来维持菌株的稳定,增加生产成本。为了解决菌株产乳酸稳定性问题,Zhou^[13]等通过染色体插入技术将外源 *ldhL* 基因插入 *ldhA* 基因内部,使 *ldhA* 基因不能表达,外源 *ldhL* 基因获得表达。其构建的工程菌 SZ85 没有质粒,无抗性基因存在,且发酵过程中产生 98% 高纯度 L-乳酸。

本研究拟选用大肠杆菌工程菌 SZ470 为出发菌株,该菌株敲除了 4 基因 ($\Delta frdBC$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta ackA$ 、 $\Delta focA-pflB$),并通过无氧启动子融合表达 ($\Delta pdhR::pflBp6-pflBrbs-aceEF-4pd$) 技术倍增了 NADH 还原力,具有高效同型乙醇发酵特性^[14-15]。在该菌株基础上,拟通过基因同源重组技术敲除其 *adhE* 基因,同时插入带有自身启动子的乳酸片球菌 *P. acidilactici* 的 *ldhL* 基因^[13],并通过厌氧管无氧进化筛选,获得一株可有效利用五碳糖的产高纯度 L-乳酸的大肠杆菌工程菌。所构建工程菌代谢途径如图 1 所示。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Escherichia coli* SZ470^[14-15]、*Escherichia coli* SZ85^[13] 为美国北伊利诺伊大学周胜德教授惠赠,现保存于本实验室,其中 SZ470 来源于野生菌株 *E. coli* B,其丙酮酸甲酸裂解酶 (*focA-pflB*)、延胡索酸还原酶 (*frdBC*)、乙酸激酶 (*ackA*)、D-乳酸脱氢酶 (*ldhA*) 4 个基因缺失;*E. coli* SZ85 基因组中包含有 *P. acidilactici* 的 L-乳酸脱氢酶基因片段,其带有自身启动子;*E. coli* W、温度敏感型的质粒 pKD46 (包含编码重组系统的基因)、pKD4 (包含 FRT-kan-FRT 阅读框)、FLP 重组酶的表达质粒 pCP20 由实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA Marker、PCR Master Mix 购自 Fermentas 公司,细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自天根生物有限公司,氨苄青霉素和卡那霉素均购自 Mersco 公司,L-阿拉伯糖购自 Sigma 公司,蛋白胨和酵母粉为购于 Oxiod 公司,分析纯葡萄糖、木糖、氯化钠和琼脂购于国药集团化学试剂有限公司合成。所用仪器和所购公司分别为:超净工

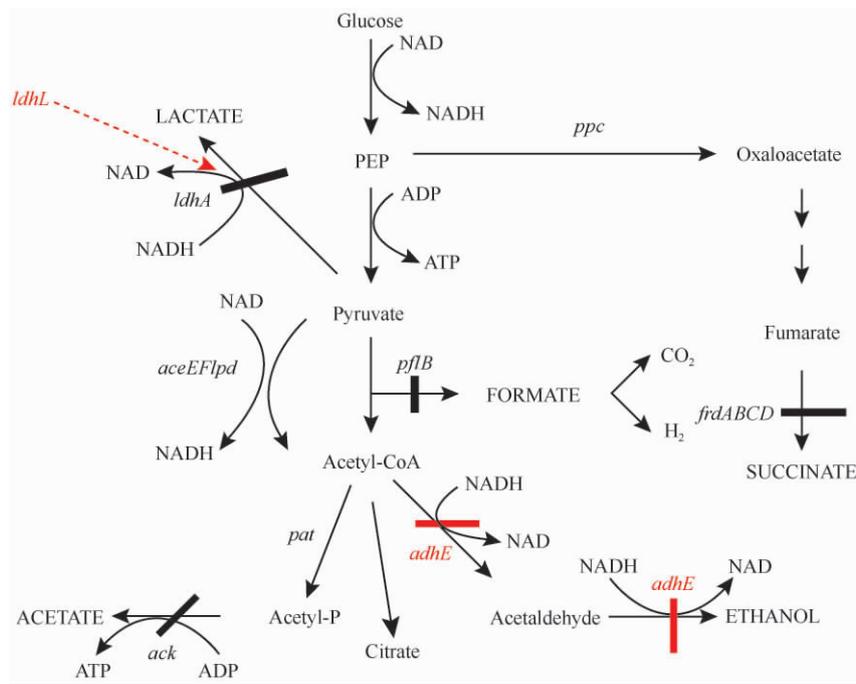


图 1. L-乳酸大肠杆菌基因工程菌构建示意图^[11]

Figure 1. The construction of recombinant *Escherichia coli* for L-lactic acid production. The bold line denote the enzymatic step is blocked by deletion of the corresponding chromosomal genes. In the constructed *E. coli* strains, the *P. acidilactici* *ldhL* coding region with transcriptional terminator was integrated.

作台(苏州苏洁净化设备有限公司)、高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、恒温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司)、恒温振荡培养箱(上海智诚分析仪器制造有限公司)、移液器(德国 Eppendorf 公司)、mycycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、电击转化仪器(美国 Bio-Rad 公司)、发酵罐(上海保兴生物工程设备有限公司)。

1.1.3 培养基: LB 液体培养基、LB 固体培养基^[13];种子用培养基:LB 液体培养基中加 2% 的葡萄糖或木糖。发酵用培养基:LB 液体培养基中加 6% 的葡萄糖或木糖。

1.2 PCR 引物设计

根据 GenBank 登录的 *P. acidilactici* 的 *ldhL* 基因(登录号:AY205156)序列设计特异性引物 P₁和 P₂;引物 P₃、P₄为两侧带 *adhE* 同源臂的卡那霉素抗性基因敲除片段的扩增引物,靠近 5'端未加下划线的序列与 *adhE* 基因序列相同,靠近 3'端加下划线的序列与质粒 pKD4 上卡那霉素抗性基因序列一致;引物 P₅、P₆为 *adhE* 基因敲除后的验证引物;引物 P₇、P₈为 *ldhL* 基因插入后的验证引物(注:在 JH12 染色体上的插入位点为 1386874-1389549)。

扩增基因的引物名称和引物序列见表 1。

表 1. 重组基因的同源引物和鉴定引物
Table 1. Primers for deletion and identification of *adhE* and *ldhL*

Name of primer	Primer sequences (5'→3')
P ₁	CCTATTATTTATGGCGGTGTCGTTT
P ₂	CAGTTCGCTGACTGTAAGTTGTTGC
P ₃	ATGGCTGTFACTAATGTCGCTGAACCTTAACGCA CTCGTAGAGCGTGT <u>TAGGCTGGAGATGCTTC</u>
P ₄	TAAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCAGCTTTA GCCGAGCAGCCATATGAATATCCTCCTTAG
P ₅	TGATGAAGGCTAATGCTG
P ₆	CTTACGCCACCTGGAAGT
P ₇	GGTCTAGTTACGCATTCC
P ₈	CTTCTTCTTTTCGTCATCG

P₁ P₂ represent the amplifying primers for *ldhL*; P₃ P₄ represent the amplifying primers for *adhE*; P₅ P₆ represent the identifying primers for *adhE* deletion; P₇ P₈ represent the identifying primers for *ldhL* insertion.

1.3 *P. acidilactici* *ldhL* 基因扩增

提取培养 10 h 的 *E. coli* SZ85 总 DNA 为模板,以 P₁和 P₂为引物,扩增 *ldhL* 基因全长 ORF,同时使其带有自身的启动子和调控系统。反应程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 45s,50℃ 45s,72℃ 2.5 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.4 *E. coli* SZ470 *adhE* 基因敲除

根据 *adhE* 基因序列设计特异性引物 P₃ 和 P₄, 该对引物一端与 *adhE* 基因序列一致, 另一端为卡那霉素抗性基因序列。以 pKD4 质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 得到两端带有 *adhE* 同源臂的卡那霉素抗性基因片段。扩增条件为: 95℃ 3 min; 95℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。用 CaCl₂ 法将 pKD46 转化到 *E. coli* SZ470 细胞中, 经过氨苄青霉素抗性平板筛选后得到阳性菌落。通过电转方法将扩增的卡那霉素抗性基因片段电转到 L-阿拉伯糖诱导过的 *E. coli* SZ470/pKD46 感受态细胞中, 30℃ 复苏培养 2 h 后, 立刻涂布于含卡那霉素的 LB 培养基抗性平板上。37℃ 培养 24 h 后, 挑取较大菌落接种于装满 LB 液体培养基的无氧管中, 观察其生长状况。反复 3 轮培养后, 挑取在卡那霉素抗性平板上成长良好而在无氧管中无法生长的单菌落, 以 P₅P₆ 为引物进行 PCR 验证。

1.5 抗性基因的消除

将 pCP20 质粒转化到已成功敲除 *adhE* 基因的卡那霉素抗性阳性菌株, 30℃ 培养 1 h 后, 涂于无抗性平板上, 42℃ 过夜培养, 热诱导促进 FLP 重组酶表达, 同时质粒也逐渐丢失。挑取在无抗性平板上生长良好而在抗性平板上不能生长的菌落, 命名为 *E. coli* JH01, 用于后续 *ldhL* 基因的插入实验。

1.6 *ldhL* 基因染色体插入

用 CaCl₂ 法将 pKD46 转化到上述抗性基因消除后的 *adhE* 基因缺失菌株中 JH01, 经氨苄青霉素抗性平板筛选后得阳性转化子, 再通过电转方法将扩增的 *P. acidilactici* 的 L-乳酸脱氢酶 *ldhL* 基因扩增片段转入其中, 30℃ 复苏培养 3-4 h 后, 涂布于 LB 固体平板上, 37℃ 培养 24 h 后观察菌落的生长情况, 将能生长且较好的菌株标记出来并在无氧管中进行反复筛选, 分离出性状稳定的单菌落, 以 P₇P₈ 为引物进行 PCR 验证。将 *ldhL* 基因成功插入的菌株命名为 *E. coli* JH12, 摇瓶培养以验证是否有 L-乳酸的生成。

1.7 发酵罐发酵培养

将验证过的 *E. coli* JH12 单菌落活化数代后, 接入 (木糖或葡萄糖) 种子培养基中, 200 r/min, 37℃ 条件下摇瓶培养。当种子菌体浓度 (*OD*₆₀₀) 达到 1.0-1.5 左右, 按 5% 的接种量接入带有自动调节系统的 15 L 发酵罐中, 装有体积为 10 L LB 培养

基。发酵罐条件为: 分别以木糖和葡萄糖为碳源进行分批发酵, 初始糖含量 6%, 转速 200 r/min, 37℃, 以 6 mol/L KOH 作为中和剂, 采用流加方式控制 pH 稳定在 6.5 左右。定时取样, 检测 *OD* 值、残糖浓度、L-乳酸产量及其他杂酸浓度。

1.8 发酵产物分析

OD 值采用紫外分光光度计测量, 波长选定 600 nm; 所取发酵液样品在 10000 r/min 条件下离心 10 min, 去除细胞残留, 收集上清液用于测定残糖及其他代谢产物的含量。残糖含量和有机酸检测采用高效液相色谱法 (HPLC) 检测。检测条件为: Agilent 1200 series 反相高效液相色谱仪, 色谱柱为 Bio-Rad HPX 87H; 流动相: 4 mmol/L H₂SO₄ (pH 2.5); 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL; 示差检测器检测; 柱温: 35℃^[16]。

2 结果

2.1 *ldhL* 基因的扩增

以大肠杆菌 SZ85 基因组 DNA 为模板, 扩增 *P. acidilactici* 的乳酸脱氢酶 (*ldhL*) 基因。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明 (图 2), 扩增片段大小与预期大小相符。

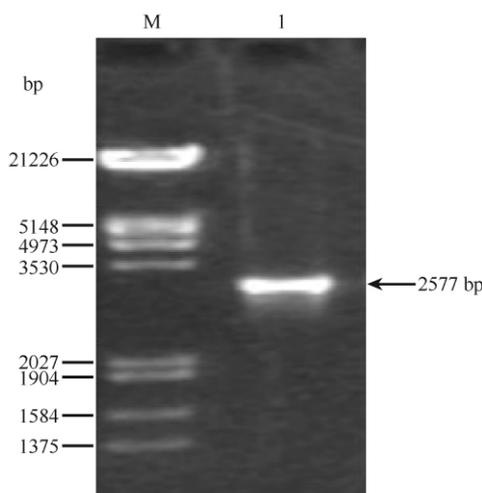


图 2. *ldhL* 基因 PCR 产物凝胶电泳图谱

Figure 2. Analysis of PCR by Agarose gel electrophoresis. M, Marker (λ DNA/EcoR I/Hind III); Lane 1. PCR product of *ldhL*.

2.2 重组大肠杆菌 JH01 的构建及鉴定

用鉴定引物 P₅P₆ 对工程菌株 SZ470 和缺失 *adhE* 基因的工程菌 JH01 分别进行 PCR 验证。PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 结果显

示, SZ470 的 PCR 扩增片段大小约为 3 kb, 具有卡那霉素抗性基因的 JH01 扩增的 PCR 片段大小约为 1.5 kb, 结果如图 3 所示, 与理论预测值一致。此外, 我们还采用了无氧管培养的方法对基因敲除进行了验证。其原理为当 SZ470 的乙醇脱氢酶基因被敲除后, 在无氧条件下 NADH 无法氧化为 NAD^+ , 糖酵解则无法继续下去, 因而 *adhE* 缺失工程菌无法利用葡萄糖实现正常生长。我们对 PCR 验证的菌株进一步用无氧管中进行了培养, 挑取在无氧条件下无法正常生长的菌株, 即为 JH01。

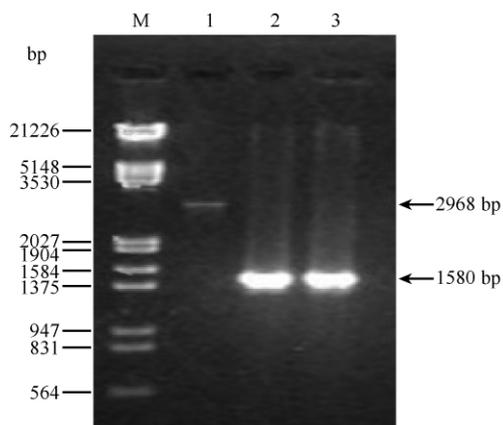


图 3. *E. coli* JH01 *adhE* 敲除后的 PCR 验证

Figure 3. PCR test of *E. coli* JH01 deleting the *adhE* gene on agarose electrophoresis. M, Marker (λ DNA/*EcoRI*/*HindIII*); Lane 1, PCR product of SZ470; Lane 2, PCR product of JH01.

2.3 重组大肠杆菌 JH12 的构建及鉴定

将扩增的 *ldhL* 基因电击转化进入 JH01/pKD46 菌株中, 转化子用鉴定引物 P_7P_8 对插入 *ldhL* 基因的工程菌 JH12 进行 PCR 验证, 以 *E. coli* JH01、*E. coli* SZ85 基因组为对照。结果如图 4-A 所示, 从图中可以看出: *E. coli* JH01 中未能扩增出 *ldhL* 基因片段, *E. coli* JH12 和 *E. coli* SZ85 均扩增出序列大小为 840 bp 的基因片段, 表明 *ldhL* 基因已成功的插入到 JH12 基因组上。

JH01 由于 NDAH 积累而在厌氧条件下无法正常生长, 利用染色体重组技术将带自身启动子和调控区的 *P. acidilactici* L-乳酸脱氢酶基因插入到 JH01 基因组上, 厌氧条件下糖酵解产生的 NADH 可以依靠 L-乳酸脱氢酶的作用将 NADH 氧化 NAD, 同时将糖酵解产物丙酮酸还原为 L-乳酸, 所获得的工程菌 JH12 在无氧管中就能重新恢复生长。将 PCR

验证的菌株转接于无氧管中培养, 以 *E. coli* JH01、*E. coli* W 为对照。经 24 h 培养后观察生长现象。由图 4-B 可以看出, JH12 生长明显优于对照 *E. coli* JH01 菌株, 但与野生菌株 *E. coli* W 相比, 生长相对较差。可能由于工程菌代谢途径被改造或置换, 一般在生长前期需要较长时间的适应期, 因此发酵初期生长情况比野生菌株要缓慢一些。

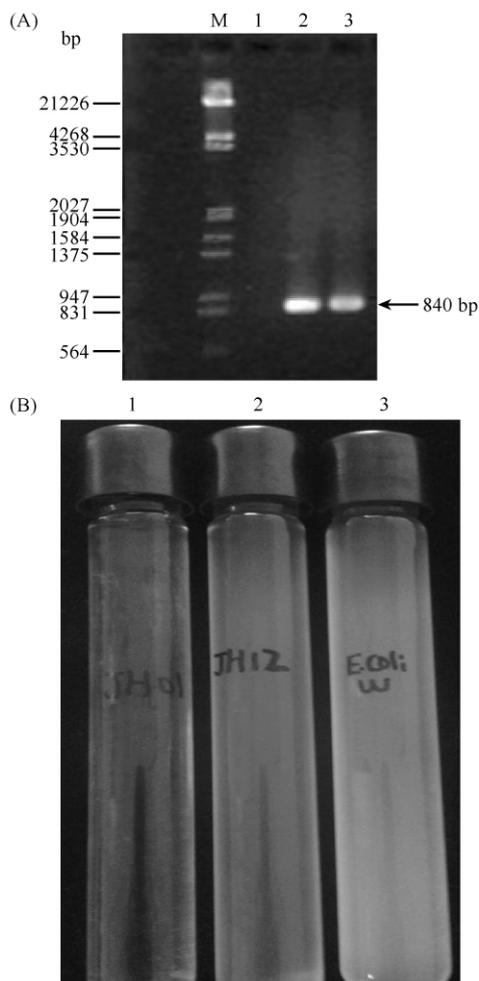


图 4. *E. coli* JH01 *ldhL* 插入后的 PCR 验证 (A) 无氧管生长情况 (B)

Figure 4. PCR test (A) and anaerobic growth (B) of *ldhL* integration strain *E. coli* JH01. A: M, Marker: λ DNA/*EcoRI*/*HindIII*; Lane 1, *E. coli* JH01; Lane 2, *E. coli* JH12; Lane 3, *E. coli* SZ85; B: 1, *E. coli* JH01; 2, *E. coli* JH12; 3, *E. coli* W.

为了进一步验证 L-乳酸脱氢酶 (*ldhL*) 插入到正确的染色体的位置并能表达, 将无氧管中的 24 h 发酵液离心收集上清液, 并用 HPLC 检测其残糖及有机酸的含量 (以 JH01 为对照菌株)。液相图谱如图 5 所示。

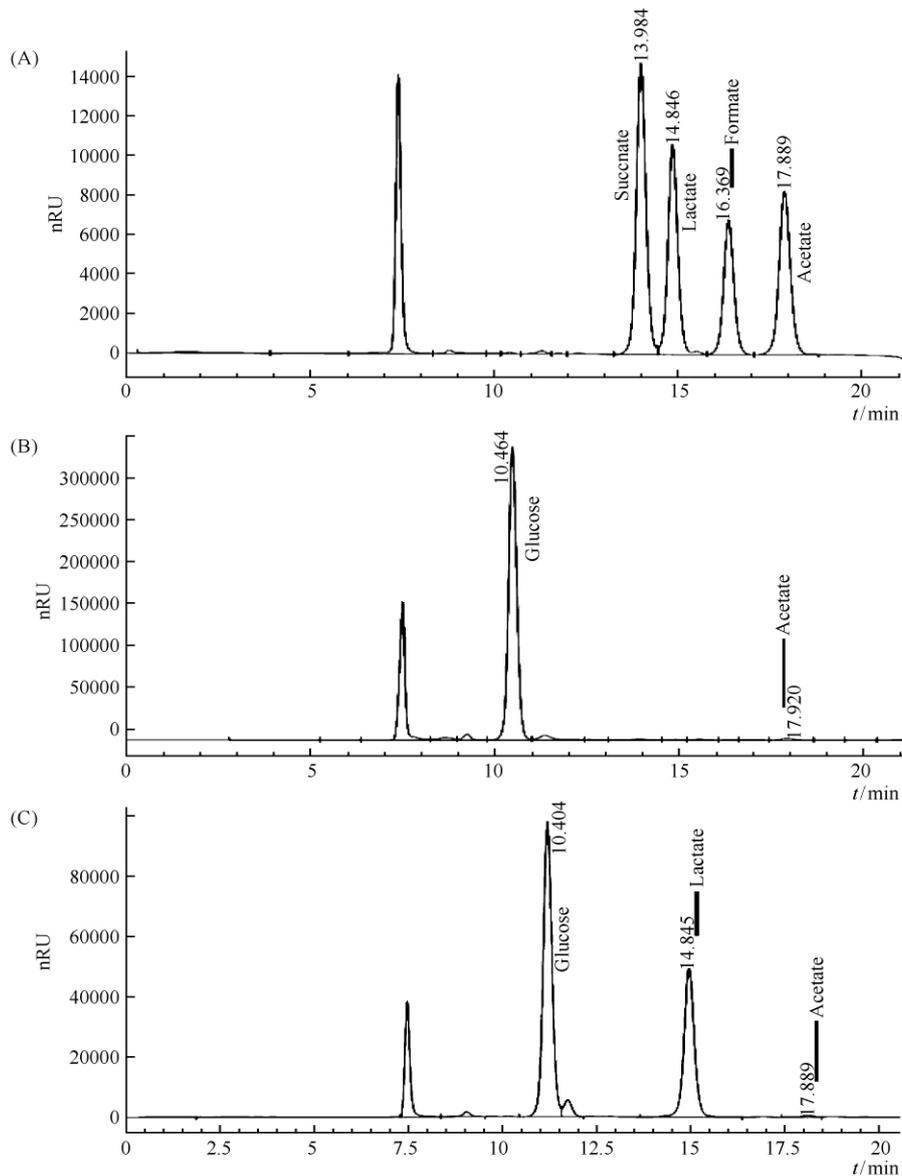


图 5. 摇瓶发酵液的 HPLC 图谱分析

Figure 5. HPLC profiles of fermentation products. A: standard sample of mixed acid; B: JH01; C: JH12.

图 5-A 为琥珀酸, 乳酸, 甲酸, 乙酸的混合酸对照样品的出峰情况, JH01 只有在 17.9min 乙酸出峰处有小峰出现 (图 5-B), 而 JH12 除了在 17.9min 乙酸出峰处有峰出现外, 在 14.8 min 乳酸出峰处也有峰出现, 并且峰面积明显大于乙酸峰面积 (图 5-C), 表明发酵液中有乳酸的积累。图 6 结果表明, *ldhL* 基因已插入到 JH12 的基因组中, 并成功表达。将菌株在平板上连续接种 5 代, 以初始葡萄糖浓度 60 g/L, 37°C 条件下发酵, 考察其产乳酸的稳定性, 产酸结果见图 6, 由图可见该菌株连续传代 5 次产酸没

有明显变化, 说明该菌株的遗传稳定性较好。

2.4 发酵罐发酵

为了初步了解重组菌株 *E. coli* JH12 在发酵罐中产 L-乳酸的水平, 本实验采用带有 pH 自动调节器的 15 L 发酵罐为反应器进行厌氧发酵培养。采用 LB 液体培养基, 装液量为 10 L, 初始糖浓度为 6%, 控制发酵罐转速为 200 r/min, 温度为 37°C, 发酵过程中用 6 mol/L KOH 作为中和剂。

重组大肠杆菌 JH12 在利用葡萄糖为碳源发酵中, 发酵到 12 h 其 OD_{600} 达到最大值, 为 4.09, 如图 7-

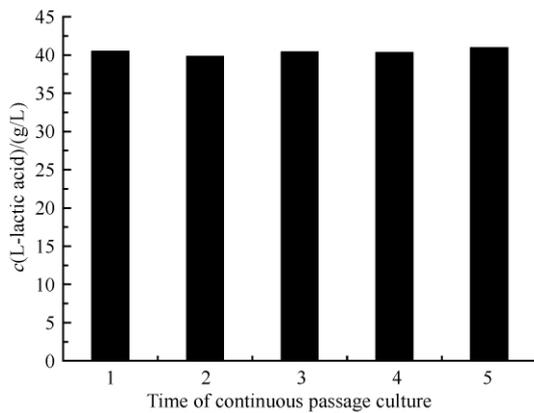


图 6. *E. coli* JH12 的遗传稳定性实验

Figure 6. Lactate fermentation of five times of continuous passage culture.

A 所示。发酵液中主要代谢产物为乳酸,仅有少量乙酸的生成,无琥珀酸、甲酸、乙醇产生。乳酸产量在36 h达到最高值,为41.13 g/L,此时乙酸的产量很低,为1.45 g/L,而残糖含量大幅度下降,仅有6.05 g/L。发酵过程中葡萄糖的消耗速率为1.46 g/(L·h),乳酸生产强度为1.14 g/(L·h),发酵产物中L-乳酸纯度(乳酸占总代谢产物的比率)达95.69%。乳酸产量质量收率为78.41%。36 h之后,葡萄糖继续消耗,乳酸产量基本保持不变,乙酸产量略有提高。到60 h时,残糖浓度为3.61 g/L,发酵罐停止自动加碱,发酵体系中不再产酸,发酵结束。

重组大肠杆菌 JH12 在利用木糖为碳源发酵中,发酵到36 h其 OD_{600} 达到最大值,为2.37,如图7-B所示。经120 h发酵,乳酸产量累积为34.73 g/L,乙酸产量维持在1 g/L左右,最终残糖为10.78 g/L,相对于葡萄糖发酵,发酵前36 h木糖的消耗速率为0.88 g/(L·h),乳酸生产强度为0.60 g/(L·h),L-乳酸发酵产物中杂酸少,乳酸的纯度(乳酸占总代谢产物的比率)高达98%。乳酸产量最大质量收率为67%。

3 讨论

近年来国内外大肠杆菌利用外源基因发酵生产高纯度L-乳酸研究已有报道,国外Chang等人首先将来自干酪乳杆菌 *L. casei* 的 *ldhL* 基因转入磷酸转乙酰酶 (*pta*) 和 *ldhA* 双缺失大肠杆菌中,所获得的

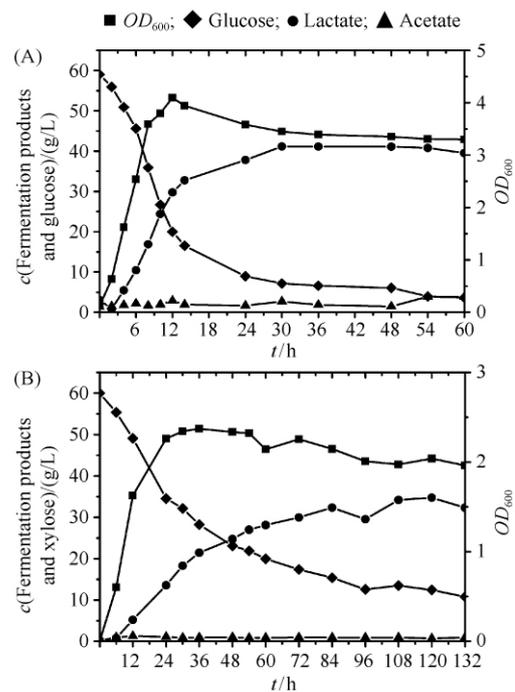


图 7. *E. coli* JH12 利用 6% 还原糖发酵后的产物浓度

Figure 7. Fermentation concentration of 6% reducing sugar by JH12. A: Glucose; B: Xylose.

重组菌株经过有氧-厌氧两阶段发酵,其L-乳酸产量达到45 g/L^[17]。2001年Dien等人克隆了牛链球菌 *Streptococcus bovis* 的 *ldhL* 基因,并利用低拷贝质粒将其转化到 *ldhA* 和 *pfl* 双缺失大肠杆菌细胞中,获得工程菌 FBR11 的L-乳酸产量可达到73 g/L^[18]。为了增加大肠杆菌工程菌中外源基因的稳定性,使其更适合工业化生产,Zhou^[15]等通过染色体插入技术引入外源基因,将乳酸片球菌的L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 插入 *SZ63* ($\Delta focA$ -*pflB*、 $\Delta frdBC$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ackA$) 的染色体中,同时破坏其基因组中 *ldhA* 基因,得到重组大肠杆菌 *SZ85*,经48 h厌氧发酵后检测乳酸浓度为439 mmol/L (39.5 g/L),乳酸纯度达到98%。在其后的研究中,利用 *ldhL* 基因取代 TG114 菌株染色体的 *ldhA* 基因,所得菌株能在无机盐营养条件下,有效发酵生产120 g/L的L-乳酸,其旋光纯度达99.5%左右^[19],这是迄今为止报道的L-乳酸产量最高的大肠杆菌工程菌。

目前国内大多数L-乳酸工程菌的构建都是利用表达载体携带外源 *ldhL* 基因转化到大肠杆菌细胞中,并依靠抗生素作为筛选标记^[20-22]。如,杨登峰^[23]等利用外源质粒将鼠李糖乳杆菌

(*Lactobacillus rhamnosus*) L-乳酸脱氢酶基因转化到 *ldhA* 和 *pflB* 双缺失的大肠杆菌 FMJ144 中, 摇瓶发酵得到 3.5 g/L 的 L-乳酸; 袁剑^[24] 等克隆了乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) 的 *ldhL* 基因, 利用 pET-28a 表达载体将其转化到 *E. coli* BL21 中, 经过表达、纯化后对其 L-乳酸脱氢酶活力进行了测定。与国外相比, 国内目前构建的 L-乳酸大肠杆菌工程菌产量普遍偏低, 且由于质粒自身稳定性差, 使细胞极易丢失表达性状。发酵培养过程需要异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 的诱导, 也增加了操作的难度。

本研究所构建的 *E. coli* JH12 是以本实验室构建的高效同型乙醇发酵工程菌 SZ470 为出发菌株。SZ470 在野生菌株 *E. coli* B 中已经敲除了乙醇生成的竞争途径 *focA-pflB*、*frdBC*、*ackA* 和 *ldhA*, 同源重组敲除乙醇脱氢酶后, 为高纯度 L-乳酸的生成提供良好基础; 此外, 研究中乳酸片球菌的 *ldhL* 基因来源于工程菌 SZ85^[13], 其自身带有启动子, 无需依靠外源表达质粒。本研究在构建过程中巧妙的利用 SZ470 在敲除乙醇脱氢酶后无法在厌氧管中正常生长, 而通过染色体插入技术将带有自身启动子的外源 L-乳酸脱氢酶基因 (*ldhL*) 插入能恢复生长的特点, 很好的解决了构建过程中阳性转化子的筛选工作。构建工程菌 JH12 不包含有外源质粒, 稳定性好。所构建的工程菌 *E. coli* JH12 其原始母本来源于野生菌株 *E. coli* B, 因此该菌株可以有效利用五碳糖发酵, 进一步扩大了其底物利用范围。JH12 在以 6% 葡萄糖为碳源, 发酵罐转速为 200 r/min, 温度为 37°C 条件下发酵, 得到 L-乳酸产量为 41.13 g/L, 杂酸产量少, L-乳酸纯度为 95.69%。在以 6% 木糖为碳源的同等发酵条件下, L-乳酸的产量达到 34.73 g/L, L-乳酸的纯度高达 98%。后续将进一步驯化其乳酸耐受能力, 并通过发酵工艺优化来提高其 L-乳酸的产量和纯度。

本实验通过基因敲除、染色体插入, 成功地将 *P. acidilactici* 的 *ldhL* 基因整合到大肠杆菌染色体上, 进一步通过无氧进化筛选技术, 筛选获得一株同型 L-乳酸发酵工程菌, 为利用大肠杆菌生产 L-乳酸提供了参考依据。为进一步提高其五碳糖的利用效率, 后续我们将敲除 *ptsG* 基因, 改造其葡萄糖磷酸转移酶系统, 并探索其利用廉价生物质资源发酵产 L-乳酸的相关特性, 为开发高效、低成本 L-乳酸工业

化生产提供技术支持和数据参考。

参考文献

- [1] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44 (2): 163-172.
- [2] Tian K, Zhou L, Chen X, Zuo Z, Shi G, Wang Z. Fermentation of L-lactic acid and synthesis of poly (L-lactic acid). *China Biotechnology*, 2011, 31 (2): 102-115. (in Chinese)
田康明, 周丽, 陈献忠, 左志锐, 石贵阳, 王正祥. 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.
- [3] Yu D, Zhou X, Wang J, Wang Q, Tian W. L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Industrial Microbiology*, 2000, 30 (3): 4-7. (in Chinese)
虞东胜, 周晓燕, 王健, 王勤, 田文阳. 米根霉发酵生产 L-乳酸. 工业微生物, 2000, 30 (3): 4-7.
- [4] Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (3): 413-423.
- [5] Bai D, Zhao X, Li X, Xu S. Advances in fermentation of green platform biochemical (+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Modern Chemical Industry*, 2002, 22 (6): 9-13. (in Chinese)
白冬梅, 赵学明, 李鑫钢, 徐世民. 米根霉发酵生产 L(+)-乳酸研究进展. 现代化工, 2002, 22 (6): 9-13.
- [6] Hujanen M, Linko S, Linko YY, Leisola M. Optimisation of media and cultivation conditions for L (+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56 (1-2): 126-130.
- [7] Yang D, Guang N, Pan L, Huang R. Construction of recombinant *E. coli* strain for producing high-purity L-Lactate. *China Brewing*, 2009, 5: 1-3. (in Chinese)
杨登峰, 关妮, 潘丽霞, 黄日波. 微生物发酵 L-乳酸的研究进展. 中国酿造, 2009, 5: 1-3.
- [8] Zhou J, Yu L. Study on L-lactic acid fermentation of *Bacillus coagulans*. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2005, 27 (1): 70-73. (in Chinese)
周剑, 虞龙. 产 L-乳酸凝结芽孢杆菌发酵条件的初步研究. 氨基酸和生物资源, 2005, 27 (1): 70-73.

- [9] Qin H, Zhang W, Ge X, Kang C. Study on screening the high L-lactic acid production strain of *Lactobacillus casei* and its fermentation conditions. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32 (7) : 223-225. (in Chinese) 秦浩, 张伟国, 葛向阳, 康传利. 高产 L-乳酸干酪乳杆菌的选育及发酵条件研究. *食品工业科技*, 2011, 32 (7) : 223-225.
- [10] Li Y, Yu L, Gong W, Qian M, Huang S, Chen X. Application of *Bacillus coagulans* and its mixed fermentation for L-lactic acid. China: CN102653725A. 2012. 李玉燕, 虞龙, 龚文静, 钱梦宇, 黄思思, 陈晓双. 一种凝结芽胞杆菌及其在混合发酵产 L-乳酸中的应用. 中国: CN102653725A. 2012.
- [11] Clark DP. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 63 (3) : 223-234.
- [12] Zhu Y, Eiteman MA, DeWitt K, Altman E. Homolactate Fermentation by Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73 (2) : 456-464.
- [13] Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO. Functional replacement of the *Escherichia coli* d-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the l-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (4) : 2237-2244.
- [14] Wang Y, Manow R, Finan C, Wang J, Garza E, Zhou S. Adaptive evolution of nontransgenic *Escherichia coli* KC01 for improved ethanol tolerance and homoethanol fermentation from xylose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38 (9) : 1371-1377.
- [15] Manow R, Wang J, Wang Y, Zhao J, Garza E, Iverson A, Finan C, Grayburn S, Zhou S. Partial deletion of *rng* (RNase G)-enhanced homoethanol fermentation of xylose by the non-transgenic *Escherichia coli* RM10. *Journal of industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39 (7) : 977-985.
- [16] Wang Y, Tian T, Zhao J, Wang J, Yan T, Xu L, Liu Z, Garza E, Iverson A, Manow R. Homofermentative production of d-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2012: DOI 10.1007/s10529-012-1003-7.
- [17] Chang D E, Jung H C, Rhee J S, Pan JG. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65 (4) : 1384-1389.
- [18] Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ. Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2001, 27 (4) : 259-264.
- [19] Grabar TB, Zhou S, Shamugam K T, Yomano LP, Ingram LO. Methyal glyoxal bypass identified as the source of chiral contamination in L(+) and D(-) lactate produced by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*. 2006, 28 (10) : 1527-1535.
- [20] Chen W, Wang C, Wang L, Wei Y, Huang R. Construction of engineered *Escherichia coli* producing L-lactate. *Journal of Guangxi Agric and Biol Science*, 2007, 26: 16-21. (in Chinese) 陈五九, 王成华, 王利英, 韦宇拓, 黄日波. 产 L-乳酸的大肠杆菌基因工程菌的构建. *广西农业生物科学*, 2007, 26: 16-21.
- [21] Huang Y, Wei Y, Zhang L, Chen F, Huang R. Cloning and expression of L-lactate dehydrogenase gene from *pediococcus acidilactici* in *E. coli*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12 (1) : 68-71. (in Chinese) 黄彦, 韦宇拓, 张黎, 陈发忠, 黄日波. 乳酸片球菌 L-乳酸脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. *应用与环境生物学报*, 2006, 12 (1) : 68-71.
- [22] Zheng Z, Jing S, Zhang J, Luo S, Pan L, Jiang S. Cloning of L-lactate dehydrogenase gene (*ldnL*) from *Rhizopus oryzae* and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Hefei University of Technology*, 2006, 29 (4) : 489-491. (in Chinese) 郑志, 姜绍通, 章建国, 罗水忠, 潘丽军, 蒋诗平. 米根霉 L-乳酸脱氢酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. *合肥工业大学学报*, 2006, 29 (4) : 489-491.
- [23] Yang D, Pan L, Guan N, Huang R. Construction of recombinant *E. coli* strain for producing high-purity L-Lactate. *Modern Food Science Technology*, 2010, 26 (2) : 126-128. (in Chinese) 杨登峰, 潘丽霞, 关妮, 黄日波. 产高纯度 L-乳酸大肠杆菌基因工程菌的初步研究. *现代食品科技*, 2010, 26 (2) : 126-128.
- [24] Yuan J, Qin H, Ge X, Zhang W. Overexpression, purification and properties of *ldhL* gene from *Lactobacillus*

casei in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2011, 38 (10): 1482-1487. (in Chinese)
袁剑, 秦浩, 葛向阳, 张伟国. 干酪乳杆菌 L-乳酸脱

氢酶在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质. 微生物学通报, 2011, 38 (10): 1482-1487.

Production of L-lactic acid from pentose by a genetically engineered *Escherichia coli*

Jinfang Zhao^{1, 2}, Liyuan Xu¹, Yongze Wang¹, Xiao Zhao¹, Jinhua Wang^{1, 2*}

¹Key Laboratory of Fermentation Engineering of Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China

²Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Wuhan 430068, China

Abstract: [Objective] In this study, we constructed a recombinant *Escherichia coli* strain for the production of high-purity L-lactic acid, using a homoethanol fermenting mutant *E. coli* SZ470 ($\Delta frdBC \Delta ldhA \Delta ackA \Delta focA-pflB \Delta pdhR::pflBp6-pflBrbs-aceEF-lpd$) as the starting strain. [Methods] By using homologous recombination, we deleted the *adhE* gene from SZ470 to obtain a mutant *Escherichia coli* JH01, which could not grow under anaerobic conditions. Then we cloned the L-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) of *Pediococcus acidilactici* and inserted it into the chromosome of JH01 via electroporation to obtain a recombinant strain *Escherichia coli* JH12. We evaluated the L-lactic acid production of the recombinant strain in a 15 L fermenter. [Results] In 10 L LB medium supplemented with 6% glucose, JH12 maintained maximal cell growth and an efficient L-lactic acid production rate for 36 h. Glucose consumption rate achieved was 1.46 g/(L·h) and L-lactic acid production rate was 1.14 g/(L·h). The results also show that 41.13 g/L lactic acid was produced, achieving a purity of 95.69% (based on total fermentation products). Xylose consumption rate was 0.88 g/(L·h) and L-lactic acid production rate was 0.60 g/(L·h). The production of lactic acid was 34.73 g/L, achieving a purity of 98%. There were no succinic acid and formic acid detected and only little amount of acetic acid generated during the fermentation. [Conclusion] We constructed a homolactic acid fermentation strain *E. coli* JH12, which could efficiently convert glucose and xylose into high-purity L-lactic acid. JH12 could have great potential in industrial fermentation for L-lactic acid production.

Keywords: genetically engineered *Escherichia coli*, L-lactate, homologous recombination, chromosomal gene integration, pentose

(本文责编:王晋芳)

Supported by the China National Natural Science Foundation (NSFC31070094), by the Hubei Province of Science Foundation (2011CDA008), by the Hubei Provincial Department of Education (Q20121405) and by the Chutian Scholar Program of Hubei Province of China

* Corresponding author. Tel: +86-27-59750487; Fax: +86-27-88026461; E-mail: wangjinhua@mail.hbut.edu.cn

Received: 27 August 2012/Revised: 17 December 2012