

# 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

陆静娴, 李志敏, 叶勤, 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

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): 59–69.

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): 59–69.

**摘要:** 聚 3-羟基丁酸乳酸酯 [Poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate), P(3HB-co-LA)], 属于聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 家族的一员, 是一种具有良好生物相容性和可降解性的天然高分子生物材料。文中通过在大肠杆菌中引入来源于富养罗斯通氏菌 *Ralstonia eutropha* 的  $\beta$ -酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶、来源于丙酸梭菌 *Clostridium propionicum* 的丙酰 CoA 转移酶突变体以及荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* strain 2P24 来源的 PHA 合成酶突变体等异源酶, 成功实现了一步法利用葡萄糖合成 P(3HB-co-LA), 其中乳酸组分的摩尔百分比达到 1.6%, 聚合物含量为 83.9 wt%。在此基础上, 通过敲除辅酶 Q8 合成所需的黄素异戊烯基转移酶基因 (*ubiX*) 来弱化呼吸链水平, 从而增强乳酸积累, 并进一步缺失乳酸脱氢酶基因 (*dld*) 以减少乳酸在发酵后期转化成丙酮酸, 最终将 P(3HB-co-LA) 中乳酸组分的摩尔百分比提高至 14.1%, 而聚合物含量为 81.7 wt%。上述实验结果表明, 采用弱化呼吸链水平策略可有效提高聚合物中乳酸组分的摩尔百分比, 从而提供了一种改变生物合成聚合物中单体组分含量的新思路。

**关键词:** 聚 3-羟基丁酸乳酸酯, 大肠杆菌, 代谢工程, 乳酸组分, 呼吸链弱化, Q8, 聚羟基脂肪酸酯(PHA)

## Effect of reducing the activity of respiratory chain on biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) in *Escherichia coli*

Jingxian Lu, Zhimin Li, Qin Ye, and Hui Wu

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

**Abstract:** Poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) [P(3HB-co-LA)] belongs to the polyhydroxyalkanoates (PHA) family and

**Received:** March 25, 2018; **Accepted:** May 3, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 21776083), National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFB0309302), Foundation of Key Laboratory for Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, China (No. 2015101).

**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), 工业生物催化教育部重点实验室开放课题 (No. 2015101) 资助。

网络出版时间: 2018-05-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180512.1122.001.html>

possesses promising properties including biocompatibility and biodegradability. In this study, we directly synthesized P(3HB-co-LA) with glucose by introducing the  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase from *Ralstonia eutropha*, the engineered propionate CoA transferase from *Clostridium propionicum* and the engineered polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2P24 into *Escherichia coli*. The polymer content was 83.9% (W/W), and the molar percentage of lactate reached 1.6%. On this basis, in order to accumulate lactate, we reduced the activity of respiratory chain by deleting the *ubiX* gene, which is involved in the synthesis of coenzyme Q8. Moreover, we removed the *dld* gene to avoid the conversion of lactate to pyruvate during the fermentation. With these manipulations, the molar percentage of lactate in the polymer was improved to 14.1%, with an 81.7% (W/W) of polymer content. The test results indicated that the strategy of reducing the activity of respiratory chain effectively increased the lactate units in the polymer, and it contributed a new approach to change the content of monomer components in the polymer.

**Keywords:** poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate), *Escherichia coli*, metabolic engineering, lactate fraction, reduced respiration chain activity, Q8, polyhydroxyalkanoates (PHA)

石化基聚合物塑料的生产需要消耗不可再生资源,在生产和焚烧过程中排放温室气体,降解困难,存在诸多的资源和环境问题。生物基聚合物采用生物发酵可再生资源的生產方式,且能自然降解,给上述问题的解决提供了有效的途径,在国内外引起了广泛关注<sup>[1-4]</sup>。聚 3-羟基丁酸乳酸酯[P(3HB-co-LA)]是聚羟基脂肪酸酯(PHA)家族的一员。P(3HB-co-LA)的机械性能和物理性能与常规塑料类似,并具有很多优点,如良好的生物降解性、生物相容性和低毒性,可用于生物医学、食品及日常用的高价值材料<sup>[5-9]</sup>。P(3HB-co-LA)的聚合单体来源于 3-羟基丁酸和乳酸。作为共聚物, P(3HB-co-LA)与刚性的聚乳酸(PLA)<sup>[10]</sup>、不透明且呈脆性的聚 3-羟基丁酸(PHB)均聚物相比,弹性和透明度更优。这意味着 P(3HB-co-LA)具有更广阔的应用前景<sup>[11-12]</sup>。

2008 年 Taguchi 等<sup>[13]</sup>首次在大肠杆菌中成功合成聚羟基丁酸乳酸酯[P(3HB-co-LA)],其中聚合物的乳酸组分的摩尔百分比为 6%。为了提高聚合物中乳酸的含量, Yamada 等<sup>[14]</sup>通过厌氧发酵,将聚合物中乳酸组分的摩尔百分比提高至 47%。厌氧培养可以有效积累乳酸,但厌氧培养严重阻碍了菌体的生长,同时阻碍菌体中聚合物的积累,因此聚合物含量仅为 2 wt%。同年 Yang 等<sup>[15]</sup>通过易错 PCR 和饱和突变分别增加了  $Pct_{cp}$  对乳酸的

底物特异性,以及 PhaC<sub>1PS6-19</sub> 对 2-羟基丙酰 CoA 的底物特异性,在添加前体 3HB 的情况下生产出乳酸组分的摩尔百分比达 49%,聚合物含量为 53.5 wt%的 P(3HB-co-LA)。

P(3HB-co-LA)中乳酸组分的摩尔百分比的限制条件之一是胞内乳酸的生产水平。为了在有氧条件下增加乳酸的积累,需要弱化呼吸链水平。Wu 等<sup>[16]</sup>通过敲除辅酶 Q8 生物合成途径中的 UbiX,引入辅酶 Q8 合成的底物竞争途径,减弱呼吸链关键成分辅酶 Q8 的合成,降低呼吸链活性,进而在有氧发酵中实现乳酸积累。本研究采用此调控新策略,通过减弱呼吸链强度来营造细胞微耗氧能力,希望实现在提高共聚物 P(3HB-co-LA)的聚合前体乳酸浓度的同时,减弱厌氧环境对细胞生长和聚合物合成造成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

研究所使用的菌株和质粒见表 1,质粒构建和基因敲除所使用的引物见表 2。

#### 1.1.2 试剂

高保真 PCR 酶 primerstar、高保真 T4-DNA 连接酶、DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sac* I 和 *BamH* I 酶,均购自 TaKaRa 公司; Clone

表 1 本文中所用到的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Strains and plasmids		Description	Source
<b>Plasmids</b>			
pTrc99a		<i>trc</i> promoter, Amp resistant	Our laboratory
pBAD33		<i>ara</i> promoter, Chl resistant	Our laboratory
pTrc99aABC		pTrc99a containing the codon-optimized <i>phaCm</i> gene from <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 2P24, <i>phaA</i> and <i>phaB</i> gene from <i>Ralstonia eutropha</i>	This study
pBAD $pct_{th}$		pBAD33 containing the codon-optimized <i>pct_{th}</i> gene from <i>Clostridium propionicum</i> DSM 1682	This study
pKD46		<i>araBp-gam-bet-exo</i> , <i>repA101(ts)</i> , <i>oriR101</i> , Amp resistant	Our laboratory
pCP20		FLP recombinase, Amp resistant, Kan resistant	Our laboratory
<b>Strains</b>			
MG1655		Wild-type	Our laboratory
JX04		MG1655 $\Delta ubiX$	Our laboratory
JX041		MG1655 $\Delta ubiX\Delta dld$	This study
MG-C		MG1655 carrying pTrc99aABC and pBAD33	This study
MG-01		MG1655 carrying pTrc99aABC and pBAD $pct_{th}$	This study
JX04-01		JX04 carrying pTrc99aABC and pBAD $pct_{th}$	This study
JX041-01		JX041 carrying pTrc99aABC and pBAD $pct_{th}$	This study

Express<sup>®</sup> MultiS One Step Cloning Kit 试剂盒购自诺唯赞公司；异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷、L-阿拉伯糖、氨苄青霉素、氯霉素等购自捷思基因技术有限公司；琼脂糖购自阿拉丁试剂公司；胶回收试剂盒，质粒小提试剂盒等购自生工生物工程公司；三氯甲烷、甲醇购自国药集团。

### 1.1.3 培养基

种子培养基 (LB 液体培养基) 每升含：酵母提取物 5 g，胰蛋白胨 10 g，氯化钠 10 g，根据需加入氨苄青霉素 100 mg 和氯霉素 34 mg。

发酵培养基 (M9 培养基) 每升含：葡萄糖 20 g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15.1 g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g， $\text{NaCl}$  0.5 g， $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g， $\text{CaCl}_2$  0.011 g，vitamin B<sub>1</sub> 10 mg 和微量元素储存液 0.1 mL。按需加入氨苄青霉素 100 mg 和氯霉素 34 mg。不添加乳酸。微量元素储存液每升含有  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  80 g， $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 g， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0 g， $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0 g， $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.0 g， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  10 g， $\text{CoCl}_2$  4.0 g， $\text{H}_3\text{BO}_4$  0.5 g。

## 1.2 方法

### 1.2.1 重组菌的构建

通过基于  $\lambda$ -red 重组系统介导的 PCR 产物一步法<sup>[17]</sup>敲除 *E. coli* MG1655 中的 *ubiX* 基因，得到单缺失菌 JX04。在单缺失菌 JX04 的基础上敲除 *dld* 基因，得到双缺失菌 JX041。为了增加 PHA 合成酶 (PhaC) 对 2-羟基丙酰 CoA 的聚合能力，需要对 PhaC 设计氨基酸突变。通过与 Taguchi 等<sup>[13]</sup>和 Yang 等<sup>[15]</sup>研究中使用的 PhaC 突变体进行氨基酸序列比对，本实验中荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* strain 2P24 来源的 PhaCm 的 3 个氨基酸突变位点分别设计为 E130D、S325T、Q481K。突变体 *phaCm* 基因由生工生物工程公司经过密码子优化合成。

*phaA* 基因通过酶切位点 *EcoR* I 和 *Sac* I 酶切连接到 pTrc99a 上，*phaB* 基因通过诺唯赞公司的 Clone Express<sup>®</sup> MultiS One Step Cloning Kit 试剂盒连接到 pTrc99a 上，*phaCm* 基因通过酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切连接到 pTrc99a 上，这 3 个基因串联构建了质粒 pTrc99aABC。突变体 *pct\_{th}* 基因来源于丙

表 2 本文中所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>phaA</i> -F	CCC <u>GAATTC</u> ATGACTGACGTTGTTCATCG	28
<i>phaA</i> -R	GCCGAGCTCTTATTTGCGCTCGACTGCC	28
<i>phaB</i> -F	ATGACTCAGCGCATTGCG	18
<i>phaB</i> -R	TCAGCCCATATGCAGGCC	18
pTrc99aA-F	GGCCTGCATATGGGCTGACCTGCCGTACACAGGAAAC	38
pTrc99aA-R	CAATGCGCTGAGTCATGTCCACTCCTTGATTGGCTTCGT	38
<i>phaCm</i> -F	CAGGGATCCGAGGAGGACAGCTATGAGCAACAAGAACAACG	41
<i>phaCm</i> -R	GCC <u>AAGCTT</u> CTACCGCTCATGCACATAAGTGCCGGGTGC	39
<i>pct<sub>th</sub></i> -F	GCGAGCTCTAAGGAGGTTATAAAAAATGAGAAAGGTTCCCATATTACCG	50
<i>pct<sub>th</sub></i> -R	CGCCCGGGTCAGGACTTCATTTCCTTCAGACC	32
<i>ubiX-k</i> -F	ATGAAACGACTCATTGTAGGCATCAGCGGTGCCAGCGGCGCATTTATGGCG TCTTGAGCGATTGTGTAG	70
<i>ubiX-k</i> -R	TTATGCGCCCTGCCAGCGGGCAAAGAGATCTTCAGGAAGGGTTATCGCACA AGATCCGCAGTTCAACC	68
<i>ubiX-y</i> -F	GCAAGTCTGACAGGGCAAC	19
<i>ubiX-y</i> -R	CCTGAAACAGGGCAACAG	18
<i>dld-k</i> -F	ATGTCTTCCATGACAACAACCTGATAATAAAGCCTTTTGAATGAACTTGCTCG TCCGTCTTGAGCGATTGTGTAG	75
<i>dld-k</i> -R	AGGTTGAACTGCGGATCTTGAATCCGGGGATCGGTAAAACCAGTAAACGG AAAAACTGGCAGGAAGTGGAGTAA	75
<i>dld-y</i> -F	CAAGGCGCTATTCTAGTTTG	20
<i>dld-y</i> -R	GACGGCACAGAACGATTAAG	20

Enzyme restriction sites are underlined.

梭菌 *Clostridium propionicum* DSM 1682, 包含 1 个氨基酸突变 V193A 和 4 个沉默突变 (T78C, T669C, A1125G, T1158C), 通过 *Sac* I 和 *Sma* I 位点酶切连接到 pBAD33 质粒上, 将其命名为 pBAD*pct<sub>th</sub>*。

### 1.2.2 摇瓶发酵

重组菌在含有 100 mg/L 的氨苄青霉素和 34 mg/L 的氯霉素的 LB 培养基中 37 °C、220 r/min 过夜培养。随后按 1%(V/V)的接种量转入 M9 培养基中, 250 mL 摇瓶的装液量为 50 mL, 在培养温度为 30 °C, 转速为 220 r/min 的条件下, 发酵培养 48 h, 并加不同浓度的 IPTG 和 *L*-阿拉伯糖诱导。取样时间点为 0、12、24、36、48 h。所有的摇瓶发酵设置 3 个平行, 最终结果为 3 个平行的平均值。

### 1.2.3 HPLC 分析

发酵过程中葡萄糖、乳酸、乙酸的浓度用

HPLC 测定。将-20 °C 冻存的上清液常温解冻后稀释, 用 0.22 μm 的水相微孔滤膜过滤。检测条件如下: 流动相为 2.5 mmol/L 稀硫酸, 色谱柱为 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA), 流速 0.5 mL/min, 柱温 50 °C, 进样量 20 μL, 检测器为示差检测器。通过与葡萄糖、乳酸、乙酸标样的标准曲线比对, 得出发酵过程中葡萄糖、乳酸、乙酸的代谢情况。

### 1.2.4 聚合物的萃取和分析

用于气相检测的样品处理方法: 将发酵液冷冻干燥 2 d 后, 称取约 15 mg 干菌体, 加入 1.5 mL 氯仿和 1.5 mL 酯化液 (85 wt% 甲醇, 15 wt% 硫酸, 1 g/L 苯甲酸) 100 °C 恒温萃取 4 h。冷却后, 加入 750 mL 的去离子水, 旋涡振荡 2 min, 3 000 r/min 低速离心 3 min。取下层 (氯仿层), 经无水硫酸钠干燥后, 用 0.22 μm 的有机相微孔滤膜过滤。

D-乳酸和 3HB 标样用同样的方法处理<sup>[18]</sup>。

细胞中聚合物的含量和单体组成通过 GC-2014 气相色谱仪 (岛津, 日本) 测定。色谱柱为 rx-5 毛细管柱, 长 30 m, 内径 0.25 mm。检测器为火焰离子化检测器。使用高纯氮气为载气, 氢气为燃气, 空气为助燃气。使用 AOC-20S 型自动化进样器, 乙醇作为清洗剂。GC 分析程序为: 开始时于 54 °C 停留 4 min, 再以 5 °C/min 的速度升温至 125 °C, 随后以 20 °C/min 的速度升温至 180 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 聚羟基丁酸乳酸酯合成途径的打通

聚羟基丁酸乳酸酯[P(3HB-co-LA)]的前体为

2-羟基丙酰 CoA 和 3-羟基丁酰 CoA。其中 2-羟基丙酰 CoA 由乳酸和乙酰 CoA 经过丙酰 CoA 转移酶突变体 ( $Pct_{th}$ ) 催化合成, 3-羟基丁酰 CoA 是由乙酰 CoA, 通过来源于罗尔斯通氏菌 *Ralstonia eutropha* 的  $\beta$ -酮基硫解酶 ( $PhaA$ ) 和 NADPH 依赖的乙酰乙酰 CoA 还原酶 ( $PhaB$ ), 经过两步催化转化而成。这两个前体经过来源于 *Pseudomonas fluorescens* strain 2P24 的 PHA 合成酶突变体 ( $PhaCm$ ) 的聚合形成共聚物, 聚合物的代谢途径如图 1A 所示。通过 pTrc99a 质粒表达  $phaA$ 、 $phaB$  和  $phaCm$ , 构建质粒 pTrc99aABC。通过 pBAD33 质粒表达  $pct_{th}$ , 构建质粒 pBAD $pct_{th}$ 。质粒 pTrc99aABC 和 pBAD $pct_{th}$  的构建如图 1B 所示。

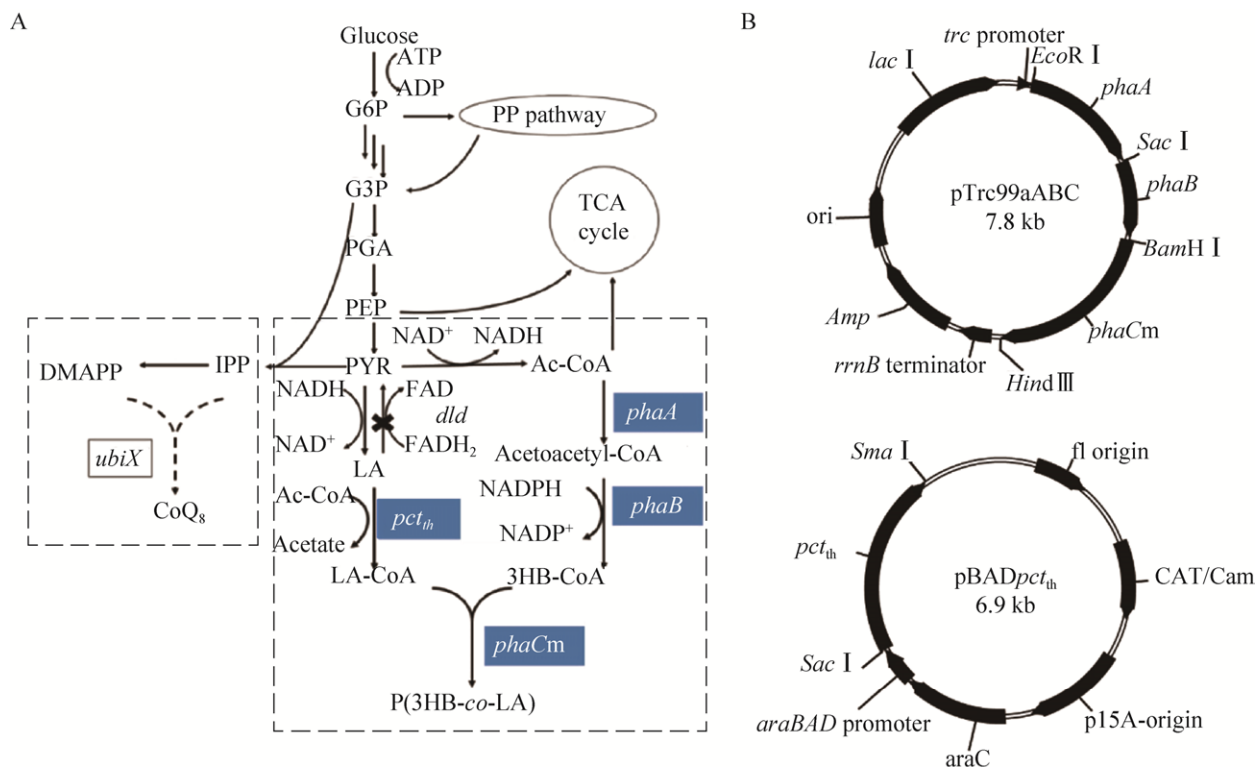


图 1 代谢工程大肠杆菌中 P(3HB-co-LA) 合成途径 (A) 和重组质粒 pTrc99aABC、pBAD $pct_{th}$  构建图 (B)

Fig. 1 Poly(3-hydroxybutyrate-co-lactate) synthesis pathway in metabolically engineered *E. coli* (A) and construction of recombinant plasmids pTrc99aABC and pBAD $pct_{th}$  (B). The genes shown are as follows:  $phaA$ ,  $\beta$ -ketothiolase;  $pct_{th}$ , evolved propionyl-CoA transferase;  $phaB$ , NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase;  $phaCm$ , evolved polyhydroxyalkanoate synthase;  $ubiX$ , flavin prenyltransferase;  $dld$ , D-lactate dehydrogenase;  $idi$ , IPP isomerase. Metabolites shown are as follows: G6P, glucose 6-phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; PGA, 3-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; LA, lactate; LA-CoA, lactyl-CoA; Ac-CoA, acetyl-CoA; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate.

将带有 pTrc99aABC 和 pBAD $p_{ct_{th}}$  的重组大肠杆菌命名为 MG-01, 将携带 pTrc99aABC 和 pBAD33 质粒的重组大肠杆菌命名为 MG-C。其中, MG-C 不携带  $p_{ct_{th}}$  基因, 为对照菌株。气相结果显示, 在培养基中不添加乳酸的条件下, 不含  $p_{ct_{th}}$  基因的 MG-C 菌株发酵生产的聚合物中不含乳酸组分, 即生产的是均聚物 PHB。而使用 MG-01 菌株时, 聚合物中有乳酸组分出现, 聚合物中乳酸组分的摩尔百分比达到 1.6%, 聚合物含量为 83.9 wt%。这表明  $p_{ct_{th}}$  具有合成 2-羟基丙酰 CoA 的能力。因此通过引入外源的 *phaA*、*phaB*、 $p_{ct_{th}}$  和 *phaCm*, 我们成功地在 大肠杆菌 中建立起了聚羟基丁酸乳酸酯合成途径。

## 2.2 调节 P(3HB-co-LA)合成途径对聚合物中乳酸单体含量的影响

### 2.2.1 不同强度 $P_{ct_{th}}$ 酶表达的影响

虽然以上实验可得到共聚物, 但聚合物中乳酸组分的摩尔百分比比较低, 仅为 1.6%, 因此推测可能是由于 PHA 的底物 2-羟基丙酰 CoA 的浓度较低造成的。由图 1 可知, 在胞内积累 2-羟基丙酰 CoA, 最直接的方法就是增强催化乳酸转化为 2-羟基丙酰 CoA 的  $P_{ct_{th}}$  酶的催化活性。

合适的蛋白折叠是发挥酶生物活性的重要因素, 而诱导剂浓度是影响蛋白折叠的重要因素之一<sup>[19]</sup>。因此, 通过设置诱导剂 *L*-阿拉伯糖的浓度梯度来优化  $P_{ct_{th}}$  酶的表达。如图 2 所示, 当诱导剂 *L*-阿拉伯糖的浓度从 10 mmol/L 上升到 50 mmol/L 时, 聚合物中乳酸组分的摩尔百分比也由 1.9% 上升至 4.0%。而  $p_{ct_{th}}$  基因表达的增强对聚合物在细胞中的含量影响不大, 聚合物含量维持在 79 wt% 到 84 wt% 之间。当诱导剂 *L*-阿拉伯糖浓度高于 40 mmol/L 时, 聚合物中乳酸含量增加不明显。这可能是因为尽管随着诱导剂浓度增加, 阿拉伯糖启动子达到诱导极限,  $P_{ct_{th}}$  酶的蛋白表达量几乎无变化; 或者, 由于底物乳酸或者辅酶 A 供

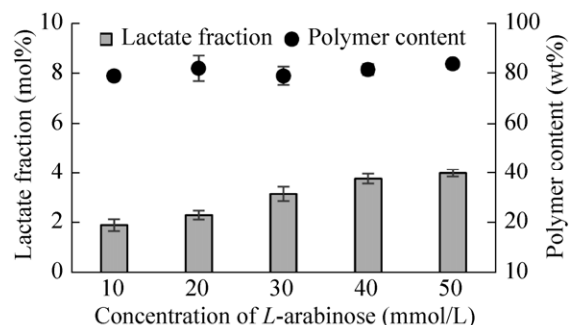


图 2 *L*-arabinose 浓度梯度下聚合物含量及聚合物中 LA 含量的变化

Fig. 2 Content changes of polymer and LA fraction with different *L*-arabinose concentrations.

应的限制, 聚合物中乳酸的摩尔百分比无法得到提高。基于实验结果, 50 mmol/L 的 *L*-阿拉伯糖进行下一步实验。

### 2.2.2 不同强度 PHA 合成途径的影响

在聚合物的合成过程中, 胞内的乙酰 CoA 既是合成 3HB-CoA 的底物, 又是 2-羟基丙酰 CoA 的辅酶 A 供体, 即 2-羟基丙酰 CoA 的积累与 3HB-CoA 的生成存在竞争关系。因此, 提高 2-羟基丙酰 CoA 的供应需要减弱 3HB-CoA 的生产。但另一方面, 3HB-CoA 是 P(3HB-co-LA)聚酯合成的引发剂, 是其合成所必需的<sup>[20]</sup>, 若胞内 3HB-CoA 的含量太低, 不利于聚合物的合成。为了平衡这一矛盾, 需要选出合适的 IPTG 浓度来诱导聚合途径。

如图 3 所示, 当 IPTG 浓度为 0.01 mmol/L 和 0.02 mmol/L 时, 聚合物中乳酸组分的摩尔百分比均低于 1%。这表明当 IPTG 浓度过低时, PHA 聚合酶接受底物 2-羟基丙酰 CoA 的效率降低, 这同样影响了聚合物中乳酸组分的摩尔百分比。当 IPTG 浓度为 0.05 mmol/L 时, 聚合物中乳酸组分的摩尔百分比提高到 4.2%。当 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时, 聚合物中乳酸组分的摩尔百分比达到峰值 5.1%, 此时聚合物占细胞干重的比例也达到最小值 76.2 wt%。当 IPTG 浓度高于 0.1 mmol/L, 聚合物中的乳酸组分的摩尔百分比略有下降。根据实验结果, 选用 0.1 mmol/L 的 IPTG 进行下一步实验。

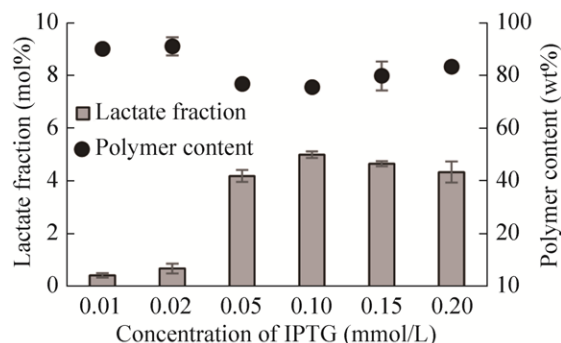


图3 IPTG 浓度梯度下聚合物含量及聚合物中乳酸含量的变化

Fig. 3 Content changes of polymer and LA fraction with different IPTG concentrations.

### 2.3 呼吸链弱化对聚合物合成前体供应的影响

提高 P(3HB-co-LA) 中乳酸单体含量的另一策略是增强胞内乳酸的积累。针对重组大肠杆菌 MG-01 进行了不同装液量 (50、75 和 100 mL) 的摇瓶 (250 mL) 发酵实验, 结果表明乳酸积累的峰值会随着装液量的增加而提高, 但会造成较高浓度的乙酸的积累, 这会使菌体干重和聚合物含量的下降, 从而影响聚合物产量。与此同时, Yamada 等<sup>[14]</sup>在厌氧条件下发酵生产 P(3HB-co-LA) 的实验证明了通氧量降低对菌体生长的影响。Wu 等<sup>[16]</sup>的调控策略表明通过弱化呼吸链水平可以有效积累乳酸, 同时减少对菌体生长的影响。辅酶 Q8 是呼吸链的重要组成, 通过减弱辅酶 Q8 的生成, 可以弱化呼吸链水平。在大肠杆菌中, UbiX 和 UbiD 是一对同工酶, 共同参与辅酶 Q8 生物合成的初期阶段, 将 4-羟基-3-辛酰基苯甲酸 (HP<sub>8</sub>B) 转换为 2-辛酰基苯酚。通过 *ubiD* 或 *ubiX* 基因的单缺失可以将大肠杆菌中的 Q8 含量减少至野生型的 20%–25%。因此文中构建了 *ubiX* 基因缺失的突变株 JX04 (图 4), 拟通过此策略部分降低辅酶 Q8 的合成, 从而减弱突变株的呼吸链强度。

Choi 等<sup>[21]</sup>发现, 在接近发酵后期时, D-乳酸

的浓度减少, 这是由于 *dld* 基因编码的 D-乳酸脱氢酶将 D-乳酸反转为丙酮酸。为了消除这一现象对聚合物中乳酸组分的摩尔百分比的影响, 如图 4 所示, 我们在 JX04 中进一步敲除 D-乳酸脱氢酶基因, 得到双缺失菌, 将其命名为 JX041。

在添加了 20 g/L 葡萄糖的 M9 培养基中摇瓶培养 36 h 以观察野生菌和缺失菌的生长和乳酸积累情况。如图 5A 所示, 与 MG1655 相比, 单缺失菌 JX04 和双缺失菌 JX041 的生长都有所放缓, 这是由于弱化呼吸链造成的生长迟缓。最终, 单缺失菌和双缺失菌的干重均能达到野生型水平。JX04 和 JX041 消耗的葡萄糖与 MG1655 相近, MG1655 积累较多的乙酸, 而 JX04 和 JX041 中乳酸的积累量较多, 整体 pH 变化相似。由于聚合途径未引入, 细胞没有蛋白过表达及聚合物合成的代谢负担, 因此弱化呼吸链只造成生长迟缓, 但未影响到最终的细胞浓度。

三种宿主菌的乳酸积累如图 5C 所示, JX04 和 MG1655 的乳酸积累均在摇瓶培养的 15 h 左右

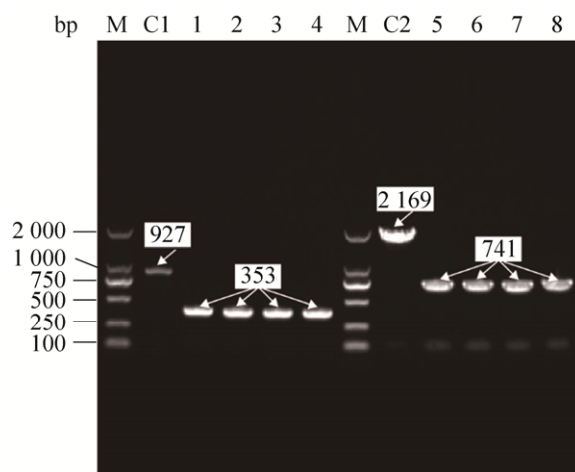


图4 *ubiX*、*dld* 基因敲除菌落 PCR 验证电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR identification of *ubiX* knockout in MG1655 and *dld* knockout in MG1655Δ*ubiX*. M: marker; C1: MG1655 control group; C2: MG1655Δ*ubiX* control group; 1–4: MG1655Δ*ubiX*; 5–8: MG1655Δ*ubiX*Δ*dld*.

达到峰值。其中,单缺失菌 JX04 的乳酸峰值为 0.21 g/L,是野生型 MG1655 的 2 倍。这表明弱化呼吸链可以有效积累乳酸。与野生型和单缺失菌不同,双缺失菌 JX041 在摇瓶培养后期的乳酸浓度呈上升状态,摇瓶培养终点时乳酸积累达 0.28 g/L。这表明 D-乳酸脱氢酶基因的敲除有效抑制了乳酸在发酵后期的利用。值得一提的是,在摇瓶培养结束时,两种缺失菌积累的乙酸含量均为 0.8 g/L,是野生型的 61.5%。这表明,敲除 *ubiX* 基因在有效积累乳酸的同时,减少了乙酸副产物的生成。即碳代谢流由积累乙酸的方向转向生成乳酸的方向。

## 2.4 弱化呼吸链水平对聚羟基丁酸乳酸酯合成的影响

将包含了 pTrc99aABC 和 pBAD $p_{ctb}$  质粒的野生菌、单缺失菌和双缺失菌分别命名为 MG-01、JX04-01 和 JX041-01。在 M9 培养基中添加 0.1 mmol/L

IPTG、50 mmol/L L-阿拉伯糖和 20 g/L 葡萄糖,摇瓶发酵培养 48 h,以评价重组菌的性能。生长方面,如图 6A 所示,单缺失菌 JX04-01 菌体干重为 2.5 g/L,双缺失菌 JX041-01 菌体的干重为 2.6 g/L,分别为 MG-01 的 62.5%和 65.0%。菌体干重的差异一方面可能是由于加入双质粒后,外源聚合途径的引入以及聚合物合成所需要的底物和能量使细胞代谢负担加大,弱化呼吸链造成的细胞能量差别效应也随之加大,导致了 JX04-01 和 JX041-01 生长受到一定的限制。另一方面,大肠杆菌代谢过程中,副产物乙酸的积累会严重影响重组大肠杆菌的蛋白合成与生长。MG-01 在聚合物生产过程中积累的乙酸被重新利用,在发酵后期乙酸浓度降低为 0 g/L。与缺失菌相比,MG-01 在发酵过程中可以保持较低的乙酸浓度和更适宜的 pH 值,因此其菌体干重高于 JX04-01 和 JX041-01。乳酸积累方面,如图 6C 所示,加入双质

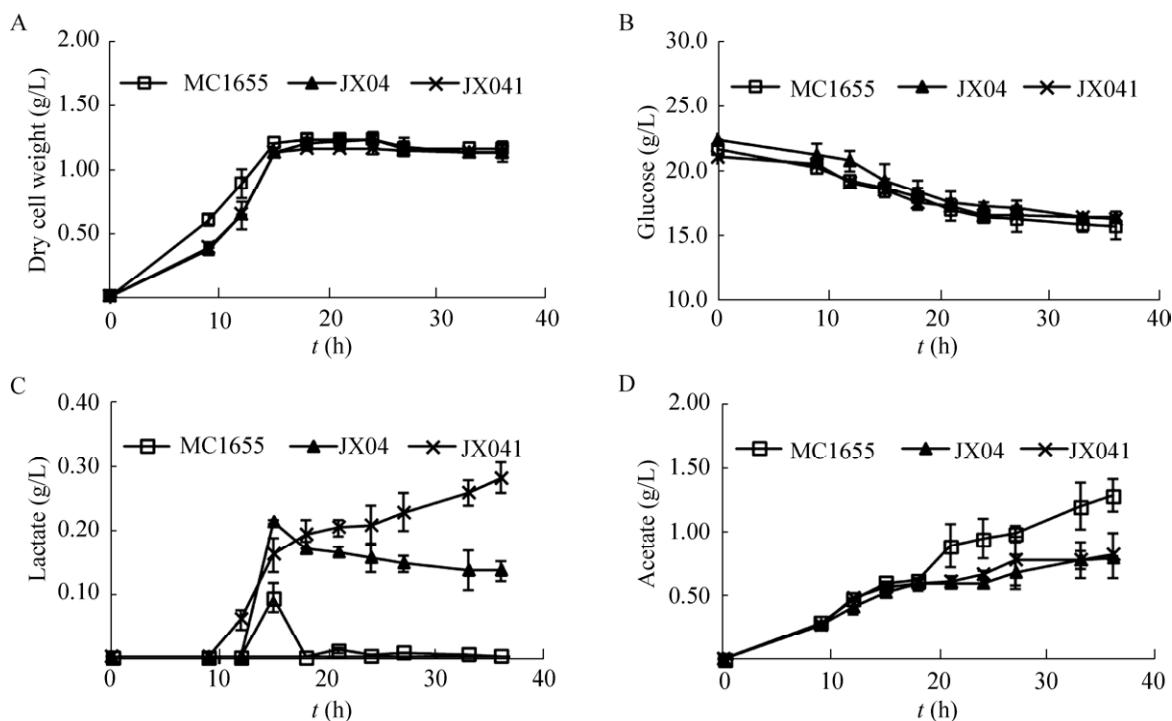


图 5 三种宿主菌的生长和代谢

Fig. 5 Time-courses of cell density (A), glucose (B), lactate (C), and acetate (D) for three different host strains.

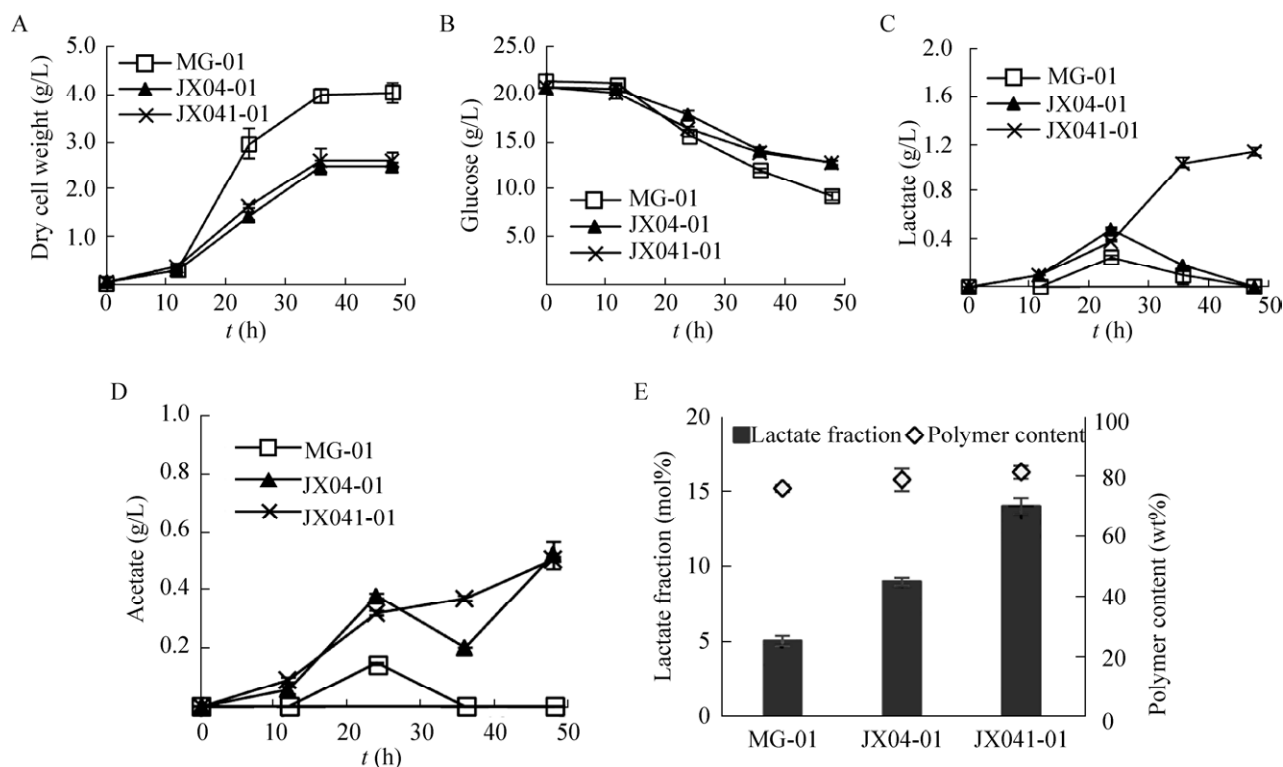


图 6 3 种重组菌的生长、代谢和聚合物生产情况

Fig. 6 Time-courses of cell density (A), glucose (B), lactate (C), acetate (D) and polymer production (E) for three recombinant strains.

粒后, 双缺失菌 JX041-01 的乳酸积累在发酵后期可达 1.1 g/L。

聚合物生产方面, 如图 6E 所示, 在单缺失菌 JX04-01 中生产 P(3HB-co-LA), 乳酸组分的摩尔百分比可由 5.1% 提高至 9.1%。在双缺失菌中, 共聚物中的乳酸组分的摩尔百分比可进一步提高至 14.1%, 是野生型中的 2.8 倍。这表明, 胞内乳酸含量的积累有益于提高聚合物中乳酸组分的摩尔百分比。胞内的聚合物含量在 3 种重组菌中无明显变化, 保持在 76.3 wt%–81.7 wt% 之间。同时在双缺失菌中, 聚合物产量可达到 2.1 g/L, 为野生型的 68.9%。实验结果表明, 弱化呼吸链水平同时敲除 *dld* 基因的策略可有效提高聚合物中乳酸组分的摩尔百分比, 聚合物在胞内的含量无明显变化。

### 3 结论

本研究通过在大肠杆菌中过表达  $\beta$ -酮硫解酶、乙酰乙酰 CoA 还原酶、丙酰 CoA 转移酶突变体和 PHA 合成酶突变体, 实现了由葡萄糖一步法合成 P(3HB-co-LA)。在最初合成的聚合物中, 乳酸组分的摩尔百分比仅为 1.6%, 为了提高共聚物中乳酸的含量, 通过增加 *L*-阿拉伯糖浓度来增强 Pct<sub>th</sub> 酶的表达, 通过设置较低的 IPTG 浓度梯度, 在限制碳代谢流流向 3HB-CoA 方向的同时维持 PHA 聚合酶的表达, 从而将聚合物中乳酸组分的摩尔百分比提高到 5.1%, 此时聚合物含量为 76.2 wt%。

呼吸链中辅酶 Q8 量的变化能够引起整个代谢流的重新分配。在敲除黄素异戊烯基转移酶基

因 (*ubiX*) 后, 辅酶 Q8 的生物合成部分受阻, 碳代谢流向乳酸方向积累。聚合物中乳酸组分的摩尔百分比提高到 9.1%。在此基础上进一步敲除 D-乳酸脱氢酶基因 (*dld*), 减少了乳酸在发酵后期催化成丙酮酸, 聚合物中的乳酸组分的摩尔百分比提高到 14.1%, 聚合物含量可达 81.7 wt%, 聚合物产量为 2.1 g/L。实验结果表明, 弱化呼吸链水平可有效提高 P(3HB-*co*-LA) 中乳酸组分的摩尔百分比。

**致谢** 清华大学陈国强教授为本研究提供丙酰 CoA 转移酶突变体基因(*pct<sub>th</sub>*), 在此表示衷心的感谢!

## REFERENCES

- [1] Chen GQ, Patel MK. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. *Chem Rev*, 2012, 112(4): 2082–2099.
- [2] Wu Q, Sun SQ, Yu HH, et al. Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates. *Acta Polym Sin*, 2000(6): 751–756 (in Chinese).  
吴琼, 孙素琴, 余海虎, 等. 聚羟基脂肪酸酯细菌合成的生长环境依赖性. *高分子学报*, 2000(6): 751–756.
- [3] Tsuji H. Poly(lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications. *Macromol Biosci*, 2005, 5(7): 569–597.
- [4] Chen GQ. ChemInform abstract: a microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) based Bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*, 2009, 38(8): 2434–2446.
- [5] Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic acid technology. *Adv Mater*, 2000, 12(23): 1841–1846.
- [6] Chen GQ, Jiang XR, Yao H, et al. Polyhydroxyalkanoates: Microbial Synthesis and Applications. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2017: 21–27.
- [7] Södergård A, Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog Polym Sci*, 2002, 27(6): 1123–1163.
- [8] Yin J, Che XM, Chen GQ. Progress on polyhydroxyalkanoates (PHA). *Chin J Biotech*, 2016, 32(6): 726–737 (in Chinese).  
尹进, 车雪梅, 陈国强. 聚羟基脂肪酸酯的研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(6): 726–737.
- [9] Chen GQ, Wang Y. Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Chin J Polym Sci*, 2013, 31(5): 719–736.
- [10] Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci*, 2004, 4(9): 835–864.
- [11] 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.
- [12] 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. *Metab Eng*, 2013, 15(1): 159–166.
- [13] Taguchi S, Yamada M, Matsumoto K, et al. A microbial factory for lactate-based polyester using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(45): 17323–17327.
- [14] Yamada M, Matsumoto K, Nakai T, et al. Microbial production of lactate-enriched poly[(R)-lactate-*co*-(R)-3-hydroxybutyrate] with novel thermal properties. *Biomacromolecules*, 2009, 10(4): 677–681.
- [15] 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.

- [16] Wu H, Tuli L, Bennett GN, et al. Metabolic transistor strategy for controlling electron transfer chain activity in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2015, 28: 159–168.
- [17] 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.
- [18] Gao X. Optimization and chromosomal expression of polyhydroxyalkanoates related genes in *Escherichia coli* [D]. Beijing: Tsinghua University, 2013 (in Chinese).  
高雪. 大肠杆菌中聚羟基脂肪酸酯合成基因的优化和染色体表达[D]. 北京: 清华大学, 2013.
- [19] Cheng Z, Jiang JQ, Wu H, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technol*, 2016, 200: 897–904.
- [20] Shozui F, Matsumoto K, Motohashi R, et al. Biosynthesis of a lactate (LA)-based polyester with a 96 mol% LA fraction and its application to stereocomplex formation. *Polym Degrad Stabil*, 2011, 96(4): 499–504.
- [21] 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.

(本文责编 陈宏宇)