

[文章编号] 1003-4684(2022)02-0065-05

转运基因对大肠杆菌利用木糖产 L-乳酸的影响

刘汝婷^{1,2,3}, 刘 枣^{1,2,3}, 王金华^{1,2,3}, 高 娃^{1,2,3}

(1 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068;

2 发酵工程教育部重点实验室, 湖北 武汉 430068; 3 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为加强大肠杆菌(*Escherichia coli*) WL210 利用混合糖产 L-乳酸的能力, 通过 RED 同源重组技术敲除了甲基半乳糖苷转运系统基因 *mglB*、半乳糖转运系统基因 *galP*, 构建双缺陷乳酸工程菌 WL230。结果表明: 与出发菌株 WL210 相比, 以 6% 混合糖(3% 葡萄糖和 3% 木糖)为碳源, *mglB/galP* 双基因缺陷菌株 WL230 同时可利用葡萄糖和木糖, 其木糖利用速率和乳酸生产强度分别提高了 298.92%、42.63%, 且转化率高达 90.21%。

[关键词] 乳酸发酵; *mglB* 基因; *galP* 基因; 混合糖发酵

[中图分类号] Q815 [文献标识码] A

乳酸中 L-乳酸是广泛存在和使用的物质, 大多运用于食品、化妆品、制药、纺织和化学领域^[1-2]。目前, L-乳酸的应用已经扩展到可降解塑料工业。其中的聚乳酸(PLA)可作为生物降解和生物相容的高分子材料^[3-4]。近年, 人们环保意识不断提高, 对绿色包装产品的需求量增大, 驱动了聚乳酸(PLA)的大量生产^[3]。木质纤维素在自然界广泛存在, 其水解液含有大量五碳糖和六碳糖, 主要有葡萄糖和木糖^[5-7]。纤维素物质是目前最丰富的非食物资源, 是 L-乳酸发酵的潜在底物原料, 既可避免与民争粮的局面^[8-9], 还可解除发酵过程中葡萄糖对其他碳源利用抑制问题^[10]。为进一步削弱葡萄糖效应对五碳糖的阻遏, 通过基因工程技术对大肠杆菌进行遗传改造。除了与磷酸烯醇式丙酮酸-糖类磷酸转移酶系统(PTS)^[11]密切相关, 葡萄糖效应还与甲基半乳糖苷转运系统 *mglB*、半乳糖转运系统 *galP* 等非 PTS 系统相关。江吉雄等^[12]通过敲除 *mglB* 和 *galP* 基因, 降低了混合糖发酵 D-乳酸中的葡萄糖效应, 使发酵周期缩短了约 40% 左右, 转化率提高了 2.30%; 许琼丹等^[13]通过敲除 *ptsG* 和 *mglB* 基因, 也降低了混合糖发酵乙醇中的葡萄糖效应, 使发酵周期缩短了约 36% 左右, 转化率提高了 5.80%。

基于此, 本研究以 WL210 为出发菌株。该菌株可高效利用葡萄糖产 L-乳酸, 通过 RED 同源重组技术构建 *mglB* 基因缺陷菌株 WL220, *mglB/galP* 双基因缺陷菌株 WL230, 以减弱葡萄糖阻遏效应, 提高混合糖中木糖的利用率, 为采用基于木质

纤维素等可再生原料高效生产 L-乳酸提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 本文所用的菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

菌株和质粒	特征	来源
<i>E. coli</i> WL210	<i>E. coli</i> B (Δ frdBC Δ pfIB Δ ackA Δ adhE Δ ptsG, ldhA:ldhL)	湖北工业大学周胜德团队研究室
<i>E. coli</i> WL220	<i>E. coli</i> WL210 (Δ <i>mglB</i>)	本研究
<i>E. coli</i> WL230	<i>E. coli</i> WL210 (Δ <i>mglB</i> Δ <i>galP</i>)	本研究
<i>pKD4</i>	<i>bla</i> , <i>FRT-kan-FRT</i>	湖北工业大学周胜德团队研究室
<i>pKD46</i>	<i>Red recombinase</i> , <i>temperature-conditional</i>	湖北工业大学周胜德团队研究室

1.1.2 化学试剂与仪器 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、L-阿拉伯糖, 国药集团化学试剂有限公司; DL5000 DNA Marker, PCR Master Mix, 美国 Fermentas 公司; $10\times$ TE 溶液、氨苄青霉素、卡那霉素, 浙江 Mersco 公司; PCR 引物合成, 上海生工生物工程技术有限公司。

MicroPluser 电转仪(美国 Bio-Red 公司), Mycycler PCR 仪(美国 GC 公司), Waterse 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Sartorius BB-

8846880 发酵罐(德国 Sartorius Stedim Biotech 公司)。

1.1.3 培养基 LB 液体培养基:1%胰蛋白胨,0.5%酵母粉,0.5%NaCl。LB 固体培养基:1%胰蛋白胨,0.5%酵母粉,0.5%NaCl,2%琼脂粉。选择培养基:LB 固体培养基加抗生素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素或卡那霉素)。种子培养基:LB 液体培养基中加 20 g/L 葡萄糖。

1.2 方法

1.2.1 *mglB* 和 *galP* 基因的敲除 PCR 引物设计

mglB 和 *galP* 基因的敲除 PCR 引物设计如表 2 所示。

表 2 敲除基因的引物与验证引物

引物名称	序列(5'-3')
$\Delta mglB$ -P1	ATGAATAAGAAGGTGTTAACCT-
	GTCTGCTGTGATG
	GCCAGCATGGTGTAGGCTGGAGCT- GCTTC
$\Delta mglB$ -P2	TTATTTCTTGCTGAATTCAGCCAGGT-
	TGTCTTTATCT
	ACGCCAACCATATGAATATCCTCCT- TAG
$\Delta mglB$ -P3	CTGTCTGCTGTGATGGCCAG
$\Delta mglB$ -P4	TGCTGAATTCAGCCAGGTTG
$\Delta galP$ -P1	ATGTTTAAGAAATGCATTTGCTAACCT-
	GAAAAGG
	TCGGTAAATCGGTAAACAGGGGCGGT- CAAAC
$\Delta galP$ -P2	TTAGTGGTTACGGTGTACTCATC-
	CATCTCGTTTTT
	CAGTTATCATTTTCGCGCAGTTTACG
$\Delta galP$ -P3	TCTGGCGGGATTACTCTTTG
$\Delta galP$ -P4	GGCGGTCAAACAAGGCAATG

根据 *mglB* 和 *galP* 序列设计敲除引物分别为 $\Delta mglB$ -P1、 $\Delta mglB$ -P2、 $\Delta galP$ -P1、 $\Delta galP$ -P2,如表 2 所示,该对引物 5'端 45bp 片段与 *mglB* 和 *galP* 序列同源,以 18-20 bp(表 2 中下划线序列)与质粒 pKD4 上 FRT-kan-FRT 阅读框序列同源,以 pKD4 质粒为模板,用扩增引物 $\Delta mglB$ -P1、 $\Delta mglB$ -P2、 $\Delta galP$ -P1、 $\Delta galP$ -P2 进行 PCR 扩增,获得带有 *kan* 抗性基因的敲除片段,经乙醇沉淀过夜后,切胶回收。使用 CaCl_2 法^[14]将 pKD46 转化至 WL210 的细胞中,通过氨苄平板筛选得到阳性菌落 WL210/pKD46。挑选 WL210/pKD46 单菌落细胞接种于 LB 液体培养基中,30℃ 条件下培养至 OD_{600} 为 0.4~0.7;冰水浴 35 min 后,用去离子水洗涤 5 次以上,弃去上清,得到感受态细胞 WL210/pKD46 悬浮液;取 90 μL 的菌液和 9 μL 打

靶片段混匀后进行电转。将电击后的菌液转移到预热 37℃ LB 液体培养基中,150 r/min 条件下复苏 2 h,涂布于选择性培养基,37℃ 过夜培养。挑取单菌落为模板,采用鉴定引物 $\Delta mglB$ -P1、 $\Delta mglB$ -P2 进行 PCR 验证。将成功敲除 *mglB* 基因的 WL210 菌株命名为 WL220。

敲除 *galP* 基因方法与敲除 *mglB* 基因方法相同。将成功敲除 *galP* 基因的 WL220 菌株命名为 WL230。

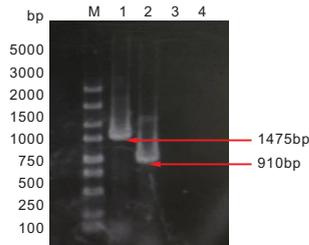
1.2.3 发酵实验 挑选单菌落 WL210、WL220、WL230 接种于含有 50 mL LB 液体培养基的锥形瓶中,150 r/min,37℃ 过夜培养 12 h 至 OD 为 1.20 左右。以 10% 的接种量接种至含有 4 L 无菌培养基中,其碳源分别为 6% 葡萄糖、6% 木糖、6% 混合糖(3% 葡萄糖和 3% 木糖),发酵条件为 37℃、200 r/min,发酵时采用 3 mol·L⁻¹ 的氢氧化钙作为中和剂,控制发酵液 pH 为 6.80。定时定点取样,测定菌体浓度 OD_{600} ,糖浓度及 L-乳酸浓度。每次发酵实验进行 3 次平行实验。

1.2.4 发酵产物检测分析 菌体浓度测定采用可见光分光光度计测定波长 600 nm 下 OD_{600} 值。L-乳酸采用生物传感仪检测法^[15];葡萄糖、木糖检测采用高效液相色谱分析,色谱柱为 Bio-Rad HPX 87H,流动相为 4 mmol·L⁻¹ H₂SO₄,流速 0.5 mL/min,柱温 40℃,检测器为 PDA、ELS 检测器^[16]。

2 结果与分析

2.1 重组菌 *E.coli* WL230 的构建

以出发菌 WL210 为对照,基因内部验证引物对菌株 WL230 进行 PCR 验证,其结果如图 1 所示。



1—*E.coli* WL210 $\Delta mglB$ 菌落 PCR 结果;
2—*E.coli* WL210 $\Delta galP$ 菌落 PCR 结果;
3、4—菌株 *E.coli* WL230 菌落 PCR 结果

图 1 *E.coli* WL210 菌株敲除 *mglB* 和 *galP* 基因的电泳图

WL210 可扩增出半乳糖转运系统基因 *galP* 和甲基半乳糖苷转运系统基因 *mglB* 片段。基因片段长度分别为 910 bp 和 1475 bp。图 1 中结果符合预期,表明重组菌 *E.coli* WL230 的 *mglB*、*galP* 片

段敲除成功。

2.2 三菌株利用葡萄糖能力对比

为了探究三菌株利用单糖葡萄糖的能力,以 6% 葡萄糖为碳源,对比 WL210, WL220 (WL210 Δ *mglB*)、WL230 (WL210 Δ *mglB* Δ *galP*) 的菌株生长情况,结果如图 2 所示。菌株 WL210、菌株 WL220 菌株 WL230 最大 OD₆₀₀ 分别为 8.13、7.26、6.80。说明敲除基因后的菌株葡萄糖的消耗速率降低,菌株生长速率变慢。

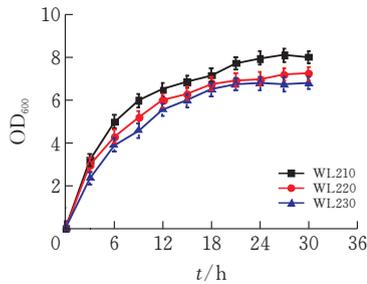


图 2 三菌株单糖发酵(6%葡萄糖)的菌株生长情况

由图 3 可知,在利用葡萄糖方面,菌株 WL210、菌株 WL220、菌株 WL230 发酵结束时间分别为 21 h、24 h、30 h,平均耗糖速率分别为 2.86 g/(L·h)、2.50 g/(L·h)、2.42 g/(L·h)。

三菌株后期耗糖速率都变慢。与出发菌 WL210 相比,菌株 WL220 和菌株 WL230 利用葡萄糖的平均速率分别降低了 12.50%、15.42%,发酵周期分别延长了 14.28%、42.86%。在生产乳酸方面,菌株 WL210、菌株 WL220、菌株 WL230 最终乳酸产量分别为 48.90 g/L、47.10 g/L、46.40 g/L,生产强度分别为 1.63 g/(L·h)、1.57 g/(L·h)、1.55 g/(L·h)。对比出发菌 WL210,菌株 WL220、菌株 WL230 的生产强度分别降低了 3.68%、5.11%。表明敲除 Δ *mglB*、 Δ *galP* 基因后,葡萄糖的消耗速率降低。

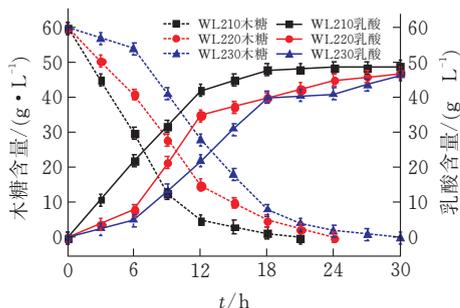


图 3 三菌株利用 6% 葡萄糖发酵产 L-乳酸能力比较

结果表明,*mglB*、*galP* 两个基因可以明显降低大肠杆菌利用葡萄糖的能力,并且三菌株中 *mglB*/*galP* 双基因缺陷菌株 WL230 生物量最大。

2.3 三菌株利用木糖能力对比

为了探究三菌株利用单糖木糖的能力,以 6%

木糖为碳源,对比 WL210, WL220、WL230 的菌株生长情况,结果如图 4 所示。菌株 WL210 发酵 30 h 时,OD 达到最大 5.82 后进入稳定期;WL220 在 42 h 时 OD 值达到最大 6.01, WL230 在 48 h 时 OD 值达到最大 6.59。虽然 WL210 最先进入稳定期,但其最大 OD 值是三菌株中最小,而 WL220 和 WL230 的最大 OD 值分别为 WL210 最大 OD 值的 1.03 倍、1.13 倍。在 30 h 之前,菌株 WL210 的生物量高于菌株 WL220 和菌株 WL230;30 h 之后,菌株 WL230 的生物量都高于菌株 WL210 和菌株 WL220。表明敲除基因后的菌株木糖消耗速率加快,菌株生长速率变快。

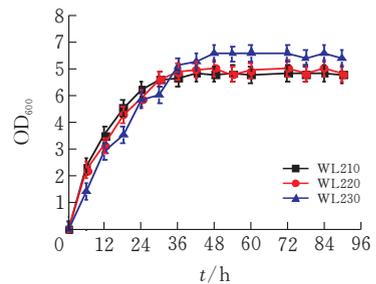


图 4 三菌株单糖发酵(6%木糖)的菌株生长情况

由图 5 可知,在利用木糖方面,菌株 WL210、菌株 WL220、菌株 WL230 发酵结束时间分别为 90 h、84 h、78 h,平均耗糖速率分别为 0.67 g/(L·h)、0.71 g/(L·h)、0.76 g/(L·h)。

对比出发菌 WL210,菌株 WL220 和菌株 WL230 利用木糖的平均速率分别降低了 7.14%、15.38%,发酵周期分别缩短了 6.67%、15.38%。在生产乳酸方面,菌株 WL210、菌株 WL220、菌株 WL230 最终乳酸产量分别为 43.12 g/L、45.98 g/L、50.12 g/L,生产强度分别为 0.51 g/(L·h)、0.59 g/(L·h)、0.69 g/(L·h)。对比出发菌 WL210,菌株 WL220、菌株 WL230 的生产强度分别提高了 14.84%、35.60%。表明敲除 Δ *mglB*、 Δ *galP* 基因后,消耗木糖速率加快。

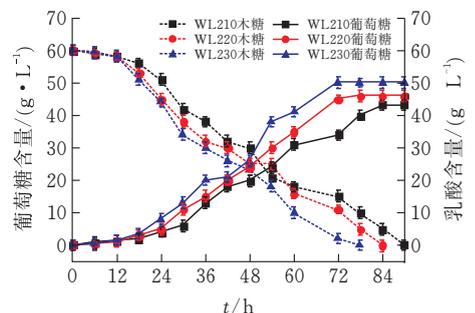


图 5 三菌株利用 6% 木糖发酵产 L-乳酸能力比较

2.4 三菌株利用混合糖能力对比

为了探究三菌株混合糖中葡萄糖和木糖的利用速率,以 6% 混合糖(3% 葡萄糖+3% 木糖)为碳源,

对比 WL210, WL220、WL230 的菌体生长情况, 结果如图 6 所示。菌株 WL210 发酵 36 h 时, OD 达到最大 7.1 进入稳定期; WL220 在 48 h 时 OD 值达到最大 7.58, WL230 在 54 h 时 OD 值达到最大 8.38。虽然 WL210 最先进入稳定期, 但其最大 OD 值是三菌株中最小, 而 WL220 和 WL230 的最大 OD 值分别为 WL210 最大 OD 值的 1.07 倍、1.18 倍。在 12 h 之前菌株 WL210 的生物量高于菌株 WL220 和菌株 WL230, 而 12 h 之后菌株 WL230 的生物量都高于菌株 WL210 和菌株 WL220。结果表明, *mglB/galP* 双基因缺陷菌株 WL230 所摄取的糖更多用于菌体生长, 也具有更高的生物量^[17]。

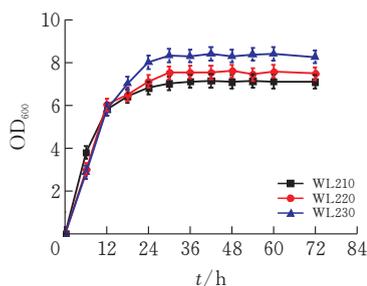


图 6 三菌株混合糖发酵(3%木糖和 3%葡萄糖)的菌体生长情况

由图 7 可知, 菌株 WL210 优先利用葡萄糖, 待发酵至 18 h 时, 开始利用木糖, 至 48 h 还剩余 23.02 g/L 木糖未利用, 而葡萄糖完全耗完; WL220 同时利用葡萄糖和木糖, 42 h 时葡萄糖利用完毕, 发酵至 48 h 时木糖剩余量为 11.45 g/L; 菌株 WL230 可同时利用葡萄糖和木糖, 发酵 48 h 时木糖无残余, 发酵至 72 h 时葡萄糖消耗完毕。

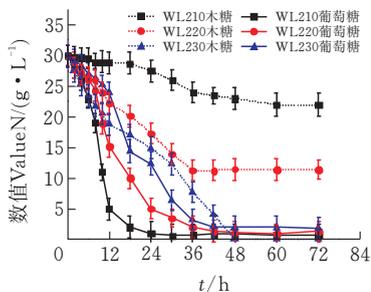


图 7 三菌株混合糖发酵(3%葡萄糖+3%木糖)的木糖和葡萄糖消耗曲线

菌株 WL210、WL220、WL230 消耗葡萄糖的速率分别为 1.21 g/(L·h)、0.78 g/(L·h)、0.66 g/(L·h), 消耗木糖速率分别为 0.15 g/(L·h)、0.45 g/(L·h)、0.62 g/(L·h)。对比出发菌 WL210, 菌株 WL220、菌株 WL230, 木糖的消耗速率分别提高了 188.03%、298.92%。结果表明, *mglB*、*galP* 两基因的缺失, 可有效降低分解代谢阻遏效应, 使葡萄糖消耗速率降低, 而木糖消耗速率升

高可能是两个基因对木糖消耗具有叠加效应^[18]。

三菌株的 L-乳酸产量如图 8 所示。在发酵 30 h 之前, 菌株 WL210 的乳酸产量高于菌株 WL220、WL230, 菌株 WL210 利用葡萄糖产 L-乳酸的速率大于菌株 WL220、WL230 产 L-乳酸速率, 分别为 0.98 g/(L·h)、0.88 g/(L·h)、0.79 g/(L·h); 发酵 30 h 后 WL220、WL230 的 L-乳酸产量超过菌株 WL210。发酵至 36 h, 菌株 WL210、菌株 WL220、菌株 WL230 的乳酸产量分别为 37.95 g/L、43.02 g/L、54.13 g/L, 生产强度分别为 0.79 g/(L·h)、0.90 g/(L·h)、1.13 g/(L·h), 转化率分别为 63.13%、71.88%、90.21%。对比出发菌 WL210, 菌株 WL220、WL230 生产强度分别提高了 13.30%、42.63%, 转化率分别提高了 13.86%、42.90%。菌株 WL230 已消耗完所有碳源, 而菌株 WL210、WL220 分别剩余 22.01g/L、11.39 g/L 的木糖。结果表明, 敲除 *mglB*、*galP* 后, WL220、WL230 利用木糖产 L-乳酸的能力远大于菌株 WL210, 由于 *mglB*、*galP* 这两个基因的缺失, 葡萄糖消耗速率减弱^[19]。

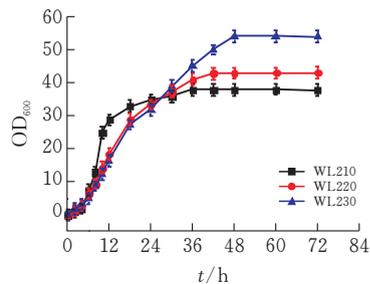


图 8 三菌株混合糖发酵(3%葡萄糖+3%木糖)的乳酸产量

3 结论

本研究敲除甲基半乳糖苷转运系统基因 *mglB*、半乳糖转运系统基因 *galP*, 构建 *mglB/galP* 双缺陷乳酸工程菌 WL230。在混合糖(3%葡萄糖和 3%木糖)发酵时, 具有木糖利用效率高、发酵周期短、乳酸转化率高的特点。对比出发菌 WL210, 其木糖利用速率和乳酸生产强度分别提高了 298.92%、42.63%, 转化率高达 90.21%, 为采用基于木质纤维素等可再生原料高效利用木糖生产 L-乳酸提供理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] REDDY L V, PARK J-H, WEE Y-J, et al. Homofermentative production of optically pure l-lactic acid from sucrose and mixed sugars by batch fermentation

- of *Enterococcus Faecalis* RKY1[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2016, 20(6):1099-1105.
- [2] ABDEL-RAHMAN M A, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Lactic acid Production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 156(4):286-301.
- [3] CORMA A, IBORRA S, VELTY A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals[J]. Chemical reviews, 2007, 107(6):2411-2502.
- [4] DATTA R, HENRY M. Lactic acid: recent advances in products processes and technologies — a review[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006, 81:1119-1129.
- [5] 倪志华, 张玉明. 利用一株凝结芽孢杆菌发酵酸解玉米秸秆生产乳酸[J]. 中国酿造, 2019, 38(7):44-47.
- [6] 丁小云. 同步代谢五碳糖和六碳糖产 D-乳酸大肠杆菌工程菌的构建及其发酵研究[D]. 武汉:湖北工业大学, 2015.
- [7] 彭姿, 谭兴和, 熊兴耀. 木质纤维素糖化前预处理新技术研究进展[J]. 中国酿造, 2013, 32(1):1-4.
- [8] 李登龙, 李明源, 王继莲, 等. 木质纤维素预处理方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19):326-332.
- [9] 翟旭航, 李霞, 元英进. 木质纤维素预处理及高值化技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(3):107-117.
- [10] JUNG M Y, JUNG H M, LEE J, et al. Alleviation of carbon catabolize repression in enterobacter aerogenes for efficient utilization of sugarcane molasses for 2,3-butanediol production[J]. Biotechnol Biofuels, 2015, 8(1):106-145.
- [11] 吴涛, 赵津津, 毛贤军, 等. 大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统改造对产 L-色氨酸的影响[J]. 生物工程学报, 2017, 33(11):1877-1882.
- [12] 江吉雄. 大肠杆菌葡萄糖转运酶缺失株的构建及其 D-乳酸发酵研究[D]. 武汉:湖北工业大学, 2017.
- [13] 许琼丹, 王永泽, 王金华, 等. 大肠杆菌乙醇工程菌 *mgIB* 基因的敲除对混合糖发酵木糖利用效率的影响[J]. 生物技术通报, 2019, 35(6):83-90.
- [14] 许丽媛. 大肠杆菌葡萄糖转运酶缺失株的构建及其 D-乳酸发酵研究[D]. 武汉:湖北工业大学, 2017.
- [15] 吴宇, 王金华, 赵筱, 等. *GLN1* 基因过表达对提高酿酒酵母糠醛耐受性的研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(8):69-78.
- [16] METS M S, LYYTIK Y I, KATJA B K, et al. Determination of xylooligosaccharides in enzymatically hydrolyzed pulp by liquid chromatography and capillary electrophoresis[J]. Cellulose, 2013, 20(3):1121-1133.
- [17] 韩聪, 张惟材, 游松, 等. 大肠杆菌 *ptsG* 基因敲除及其缺陷株生长特性研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(1):16-20.
- [18] 马婉晴, 章珍, 刘悦琳, 等. 大肠杆菌分解代谢产物阻遏效应研究进展[J]. 遗传, 2010, 32(06):571-576.
- [19] 潘海亮, 王灿, 赵筱, 等. 大肠杆菌 *ptsG* 基因缺陷菌株的构建及其发酵混合糖产 L-丙氨酸[J]. 中国酿造, 2019, 38(11):160-164.

The Effect of Transfer Gene on the Production of L Lactic Acid by E. Coli Xylose

LIU Ruting^{1,2,3}, LIU Zao^{1,2,3}, WANG Jinhua^{1,2,3}, GAO Wa^{1,2,3}

(1 Key Laboratory of Ministry of Education for Fermentation Engin.,

Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China;

2 Hubei Provincial Cooperative Innovation Center for Industrial Fermentation,

Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China;

3 School of Biological Engineering and Food Sci., Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, China)

Abstract: In order to enhance the ability of *Escherichia coli* WL210 to use mixed sugars to produce L lactic acid, the methylgalactoside transport system gene *mgIB* and the galactose transport system gene *galP* were knocked out through the RED homologous recombination technology, and a new strain WL230 was constructed. The results showed that with 6% mixed sugar (3% glucose and 3% xylose) as the carbon source, the *mgIB/galP* double gene deficient strain WL230 can simultaneously utilize glucose and xylose. Compared with the starting strain WL210, its xylose utilization rate and lactic acid production intensity were increased by 298.92% and 42.63% respectively, and the conversion rate was as high as 90.21%.

Keywords: lactic acid fermentation; *mgIB* gene; *galP* gene; mixed sugar fermentation