

构建大肠杆菌合成生物群落利用混合糖同步发酵生产 *L*-乳酸

邱炜玥, 李 敏, 陈思宇, 赵锦芳, 王金华, 赵 筱*

(湖北工业大学生命科学与健康工程学院 发酵工程教育部重点实验室

工业发酵省部共建协同创新中心 武汉 430068)

摘要 目的: 实现大肠杆菌混合糖发酵产 *L*-乳酸过程中对葡萄糖-木糖的同步利用。方法: 以 *L*-乳酸工程菌大肠杆菌 JH16(*E.coli* B, Δ frdBC Δ pflB Δ ackA Δ adhE, *ldhA::ldhL*) 为出发菌株, 通过 RED 同源重组技术敲除木糖转运及代谢基因 *xylFGH*、*xyIE* 和 *xylA*, 获得不能利用木糖的菌株大肠杆菌 JH16031。以大肠杆菌 JH2705(*E.coli* JH16, Δ ptsG Δ mgIB) 为出发菌株, 敲除葡萄糖转运及代谢基因 *crr*、*malX* 和 *galP*, 获得不能利用葡萄糖的菌株大肠杆菌 JH27071, 以构建大肠杆菌合成生物群落。通过摇瓶和 5 L 发酵罐试验确定该合成生物群落在混合糖发酵时较优的混合接种比例。结果: 以 60 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖为碳源进行发酵, 当 JH16031 与 JH27071 初始接种比为 1:50, 初始 OD_{600nm}=0.5, 混合糖的利用率最高, 在 84 h 内消耗 97% 的糖, 并在 96 h 内结束发酵。葡萄糖消耗速率为 705 mg/(L·h), 木糖消耗速率为 435 mg/(L·h), *L*-乳酸产率为 951 mg/(L·h), *L*-乳酸产量达到 92 g/L, 糖酸转化率为 91%。结论: 构建大肠杆菌合成生物群落可实现利用混合糖发酵产 *L*-乳酸过程中葡萄糖和木糖的同步利用。研究结果为工业发酵生产中, 使用低成本的木质纤维素为原料, 降低发酵成本, 提高混合糖利用率提供技术支持。

关键词 大肠杆菌; 合成生物群落; 混合糖; *L*-乳酸

文章编号 1009-7848(2024)07-0208-11 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2024.07.021

L-乳酸是一种多用途的有机酸, 在食品、化工、医药等领域得到广泛应用^[1-2]。*L*-乳酸作为一种重要的食品添加剂, 以酸度调节剂、酸化剂、抗微生物剂等用于在食品工业中, 也可作为食品消毒剂用于食品消毒中^[3-5]。目前, 探索先进的 *L*-乳酸发酵技术及理论成为当下的研究热点, 如开发发酵性能优良的菌株, 优化发酵工艺, 拓宽发酵原料来源等。

木质纤维素是常见的农林牧业废弃物, 同时也是来源丰富的可再生资源, 进行一定的预处理后, 可以从中释放出各种糖, 主要有葡萄糖、木糖以及阿拉伯糖等^[6], 并且可作为碳源被微生物利用发酵生产燃料和其它有附加值的化学产品。对木质纤维素的有效利用, 不仅可以妥善处理相关废弃物, 对环境友好, 而且能实现资源再利用^[7]。然而, 微生物在利用这些糖的过程中存在一些问题, 一是大多数天然微生物并不能利用木糖, 二是有些微生物(如大肠杆菌)虽然能利用木糖, 但是由

于碳分解代谢物阻遏 (Carbon catabolite repression, CCR) 效应, 会优先利用葡萄糖再利用其它糖类^[8-10], 从而导致混合糖利用效率不高, 发酵周期过长。因此, 如何降低 CCR 效应, 增强混合糖的同步利用, 从而缩短发酵时间, 成为利用木质纤维素作为原料进行发酵生产, 亟待解决的问题^[11]。

合成微生物群落 (Synthetic microbial communities, SynComs) 由于菌株之间相互协作和多样化代谢等独特的特征, 有潜力解决合成生物学和代谢工程中的各种重要挑战, 是很有潜力的工程平台^[12-14]。在化学工业、能源、生物医学和环境保护中得到广泛应用。近年来, 有运用合成微生物群落代谢木质纤维素废弃物, 以保护环境, 降低工业成本^[15-17]。例如, Capilla 等^[18]先接种乙酰丁酸梭菌, 5 h 后再接种酿酒酵母进行发酵, 通过调节 pH 值的方法, 利用 60 g/L 葡萄糖-木糖混合物 (3:1) 生产丙酮-丁醇-乙醇 (ABE), ABE 产量从 9.5 g/L 提升至 13.1 g/L, 且木糖利用率提高 94%。Flores 等^[19]和 Sievert 等^[20]使用两株乙醇工程菌, 利用 100 g/L 葡萄糖-木糖混合糖 (2:1) 发酵生产乙醇, 乙醇产量为 46 g/L。Saini 等^[21]使用两株正丁醇工程菌, 在 20 g/L 葡萄糖-木糖混合糖 (2:1) 中发酵, 30 h 内

收稿日期: 2023-07-23

基金项目: 湖北省教育厅科研计划重点项目 (D20201403)

第一作者: 邱炜玥, 男, 硕士生

通信作者: 赵筱 E-mail: zhaoxiaol@hbut.edu.cn

产生 5.2 g/L 正丁醇。合成微生物群落为解决混合糖同步利用问题提供了解决方案。

本研究通过 RED 同源重组技术对大肠杆菌工程菌的葡萄糖和木糖转运基因分别进行敲除,构建大肠杆菌工程菌的合成生物群落,以避免 CCR 效应,提高混合糖的利用效率,为工业发酵中

使用木质纤维素高效生产 L-乳酸提供支持。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用的菌株和质粒如表 1 所示。出发菌株与质粒均由本实验室保存。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒	相关特点	来源
菌株		
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) JH16	<i>E.coli</i> B, Δ frdBC Δ pflB Δ ackA Δ adhE, <i>ldhA</i> : : <i>ldhL</i>	[22]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) JH16031	<i>E.coli</i> JH16, Δ xyIFGH Δ xyIE Δ xyIA	本研究
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) JH2705	<i>E.coli</i> JH16, Δ ptsG Δ mglB	[22]
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) JH27071	<i>E.coli</i> JH2705, Δ crr Δ malX Δ galP	本研究
质粒		
pKD4	<i>Kan</i> ^r ; FRT- <i>kan</i> -FRT	[23]
pKD46	<i>Amp</i> ^r ; Red recombinase, temperature-conditional, <i>bla</i>	[23]
pFT-A	<i>Amp</i> ^r ; flp, temperature-conditional	[24]

1.2 主要试剂

DNA marker, TAKARA 公司; PCR Master Mix, Vazyme 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素, Mersco 公司; PCR 引物由昆泰锐(武汉)生物技术有限责任公司合成。分析纯葡萄糖、木糖、其它无机盐等, 国药集团。

1.3 培养基

LB 液体培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 5 g/L 氯化钠; LB 固体培养基: LB 液体培养基中添加 15 g/L 琼脂; 选择培养基: LB 固体培养基中添加抗生素(50 mg/L 氨苄青霉素或卡那霉素); 发酵培养基: 改良 M9 培养基。

改良 M9 基本培养基组成: 15.11 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L NaCl, 添加 0.1% MgSO₄ 和 0.1% 微量金属离子储备液^[25]。

微量金属离子储备液组成: 2.4 g/L FeCl₃·6H₂O, 0.3 g/L CoCl₂·6H₂O, 0.15 g/L CuCl₂·2H₂O, 0.3 g/L ZnCl₂, 0.3 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.075 g/L H₃BO₃, 0.495 g/L MnCl₂·4H₂O^[26]。

1.4 仪器与设备

Sartorius BB-8846880 发酵罐, 德国 SartoriusStedim Biotech 公司; Waters e 2695 型高效液

相色谱仪, 美国 Waters 公司; mycycler PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; MicroPluser 电转仪, 美国 Bio-Rad 公司; 722s 可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司。

1.5 专一碳源发酵菌株构建方法

1.5.1 仅利用葡萄糖发酵菌株 JH16031 的构建
采用 RED 同源重组技术, 在 JH16 的基础上, 依次敲除木糖 ATP 依赖型转运蛋白编码基因 *xyIFGH*, 木糖 H⁺ 依赖型转运蛋白编码基因 *xyIE*, 木糖异构酶基因 *xyIA*。将最终构建成功并在改良的 M9 培养基(3% 葡萄糖)上连续传代 8 代以上的菌株命名为 JH16031。基因敲除引物和鉴定引物设计如表 2 所示。基因敲除方法依照 Zhou 等^[27]的方法。其原理如下: 设计敲除引物对, 部分与待敲除的靶基因外部同源, 部分与 pKD4 中的 FRT-*kan*-FRT 序列同源。以 pKD4 为模板进行 PCR 扩增, 将纯化后的 DNA 打靶片段通过电穿孔的方法转化入宿主细胞(化转后带有 pKD46 质粒)中。在同源重组酶的作用下, 靶基因序列被含有 FRT-*kan*-FRT 序列的 DNA 打靶片段取代, 通过卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆, 并通过 PCR 进行序列验证, 以确定靶基因被敲除。将温度敏感型质粒 pFT-A 转化

入经 PCR 验证无误的阳性克隆细胞中，通过诱体上去除。
导 FLP 重组酶，将卡那霉素抗性标记从其染色

表 2 构建仅利用葡萄糖发酵菌株 JH16031 的引物
Table 2 Construction of primers for only using glucose fermentation strain JH16031

引物名称	引物序列 (5'-3')
Δ_{xy}/FGH -P1	TGTTACTTATTA AAAACTGTCCTCTAACTACAGAAGGCCCTACACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δ_{xy}/FGH -P2	GTTTG GTTGCGGAGTCCATCCATACTGCCAGCAACAGAATCGCACTCCTCCTTAGTTCCTATTCC
Verify- Δ_{xy}/FGH -P1	TCACCCTTTGCACCTCACTC
Verify- Δ_{xy}/FGH -P2	GCGCTTGCTCGATCTGTTTG
$\Delta_{xy}I$ E-p1	ATCAATGCACTGATAAAAAGATCAGAATGGTCTAAGGCAGGTCTGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
$\Delta_{xy}I$ E-p2	AAAAAGTCAGCACGCCGAAATGGCGCGGCGTGCTGGACAGGAAGATCCTCCTTAGTTCCTATTCC
Verify- $\Delta_{xy}I$ E-p1	GTGAATCCGCTGCCAACTCC
Verify- $\Delta_{xy}I$ E-p2	GCCAGAACGCCCATAACAACC
Verify- $\Delta_{xy}I$ E-p3	ATGAATACCCAGTATAATTCCAGTT
Verify- $\Delta_{xy}I$ E-p4	TTACAGCGTAGCAGTTTGTTGTGTT
$\Delta_{xyl}A$ -p1	GACATCATCCATCACCCGCGGCATTACCTGATTATGGAGTTCAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
$\Delta_{xyl}A$ -p2	GGTATCGCTACCGATAACCGGGCCAACGGACTGCACAGTTAGCCGTCCTCCTTAGTTCCTATTCC
Verify- $\Delta_{xyl}A$ -p1	ATCCCCGACGAACTGGTGTTG
Verify- $\Delta_{xyl}A$ -p2	GTGAAACCGCCTGCTTTGAG
Verify- $\Delta_{xyl}A$ -p3	GCAAGCCTATTTTGACCAGCTCGAT
Verify- $\Delta_{xyl}A$ -p4	GTCGAACAGATAATGGTTTACCAGA

1.5.2 仅利用木糖发酵菌株 JH27071 的构建 同 基因 *malX*, 半乳糖特异性蛋白基因 *galP*。将最终
1.5.1 节的方法进行菌株构建。在 JH2705 的基础 构建成功并在改良的 M9 培养基 (2%木糖) 上连续
上, 依次敲除磷酸烯醇丙酮酸酯磷酸转移酶系统 传代 8 代以上的菌株命名为 JH27071。
的磷载体和调节蛋白基因 *crr*, 麦芽糖特异性蛋白

表 3 构建仅利用木糖发酵菌株 JH27071 的引物
Table 3 Construction of primers for only using xylose fermentation strain JH27071

引物名称	引物序列 (5'-3')
Δ_{crr} -P1	GCTAATCCACGAGATGCGGCCCAATTTACTGCTTAGGAGAAGATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δ_{crr} -P2	TAAAAAATGGCGCCGATGGCGGCCATTTTTCACTGCGGCAAGAATCCTCCTTAGTTCCTATTCC
Verify- Δ_{crr} -P1	ATGGGTATTAGCGGCTTGGG
Verify- Δ_{crr} -P2	GCTACGCAAAGACCATCCTG
Verify- Δ_{crr} -P3	ATGATGGATACTTTCTCGGC
Verify- Δ_{crr} -P4	ATGGGTTTGTTGATAAACT
Verify- Δ_{crr} -P5	TTACTTCTTGATGCGGATAA
Δ_{malX} -P1	GCGCAATTTACTGAATCCAGATTGTTCTCTACGAGGAGTCGTTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δ_{malX} -P2	GCCATGACGATCCACGACCTTTGAAAAATCGAACATATCTTATCCTCCTCCTTAGTTCCTATTCC
Verify- Δ_{malX} -P1	ATGGGTATTAGCGGCTTGGG
Verify- Δ_{malX} -P2	ATTCCAGCGGTTCCGGTAGTG
Verify- Δ_{malX} -P3	ACACCACCGTCTGAGAATCG
Verify- Δ_{malX} -P4	CTGGGCACAACAGACAATCG
Δ_{galP} -P1	ACCTATCTTAATTCACAATAAAAAATAACCATATTGGAGGGCATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δ_{galP} -P2	CTGCAAGAGGTGGCTTCTCCGCGATGGGAGGAAGCTTGGGGAGATCCTCCTTAGTTCCTATTCC
Verify- Δ_{galP} -P1	CCGCCCCGACAATAACATC
Verify- Δ_{galP} -P2	TGGATGGCGATAGGGAGAC

1.6 发酵条件和分析方法

摇瓶发酵使用 500 mL 摇瓶,装液量 400 mL,使用的总糖为 50 g/L 的葡萄糖-木糖混合糖(比例为 3:2)。接种的初始 OD_{600nm} 值为 0.5,培养条件为 37 °C,200 r/min,使用 40 g/L 的 $CaCO_3$ 调节 pH 值。JH16031 和 JH27071 接种比例为 1:1,1:5,1:10,1:50,1:100。

发酵罐发酵使用 5 L 发酵罐,装液量 4 L,使用的总糖为 100 g/L 的葡萄糖-木糖混合糖(比例为 3:2)。接种的初始 OD_{600nm} 值为 0.5,培养条件为 37 °C,200 r/min,使用 200 g/L 的 $Ca(OH)_2$ 调节 pH 值。JH16031 和 JH27071 接种比例为 1:1,1:10,1:50。

使用 722s 可见分光光度计,在 OD_{600nm} 处检测

细胞生长情况。使用 Waters e 2695 型高效液相色谱仪进行底物和产物检测,使用 PDA 检测器检测 L-乳酸质量浓度,使用 ELS 检测器检测葡萄糖与木糖的质量浓度,色谱柱为 Aminex HPX-87H,流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 ,流速为 0.5 mL/min,柱温为 45 °C^[27]。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌 L-乳酸工程菌株的混合糖发酵性能分析

在 JH16 的基础上,通过基因敲除手段,构建了只能利用葡萄糖的工程菌株 JH16031 和只能利用木糖的工程菌株 JH27071,在 30 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖的混合糖中进行发酵培养。

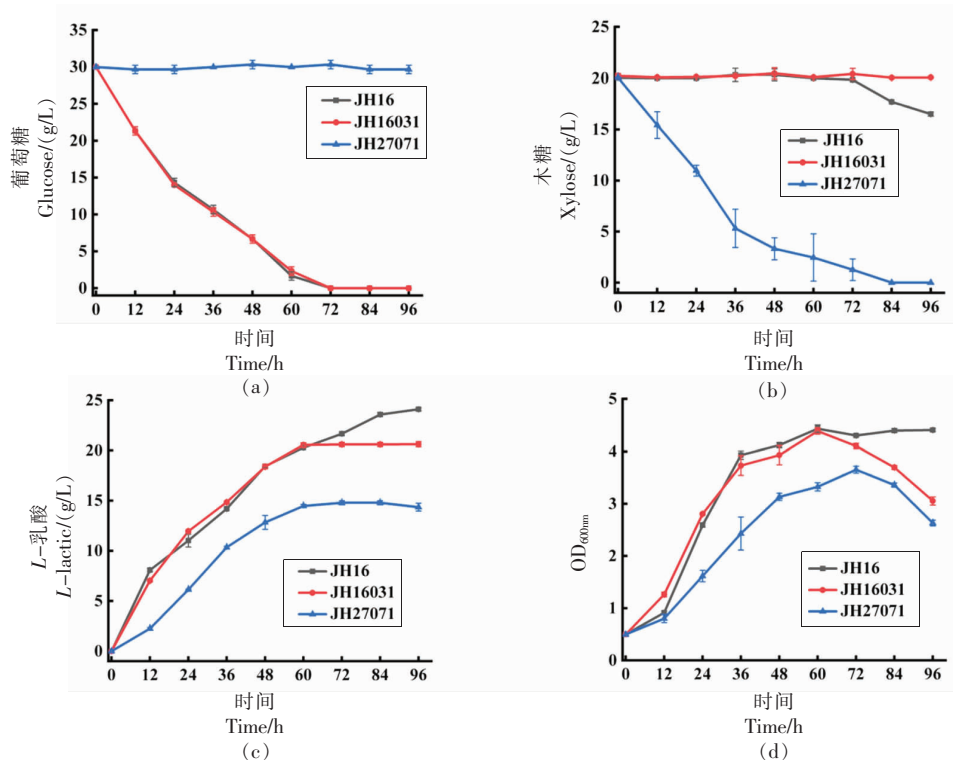


图1 大肠杆菌 L-乳酸工程菌株利用葡萄糖-木糖混合糖的发酵性能

Fig.1 Fermentation characteristics of *E. coli* L-lactic acid engineered strains using glucose-xylose mixtures

如图 1 所示,JH16 在混合糖发酵情况下,葡萄糖在 72 h 内消耗完,消耗速率为 $(416 \pm 0) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$;由于 CCR 效应,在葡萄糖消耗完后,才开始消耗木糖,发酵至 96 h 时仅消耗 16% 的木糖,木糖消耗速率为 $(34 \pm 2) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ (图 1a 和 1b),L-乳酸产率为 $(251 \pm 2) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ (图 1c)。JH16031

在混合糖发酵情况下,葡萄糖在 72 h 内消耗完,与 JH16 类似(图 1a),而木糖未被利用(图 1b),说明 *xyIFGH*,*xyIE* 和 *xyIA* 的敲除可以阻止木糖的转运及代谢,然而对葡萄糖的转化速率无显著性影响;由于木糖未被利用,乳酸最终产量降低(图 1c),L-乳酸产率为 $(227 \pm 3) \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。JH27071 在混合

糖发酵情况下,葡萄糖未被利用,说明 *ptsG*, *mglB*, *err*, *malX* 和 *galP* 的敲除可以阻止葡萄糖的转运及代谢,而木糖代谢不受 CCR 效应的影响;木糖在 84 h 内消耗完(图 1b),木糖消耗速率为 (244 ± 0) mg/(L·h), *L*-乳酸产率为 (142 ± 2) mg/(L·h)。由此可见,JH16061 和 JH27071 已达到在混合糖发酵时,各自只利用其中一种碳源的目的,可用于构建合成生物群落进行混合糖发酵。

2.2 大肠杆菌合成生物群落混合糖发酵情况及其优化

将菌株 JH16031 和 JH27071 共培养构建大肠杆菌合成生物群落,利用混合糖发酵生产 *L*-乳酸。如表 4 和图 2 所示,首先采用 1:1 的混合接种比例进行摇瓶发酵,葡萄糖在 60 h 内消耗完,优

于 JH16 单培养 72 h;当发酵至 96 h 时,有 46% 的木糖被利用,总糖利用率达到 78%,优于 JH16 单培养结果 66%,说明合成生物群落策略可以有效提高混合糖的利用效率。后续通过调整接种比例,进一步提高葡萄糖和木糖的整体利用效率,以改善整体分解代谢产 *L*-乳酸的性能。

当摇瓶发酵 96 h 时,JH16031 和 JH27071 的接种比例为 1:1 时,葡萄糖消耗速率为 (604 ± 29) mg/(L·h),木糖消耗速率为 (95 ± 5) mg/(L·h),随着 JH27071 接种比例增大,1:5,1:10,1:50,1:100 的葡萄糖消耗速率分别降低至 (345 ± 12) , (307 ± 7) , (286 ± 7) , (292 ± 1) mg/(L·h),而木糖消耗速率分别提升至 (125 ± 7) , (193 ± 11) , (276 ± 9) , (333 ± 1) mg/(L·h),为后续确定较优接种比例提供依据。

表 4 大肠杆菌合成生物群落混合糖发酵情况
Table 4 Fermentation of *E. coli* SynComs using glucose-xylose mixtures

发酵菌株	糖利用率/%			糖消耗速率/[mg/(L·h)]		<i>L</i> -乳酸产率/ [mg/(L·h)]	糖酸转化率/ %
	葡萄糖	木糖	总糖	葡萄糖	木糖		
JH16031:JH27071							
1:1	100±0	46±2.5	78±1.0	604±29	95±5	275±16	66±3.0
1:5	100±0	58±3.4	83±1.1	345±12	125±7	273±28	60±2.1
1:10	98±2.3	91±5.3	95±3.6	307±7	193±11	276±17	54±3.2
1:50	92±2.3	100±0	95±1.3	286±7	276±9	275±14	54±5.0
1:100	93±0.3	100±0	96±0.2	292±1	333±1	283±24	56±4.5

JH16031 和 JH27071 的接种比例为 1:5 时,葡萄糖在 96 h 消耗完(图 2a),木糖利用率提升至 58%(图 2b),总体糖利用率提升至 83%;接种比例为 1:10 时,发酵至 96 h,仅有少量葡萄糖和木糖未消耗(图 2a、2b);而接种比例为 1:50 和 1:100 时,发酵至 96 h,仅有少量葡萄糖未消耗(图 2a)。随着 JH27071 的接种比例增大,1:10,1:50,1:100 的总糖利用率分别提升至 95%,95%,96%,且木糖消耗时间分别缩短至 96,84,60 h(图 2b)。说明在混合糖发酵时,合成生物群落能避开单菌的 CCR 效应,从而实现木糖与葡萄糖的同步利用,提高总糖利用率,缩短整体发酵时间。

JH16031 和 JH27071 的接种比例为 1:1,1:5,1:10,1:50,1:100 时,*L*-乳酸产率分别为 (275 ± 16) , (273 ± 28) , (276 ± 17) , (275 ± 14) , (283 ± 24) mg/(L·h),无显著性差异。糖酸转化率分别为 66%,60%,54%,54%,56%,接种比例为 1:10,

1:50,1:100 的糖酸转化率与接种比例为 1:1 和 1:5 的糖酸转化率相比,有明显降低。已知大肠杆菌利用木糖生成乳酸的糖酸转化率低于利用葡萄糖生成乳酸的糖酸转化率(1 mol 葡萄糖理论转化生成 2 mol 乳酸,1.2 mol 木糖理论转化生成 2 mol 乳酸),当 JH27071 的接种占比增大时,合成生物群落中利用木糖生成乳酸的细胞比例增加,有可能导致糖酸转化率下降。

JH16031 和 JH27071 的接种比例为 1:1,1:5,1:10,1:50,1:100 时,最大 OD_{600nm} 逐渐降低,分别为 4.16 ± 0.06 , 4.00 ± 0.08 , 3.78 ± 0.03 , 3.70 ± 0.25 , 3.24 ± 0.06 (图 2d),这可能也与 JH27071 在合成生物群落所占比例有关。在单菌混合糖发酵试验中,JH27071 的最大 OD_{600nm} 为 3.58 ± 0.05 ,JH16031 的最大 OD_{600nm} 为 4.14 ± 0.05 ,可见 JH27071 的生长速率低于 JH1603(图 1d)。在合成生物群落发酵试验中,当 JH27071 的接种占比增大时,合成生物群落

在生长前期(24 h内)的生长速率也逐步降低,从而导致最大 OD_{600nm} 下降。

根据摇瓶试验中总糖利用率情况来看,当JH16031和JH27071的接种比例为1:1,1:5时,发酵至96 h仍有大部分木糖未被利用,总糖利用率低;JH16031和JH27071的接种比例为1:10,1:50,1:100时,在96 h内可以将木糖消耗完毕,总糖利用率高。而根据摇瓶试验中最大 OD_{600nm} 情

况,JH27071的接种占比增大,最大 OD_{600nm} 下降,菌株生长速率下降。JH16031和JH27071的接种比例为1:10,1:50,1:100时,最大乳酸产量生成的时间分别为72,84,96 h。综合评估上述因素,考虑到放大至发酵罐试验,较差的菌体生长有可能导致其发酵性能下降,发酵时间延长,因此选择JH16031与JH27071接种比为1:10和1:50的两种情况进行后续试验。

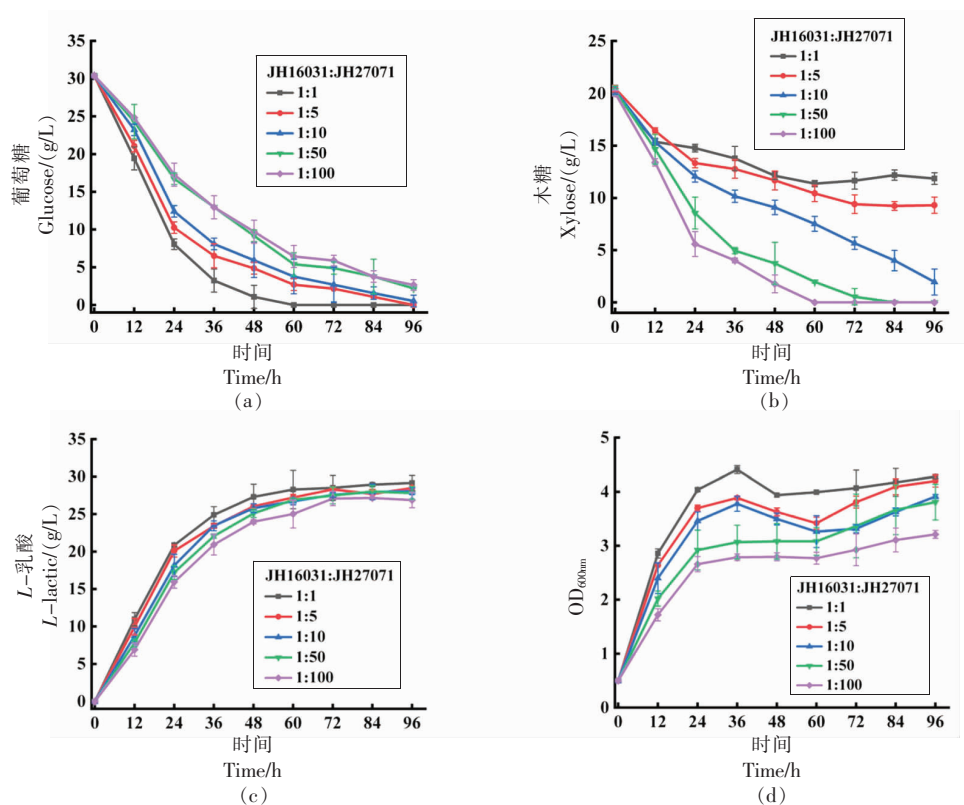


图2 大肠杆菌合成生物群落混合糖发酵情况

Fig.2 Fermentation of *E.coli* SynComs using glucose-xylose mixtures

2.3 大肠杆菌合成生物群落发酵罐混合糖发酵情况

通过分析,本研究以JH16031与JH27071初始接种比为1:1,1:10,1:50使用发酵罐进一步进行混合糖发酵性能研究,且混合糖质量浓度提升至60 g/L葡萄糖和40 g/L木糖。总体发酵情况如表5和图3所示,JH16031与JH27071接种比为1:1时,表现出了最高的葡萄糖利用速率,达到了 $(1\ 011\pm0)$ mg/(L·h),1:10和1:50分别为 (851 ± 0) mg/(L·h)和 (705 ± 0) mg/(L·h),分别降低了16%和30%,与摇瓶发酵情况类似(图2a,3a);1:1

的木糖消耗速率相较于其它两组仅达到 (342 ± 6) mg/(L·h),1:10和1:50分别为 (383 ± 0) mg/(L·h)和 (435 ± 0) mg/(L·h),分别提升了12%和27%,与摇瓶发酵情况类似(图2b和3b)。L-乳酸结果显示,JH16031与JH27071接种比为1:1,1:10,1:50时,糖酸转化率分别为90%,91%,91%,无显著差异;JH16031与JH27071接种比为1:1时,L-乳酸生产速率为 (761 ± 12) mg/(L·h);1:10和1:50的L-乳酸生产速率为 (869 ± 13) mg/(L·h)和 (951 ± 17) mg/(L·h),相较于1:1接种的产量,分别提升14%和25%。当JH16031与JH27071初始接种比

为 1:10 和 1:50 时,在生长前期(24 h 内)的生长速率低于 1:1 的接种比例(图 3d),这与摇瓶发酵时观察到的情况一致。在发酵罐混合糖发酵时,进一步扩大 JH16031 与 JH27071 接种比为 1:10 和 1:50 的发酵优势,混合糖利用时间缩短,*L*-乳酸生产速率提升。

表 5 大肠杆菌合成生物群落发酵罐混合糖发酵情况

发酵菌株	糖利用率/%			糖消耗速率/[mg/(L·h)]		<i>L</i> -乳酸产率/[mg/(L·h)]	糖酸转化率/%	发酵时长/h
	葡萄糖	木糖	总糖	葡萄糖	木糖			
JH16031:JH27071								
1:1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	1 011 ± 0	342 ± 6	761 ± 12	90 ± 0.6	120
1:10	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	851 ± 0	383 ± 0	869 ± 13	91 ± 0.3	108
1:50	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	705 ± 0	435 ± 0	951 ± 17	91 ± 0.4	96

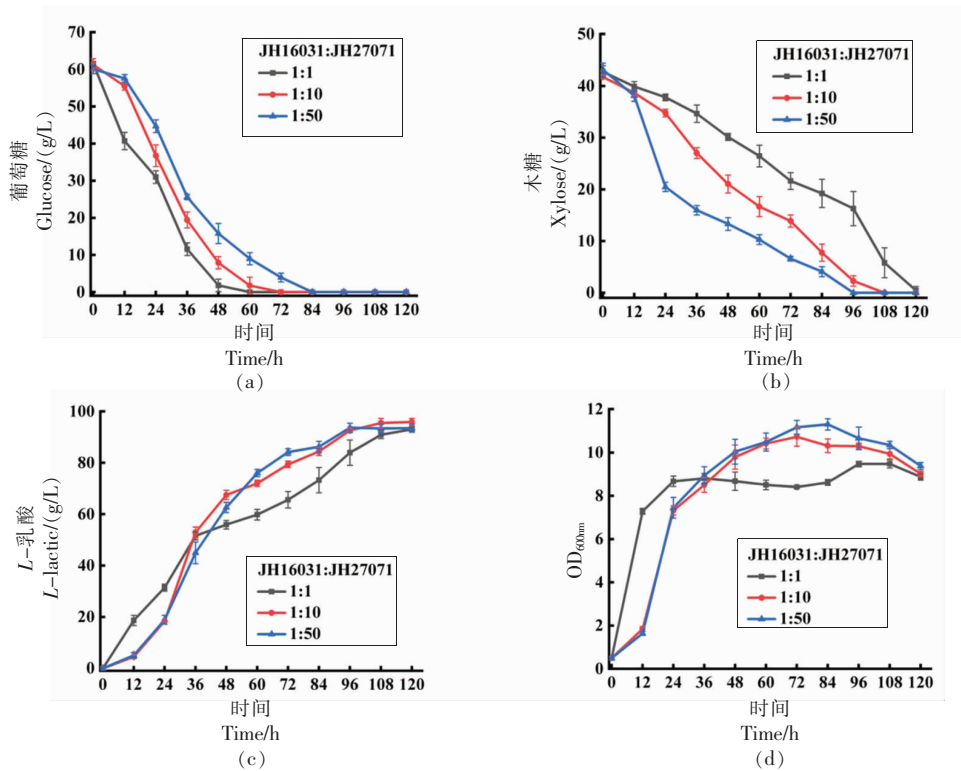


图 3 大肠杆菌合成生物群落发酵罐混合糖发酵情况

Fig.3 Fermentation of *E.coli* SynComs using glucose-xylose mixtures in fermenters

如表 6 所示,在各发酵时间点,在初始接种比为 1:1 的情况下,60 g/L 葡萄糖在 60 h 内消耗完,仍表现出最高的葡萄糖利用率(图 2a 和 3a);而木糖需 120 h 才能消耗完,单一糖类的消耗时间相差 60 h(图 3b),且 60 h 的总糖利用率仅有 76%。在初始接种比为 1:10 的情况下,60 g/L 葡萄糖在 72 h 内消耗完,总糖利用率达到 87%,高于初始接种比 1:1 的 81%;相较于初始接种比为 1:1,葡萄糖消耗时间延后 12 h,而 60 h 时,葡萄糖仅剩

(1.7±0.2) g/L,总糖利用率提升至 83%;然而木糖需 108 h 才能消耗完,单一糖类消耗时间仍相差 36 h(图 3a 和 3b)。在初始接种比为 1:50 的情况下,60 g/L 葡萄糖进一步延长至 84 h 内消耗完,总糖利用率达到 97%,而 60 h 的总糖利用率达到 83%,与接种比 1:10 持平,高于接种比 1:1,且木糖提前至 96 h 消耗完;从 60 h 开始,总糖利用率均高于接种比为 1:1 和 1:10;总糖利用时间为 96 h,发酵时长分别缩短 24 h 与 12 h,且 84 h 时,木

糖仅剩(3.7±0.8) g/L,总糖利用率达到 97%,基本完成混合糖利用(图 3a 和 3b),表现出较优的发酵性能。

表 6 大肠杆菌合成生物群落发酵罐混合糖发酵的葡萄糖-木糖消耗情况
Table 6 Consumption of *E. coli* SynComs using glucose-xylose in fermenters

发酵菌株	糖利用率/%																	
	60 h			72 h			84 h			96 h			108 h			120 h		
	葡萄 糖	木糖	总糖	葡萄 糖	木糖	总糖	葡萄 糖	木糖	总糖	葡萄 糖	木糖	总糖	葡萄 糖	木糖	总糖	葡萄 糖	木糖	总糖
JH16031:																		
JH27071																		
1:1	100	41	76	100	52	81	100	57	83	100	64	86	100	87	95	100	99	99
1:10	97	60	83	100	67	87	100	80	93	100	93	97	100	100	100	100	100	100
1:50	87	77	83	94	85	91	100	91	97	100	100	100	100	100	100	100	100	100

3 讨论

本研究构建的仅利用葡萄糖或木糖的菌株,在混合糖情况下,可仅利用其中一种碳源,且仅利用木糖菌株不仅可以克服 CCR 效应对木糖利用的抑制^[8],而且可以提高木糖利用效率。通过 JH16 和 JH16031 的混合糖发酵情况来看, *xylFGH*、*xyIE* 和 *xyIA* 基因的敲除可以基本阻断工程菌对木糖的利用,原因是分别阻断了木糖的入胞^[28]和木糖进一步代谢成为木酮糖^[29],造成木糖无法入胞及代谢。从 JH16 和 JH27071 的混合糖发酵情况来看, *ptsG*、*mglB*、*crr*、*malX*、*galP* 基因的敲除可以基本阻断该工程菌对葡萄糖的利用,原因是可溶性蛋白 EIIBC^{Glc}(*ptsG*)无法转运葡萄糖入胞,可溶性蛋白 EIIA^{Glc}(*crr*)无法使入胞的葡萄糖去磷酸化,而甲基半乳糖苷转运系统(*mglB*)、麦芽糖转运系统(*malX*)和半乳糖转运系统(*galP*)的敲除可进一步阻断葡萄糖的转运,使其无法进入细胞内,进而无法代谢^[30-31]。

合成微生物群落的思路可以有效克服 CCR 效应对木糖代谢的抑制,增强混合糖的同步利用。通过 JH16031 和 JH27071 在摇瓶中混合糖发酵情况来看,合成生物群落混合糖发酵相较于 JH16 混合糖发酵,葡萄糖和木糖消耗速率提升,可能是因为相同出发菌株构建而来的不同工程菌株在发酵时,达到一种共生状态^[14],进而促进整体发酵性能。通过 JH16031 和 JH27071 在发酵罐中混合糖发酵情况来看,JH16031 与 JH27071 初始接种比为 1:1,1:10,1:50 时,*L*-乳酸产率分别达到(761±12),(869±13),(951±17) mg/(L·h),糖酸转化率

分别为 90%,91%,91%。而发酵周期缩短,是由于使用相同出发菌株构建合成生物群落,可减少不同种菌株合成生物群落发酵时的底物竞争情况,避免发酵周期延长和底物转化率降低^[14]。初始接种比为 1:50 相较于 1:10 的葡萄糖和木糖总体利用时间更短,因而在 JH16031 与 JH27071 初始接种比为 1:50 时较优。

综上所述,本文构建的仅利用葡萄糖的菌株 JH16031 和仅利用木糖的菌株 JH27071,在接种比例为 1:50 时,表现出较优的发酵情况,可以有效缩短葡萄糖和木糖的总体发酵周期,提高总糖利用率,增强混合糖的同步利用。

4 结论

本研究在 JH16 的基础上敲除 *xylFGH*、*xyIE* 和 *xyIA* 基因,构建了仅利用葡萄糖的菌株 JH16031;在 JH2705 的基础上敲除 *crr*、*malX* 和 *galP* 基因,构建了仅利用木糖的菌株 JH27071,构建大肠杆菌合成生物群落,实现利用混合糖发酵时对葡萄糖-木糖的同步利用。在以 60 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖为碳源,温度为 37 ℃,转速 200 r/min,200 g/L 的 Ca(OH)₂ 控制发酵液 pH 的条件下进行发酵,当 JH16031 与 JH27071 初始接种比为 1:50(初始 OD_{600nm} 为 0.5)时,该大肠杆菌合成生物群落的发酵情况较优:葡萄糖消耗速率为(705±0) mg/(L·h),木糖消耗速率为(435±0) mg/(L·h),在 84 h 内消耗了 97%的糖,并在 96 h 内结束发酵;*L*-乳酸产量为 92 g/L,糖酸转化率达到 91%。

参考文献

- [1] LI G, XIE C Q, DU Y Z, et al. Characterization and antitumor efficacy of poly (*L*-lactid acid)-based etoposide-loaded implants[J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 765-774.
- [2] MITSCHANG F, SCHMALZ H, AGARWAL S, et al. Goldnanopartikel-gefüllte polymer-nanoreaktoren für teebeutel-ähnliche katalysatoren[J]. *Angewandte Chemie*, 2014, 126(19): 5073-5076.
- [3] 梁琼, 鲁明波, 卢正东, 等. 对羟基联苯法定量测定发酵液中的乳酸[J]. *食品科学*, 2008, 29(6): 357-360.
- LIANG Q, LU M B, LU Z D, et al. Determination of lactic acid in fermentation broth by p-hydroxy-biphenol colorimetry[J]. *Food Science*, 2008, 29(6): 357-360.
- [4] 钱志良, 胡军, 雷肇祖. 乳酸的工业化生产、应用和市场[J]. *工业微生物*, 2001, 31(2): 49-53.
- QIAN Z L, HU J, LEI Z Z. Industrial production, application and market of lactic acid[J]. *Industrial Microbiology*, 2001, 31(2): 49-53.
- [5] KAYALI A Y, OZAWA J, NISHIBUCHI M. Development and improvement of methods to disinfect raw beef using calcium hydroxide-ethanol-lactate-based food disinfectant for safe consumption[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 537889.
- [6] OKANO K, TANAKA T, OGINO C, et al. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 413-423.
- [7] KUMAR R, SINGH S, SINGH O V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(5): 377-391.
- [8] DEUTSCHER J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(2): 87-93.
- [9] DIEN B S, NICHOLS N N, O'BRYAN P J, et al. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84/85/86: 181-196.
- [10] PAULA R G D, ANTONIÊTO A C C, RIBEIRO L F C, et al. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107347.
- [11] GÖRKE B, STÜLKE J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients[J]. *Nature Reviews*, 2008, 6(8): 613-624.
- [12] HAYS S G, PATRICK W G, ZIESACK M, et al. Better together: Engineering and application of microbial symbioses[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36: 40-49.
- [13] LU H, VILLADA J C, LEE P K. Modular metabolic engineering for biobased chemical production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(2): 152-166.
- [14] SONG H, DING M Z, JIA X Q, et al. Synthetic microbial consortia: From systematic analysis to construction and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(20): 6954-6981.
- [15] PERALTA-YAHYA P P, ZHANG F Z, DEL CARDAYRE S B, et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 320-328.
- [16] RUDER W C, LU T, COLLINS J J. Synthetic biology moving into the clinic[J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1248-1252.
- [17] WILFRIED W, MARTIN F. Emerging biomedical applications of synthetic biology[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13: 21-35.
- [18] CAPILLA M, VALLES A, SAN-VALERO P, et al. Solvent production from rice straw by a co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of pH control[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022, 14: 5561-6673.
- [19] FLORES A D, AYLA E Z, NIELSEN D R, et al. Engineering a synthetic, catabolically orthogonal co-culture system for enhanced conversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol[J]. *American Chemical Society*, 2019, 8(5): 1089-1099.
- [20] SIEVERT C, NIEVES L M, PANYON L A, et al. Experimental evolution reveals an effective avenue to release catabolite repression via mutations in *XylR*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(28): 7349-7354.
- [21] SAINI M, LIN L, CHIANG C, et al. Synthetic consortium of *Escherichia coli* for n-butanol production by fermentation of the glucose-xylose mixture[J].

- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(46): 10040–10047.
- [22] 刘汝婷, 张倩, 郭西鹏, 等. *ptsG/mglB* 双基因敲除对大肠杆菌发酵混合糖产L-乳酸的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(9): 82–86.
- LIU R T, ZHANG Q, GUO X P, et al. Effect of *ptsG* and *mglB* genes knock-out on the production of L-lactic acid by *Escherichia coli* from mixed sugars[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 82–86.
- [23] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [24] PÓSFAL G, KOOB M D, KIRKPATRICK H A, et al. Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: Isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157: H7 genome[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(13): 4426–4428.
- [25] 孙金凤, 田康明, 沈微, 等. 大肠杆菌不同菌株木糖代谢差异性的遗传本质[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 68–73.
- SUN J F, TIAN K M, SHEN W, et al. Genetic nature of xylose metabolism diversity of different *Escherichia coli* strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(10): 68–73.
- [26] MARTINEZ A, GRABAR T B, SHANMUGAM K T, et al. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(3): 397–404.
- [27] ZHOU S, IVERSON A G, GRAYBURN W S. Doubling the catabolic reducing power (NADH) output of *Escherichia coli* fermentation for production of reduced products[J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(1): 45–51.
- [28] QIU Y J, QIU Z Y, XIA J, et al. Co-expression of xylose transporter and fructose-bisphosphate aldolase enhances the utilization of xylose by *Lactococcus lactis* IO-1 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 195(2): 816–831.
- [29] SKARIYACHAN S, KHANGWAL I, NIRANJAN V, et al. Deciphering effectual binding potential of xylo-substrates towards xylose isomerase and xylokinase through molecular docking and molecular dynamic simulation[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2020, 39(11): 3948–3957.
- [30] XIA T, SRIRAM N, LEE S A, et al. Glucose consumption in carbohydrate mixtures by phosphotransferase-system mutants of *Escherichia coli* [J]. Microbiology, 2017, 163(6): 866–877.
- [31] ALMA A, ANDREA S, ADELFO E, et al. New insights into transport capability of sugars and its impact on growth from novel mutants of *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(4): 1463–1479.

Constructing *Escherichia coli* Synthetic Microbial Communities for Simultaneously Utilizing Mixed Sugars to Product L-Lactic Acid

Qiu Weiyue, Li Min, Chen Siyu, Zhao Jinfang, Wang Jinhua, Zhao Xiao*

(School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Wuhan 430068)

Abstract Objective: To achieve the simultaneous utilization of glucose-xylose in the fermentative production of L-lactic acid by *Escherichia coli*. Methods: *E.coli* JH16 (*E.coli* B, Δ frdBC Δ pflB Δ ackA Δ adhE, *ldhA*:*ldhL*), an engineered L-lactic acid productive stain was chosen as start strain, and the xylose transport and metabolism relevant genes *xyIFGH*, *xyIE*, *xyIA* were knocked out by Red homologous recombination to get an xylose utilization deficient strain, *E.coli* JH16031. The glucose transport and metabolism relevant genes *crr*, *malX*, *galP* were also knocked out from *E.coli* JH2705 (*E.coli* JH16, Δ *ptsG* Δ *mglB*) to get a glucose utilization deficient strain, *E.coli* JH27071. The two resulting strains were co-cultured to form an *E.coli* synthetic microbial community. Shake flasks and 5 L fermenter experiments were carried out to optimize the inoculum ratio of the two strains of this synthetic microbial community for mixed sugar fermentation. Results: When using 60 g/L glucose and 40 g/L xylose for fermentation, with an initial inoculum ratio of 1:

50 between JH16031 and JH27071, initial $OD_{600nm}=0.5$, the community has the the highest efficiency for sugar utilization, consuming 97% of total sugars in 84 h and ending the fermentation in 96 h. The *L*-lactic acid yield reaches 92 g/L, and sugar-acid conversion rate is 91%, with glucose consumption rate as 705 mg/(L·h), xylose consumption rate as 435 mg/(L·h), *L*-lactic acid productivity as 951 mg/(L·h). Conclusion: The constructed *E.coli* synthetic microbial community enables the simultaneous utilization of glucose and xylose for *L*-lactic acid fermentative production with mixed sugars as carbon sources, which may benefits the usage of low-cost lignocellulose in industrial fermentative process with improved sugar utilization efficiency.

Keywords *Escherichia coli*; synthetic microbial community; mixed sugars; *L*-lactic acid