

• 工业生物技术 •

大肠杆菌利用葡萄糖和木糖合成乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯

笄央央, 李微, 史理陇, 李正军

北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

笄央央, 李微, 史理陇, 等. 大肠杆菌利用葡萄糖和木糖合成乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯. 生物工程学报, 2019, 35(2): 254–262.

Da YY, Li W, Shi LL, et al. Microbial production of poly (glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) from glucose and xylose by *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2019, 35(2): 254–262.

摘要: 以大肠杆菌为宿主, 构建了以葡萄糖和木糖为底物获得乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯的生物合成途径, 包括过表达塔格糖-3-差向异构酶、核酮糖激酶、醛缩酶、醛脱氢酶、丙酰辅酶 A 转移酶、 β -酮硫解酶、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶和聚合酶等。在此基础上, 表达聚羟基脂肪酸酯颗粒结合蛋白, 提高了聚合物的合成, 重组菌的细胞干重达到 3.73 g/L, 含有 38.72 wt% 的共聚酯。采用混菌共培养策略, 实现以葡萄糖和木糖混合物为底物合成共聚酯, 摇瓶实验中细胞干重达到 4.01 g/L, 含有 21.54 wt% 的聚合物。文中提供了一种以葡萄糖和木糖混合物为碳源合成聚合物的方法, 为下一步纤维素水解物的有效利用提供了参考。

关键词: 聚羟基脂肪酸酯, 乙醇酸, 乳酸, 3-羟基丁酸, 葡萄糖, 木糖

Microbial production of poly (glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) from glucose and xylose by *Escherichia coli*

Yangyang Da, Wei Li, Lilong Shi, and Zhengjun Li

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: *Escherichia coli* was metabolically engineered to produce poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) using glucose and xylose as carbon sources. The combinatorial biosynthetic route was constructed by the overexpression of a series of enzymes including D-tagatose 3-epimerase, L-fuculokinase, L-fuculose-phosphate aldolase, aldehyde dehydrogenase, propionyl-CoA transferase, β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, and polyhydroxyalkanoate synthase. Overexpression of polyhydroxyalkanoate granule associated protein significantly improved biopolymer synthesis, and the recombinant strain reached 3.73 g/L cell dry weight with 38.72% (W/W) biopolymer content. A co-culture engineering strategy was developed to

Received: May 11, 2018; **Accepted:** July 26, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21476014), Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program of China (No. 2015BAD15B09).

Corresponding author: Zhengjun Li. Tel: +86-10-64421335; Fax: +86-10-64416428; E-mail: lizj@mail.buct.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21476014), 国家科技支撑计划 (No. 2015BAD15B09) 资助。

produce biopolymer from a mixture of glucose and xylose, achieving 4.01 g/L cell dry weight containing 21.54% (W/W) biopolymer. The results of this work offer an approach for simultaneously utilizing glucose and xylose and indicate the potential for future biopolymer production from lignocellulosic biomass.

Keywords: polyhydroxyalkanoate, glycolate, lactate, 3-hydroxybutyrate, glucose, xylose

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoate, 简称 PHA) 是一类由微生物在生长代谢不平衡条件下合成的作为碳源和能源储存物质的高分子聚酯^[1-2]。与传统的石油来源的塑料材料相比, PHA 具有生物可再生性和生物可降解性等优点, 引起了国内外研究者的广泛关注。随着代谢工程和合成生物学技术的进步, 越来越多的新型 PHA 合成菌株被构建出来, 在提高聚合物产量、调控聚合物单体组成和比例、降低发酵成本等方面取得了良好的进展^[3-4]。目前, PHA 材料的生产成本仍然高于石油来源的塑料材料, 成为 PHA 材料大规模工业化生产和应用的主要障碍。

葡萄糖是自然界中存在最为广泛的单糖, 是微生物发酵的主要碳源^[5]。氨基酸和有机酸等大多数发酵产品以葡萄糖为底物进行, 存在“与人争粮、与粮争地”的难题。如果能以木质纤维素为原料来获得高附加值化学品, 将会产生巨大的经济和社会效益。木糖是木质纤维素水解产物中含量仅次于葡萄糖的单糖^[6], 占木质纤维素原料的 18%–30%^[7]。然而, 木糖作为微生物的发酵原料仍是难点, 缺少有效转化木糖进行化学品生产的工程菌株^[8]。例如, 传统的乙醇发酵菌株, 包括酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[9] 和运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis*^[10] 等, 都不能够有效利用木糖。因此, 开发高效利用木糖获得生物基化学品和生物材料的工程菌株, 实现木糖的高效转化, 是促进木质纤维素资源大规模工业化应用的重要因素。

大肠杆菌是现代生物学中研究最多的细菌, 将其作为宿主进行发酵具有许多优势, 如遗传背景清楚、生长迅速、营养要求较低和底物利用范围广等。对大肠杆菌进行代谢工程改造, 可以获

得高级醇类^[11-12]、多元醇^[13]、短链烷烃^[14]、琥珀酸^[15]、葡糖二酸^[16]和脂肪酸^[17]等, 部分产品已达较高发酵水平。在之前的研究工作中, 我们利用大肠杆菌构建了葡萄糖合成乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯 poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) [P(GA-LA-3HB)] 的代谢途径^[18]。在此基础上, 文中构建了以葡萄糖和木糖为底物合成 P(GA-LA-3HB) 的生物合成途径, 并通过混菌共培养的方法实现两种碳源的同时利用, 为将来木质纤维素水解物的有效利用提供了参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

本研究使用的菌种和质粒见表 1。 *E. coli* K12(DE3) 及其木酮糖激酶基因 *xyIB* 和乙醇酸氧化酶基因 *glcD* 双敲除突变体 $\Delta xyIB \Delta glcD$ 为实验室保存。质粒 pKD13、pKD46 和 pCP20 由美国耶鲁大学 CGSC (The Coli Genetic Stock Center) 惠赠。

1.2 培养基

大肠杆菌的常规培养在 LB 培养基中进行, 大肠杆菌合成聚合物的摇瓶实验在 MMYE 培养基中进行。含有质粒的重组菌株在培养时加入相应的抗生素, 浓度分别为氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$, 卡那霉素 50 $\mu\text{g/mL}$, 氯霉素 34 $\mu\text{g/mL}$, 盐酸大观霉素 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

LB 培养基: 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L NaCl, pH 7.0。LB 固体培养基额外添加 15 g/L 的琼脂。

MMYE 培养基: 4 g/L 酵母粉, 2 g/L NH_4Cl , 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g/L KH_2PO_4 , 8.4 g/L 3-吗啉丙

表 1 本研究使用的菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Name | Description | Reference |
|---|---|------------|
| Strains | | |
| K12 (DE3) | Wild type | [20] |
| K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ | K12 (DE3) $\Delta xylB \Delta glcD$ | [20] |
| K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta ldhA$ | K12 (DE3) $\Delta xylB \Delta glcD \Delta ldhA$ | This study |
| K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$ | K12 (DE3) $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$ | This study |
| K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$ | K12 (DE3) $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$ | This study |
| PGA21 | K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ containing pET-pct-CAB and pGAx3 | This study |
| PGA22 | K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ containing pET-pct-PCAB and pGAx3 | This study |
| PGA23 | K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta ldhA$ containing pET-pct-PCAB and pGAx3 | This study |
| PGA24 | K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$ containing pGAx3 | This study |
| PGA25 | K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$ containing pET-pct-PCAB | This study |
| Plasmids | | |
| pKD13 | Template plasmid with Kan ^R gene and FLP recognition target | Yale CGSC |
| pKD46 | λ -Red recombinase expression helper plasmid, Amp ^R | Yale CGSC |
| pCP20 | FLP recombinase helper plasmid, Amp ^R , Cm ^R | Yale CGSC |
| pGAx3 | <i>dte</i> , <i>fucA</i> , <i>fucK</i> , and <i>aldA</i> expression plasmid, Spec ^R | [20] |
| pET-pct-CAB | <i>pct</i> , <i>phaC</i> , <i>phaA</i> , and <i>phaB</i> expression plasmid, Amp ^R | [18] |
| pET-pct-PCAB | <i>pct</i> , <i>phaP</i> , <i>phaC</i> , <i>phaA</i> , and <i>phaB</i> expression plasmid, Amp ^R | This study |

磺酸 (MOPS, C₇H₁₅NO₄S), 0.5 g/L NaCl, 0.24 g/L MgSO₄, 0.002 g/L Na₂MoO₄, 1 mL/L 微量元素溶液。微量元素溶液包括: 3.6 g/L FeCl₂·4H₂O, 5 g/L CaCl₂·2H₂O, 1.3 g/L MnCl₂·2H₂O, 0.38 g/L CuCl₂·2H₂O, 0.5 g/L CoCl₂·6H₂O, 0.94 g/L ZnCl₂, 0.03 g/L H₃BO₃, 0.4 g/L Na₂EDTA·2H₂O, 1.01 g/L thiamine-HCl。

1.3 主要试剂

Pusion High-Fidelity DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶等购于 New England Biolabs 公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购于北京博迈德基因技术有限公司; 聚-3-羟基丁酸酯和聚乳酸-乙醇酸共聚酯标准品购于 Sigma-Aldrich 公司。其他抗生素、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、酵母粉和蛋白胨等试剂均为国产或进口分析纯。

1.4 pET-pct-PCAB 的构建

对罗氏真养菌 *Ralstonia eutropha* H16 的 PHA

颗粒结合蛋白基因 *phaP1* 的序列进行密码子优化, 基因全序列合成由无锡青兰生物科技有限公司完成。人工合成的 *phaP1* 插入到质粒 pET-pct-CAB^[18] 的 *Pst* I 和 *Not* I 位点, 构建质粒 pET-pct-PCAB, 含有 T7 启动子转录的 *pct*、*phaP1*、*phaC*、*phaA* 和 *phaB* 基因 (图 1)。

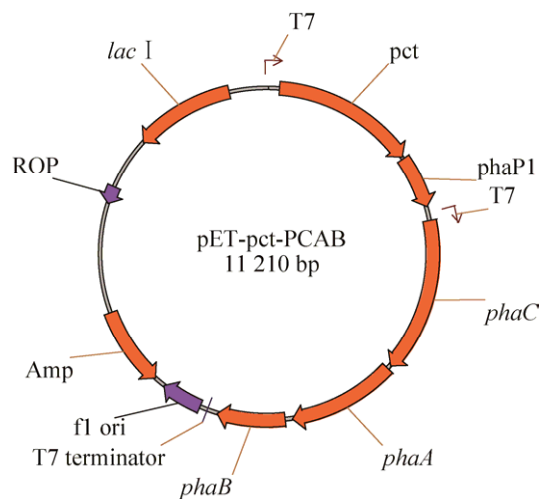


图 1 pET-pct-PCAB 的质粒图谱

Fig. 1 Schematic map of pET-pct-PCAB.

1.5 突变菌株的构建

采用 Red 同源重组的方法在大肠杆菌中构建基因缺失突变体^[19], 基因敲除所需的引物见表 2, 引物合成和 DNA 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

1.5.1 K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$ 的构建

以质粒 pKD13 为模板, ptsF 和 ptsR 为引物, PCR 扩增约 1.5 kb 的含有卡那霉素抗性基因的 DNA 片段, 纯化之后, 电击转化含有质粒 pKD46 的 K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ 感受态细胞, 涂布含有卡那霉素的 LB 平板, 30 °C 培养 24 h, 挑单克隆进行菌落 PCR 和 DNA 测序鉴定, 得到含有卡那霉素抗性的丙酮酸-糖磷酸转移酶系统基因 *pts* 缺失突变体。

将质粒 pCP20 转化到上述突变体中, 涂布含有氯霉素的 LB 平板, 30 °C 培养 24 h, 消除卡那霉素抗性; 挑单克隆转接到无抗的 LB 平板, 42 °C 培养 24 h, 丢失 pCP20 质粒; 最后验证菌株的抗性, 选择没有氯霉素、卡那霉素和氨苄青霉素抗性的菌株进行菌落 PCR 和 DNA 测序鉴定,

获得最终的 *pts* 缺失突变体 K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$ 。

1.5.2 K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$ 的构建

以 K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ 为初始菌株, 木糖异构酶基因 *xylA* 的敲除与 *pts* 的敲除采用同样的方法进行。

1.5.3 K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta ldhA$ 的构建

以 K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ 为初始菌株, 乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 的敲除与 *pts* 的敲除采用同样的方法进行。

1.6 聚合物合成的摇瓶培养

1.6.1 单菌培养

质粒 pET-pct-CAB^[18]和含有木糖合成乙醇酸相关基因的质粒 pGAx3^[20]共转化到 *E. coli* K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ 中, 构建重组菌 PGA21。质粒 pET-pct-PCAB 和 pGAx3 共转化到 *E. coli* K12 $\Delta xylB \Delta glcD$ 中, 构建重组菌 PGA22。质粒 pET-pct-PCAB 和 pGAx3 共转化到 *E. coli* K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta ldhA$ 中, 构建重组菌 PGA23。

从冻存管中取出菌种 PGA21、PGA22 和 PGA23, 接种到 LB 培养基中 37 °C 培养 12 h 作为种子液。3 种菌分别以 2% (V/V) 的接种量转接到含有 25 mL MMYE+5 g/L 木糖培养基的 250 mL 摇瓶中, 37 °C 培养 18 h 后, 添加葡萄糖至终浓度 20 g/L, 添加 IPTG 诱导基因表达, 继续培养 54 h。

1.6.2 混菌培养

质粒 pGAx3 电击转化到 *E. coli* K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$ 中, 构建重组菌 PGA24。质粒 pET-pct-PCAB 电击转化到 *E. coli* K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$ 中, 构建重组菌 PGA25。

从冻存管中取出菌种 PGA24 和 PGA25, 接种到 LB 培养基中 37 °C 培养 12 h 作为种子液。以 1% (V/V) 的接种量一起转接到含有 25 mL MMYE+5 g/L 木糖+20 g/L 葡萄糖培养基的 250 mL 摇瓶

表 2 基因敲除所需的引物

Table 2 Oligonucleotides used in this study

| Primer | Sequence (5'-3') |
|--------|--|
| ptsF | TCGAACCGCCAGGCTAGACTTTAGTTCCA CAACTACTAAACCTATAAGTTGGGGAAATA CAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| ptsR | AAAAATGGCGCCGATGGGCGCCATTTTTTC ACTGCGGCAAGAATTACTTCTTGATGCGGA TATCCGGGGATCCGTCGACC |
| xylAF | ATGCAAGCCTATTTTGACCAGCTCGATCGC GTTTCGTTATGAAGGCTCAAAATCCTCAAA CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| xylAR | CGGTGGTGAAACCGCCTGCTTTGAGAATT TCATACATCACCAGCGCATTCTCTCCACA CATCCGGGGATCCGTCGACC |
| ldhAF | TATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACAT CACTGGAGAAAGTCTTATGGTGTAGGCTG GAGCTGCTTCG |
| ldhAR | CTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGA TTAAACCAGTTCGTTCCGGCAATTCCGGG GATCCGTCGACC |

中, 37 °C 培养 12 h 后, 添加 IPTG 诱导基因表达, 继续培养 60 h。

1.7 分析方法

摇瓶培养结束后, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 然后用去离子水洗涤、离心, 去掉菌体表面粘附的培养基成分。将得到的细胞在抽真空条件下冰冻干燥至恒重, 测定细胞干重 (Cell dry weight, CDW)。

取 50 mg 左右干细胞于酯化管中, 加入 2 mL 酯化液 (含有 2 g/L 苯甲酸、3% (V/V) 浓硫酸的色谱纯甲醇溶液) 和 2 mL 氯仿, 加盖密闭。100 °C 酯化反应 4 h。冷却至室温后, 加入 1 mL 去离子水, 充分振荡混匀, 静置分层。待氯仿相与水相完全分离后, 取氯仿相进行气相色谱 (Gas chromatography, GC) 分析。使用 HP 6890 型气相色谱仪和 HP-5 毛细管柱, 进样口温度 200 °C, 检测器温度 220 °C。柱温从 80 °C 开始, 停留 1.5 min; 以 30 °C/min 的速率升温到 140 °C, 停留 0 min; 再以 40 °C/min 的速率升温到 220 °C, 停留 0.5 min。聚合物标品采用同样的方法进行, 利用内标法计算干细胞中聚合物的组成和含量。

2 结果与分析

2.1 构建 P(GA-LA-3HB) 合成途径

以葡萄糖和木糖为联合碳源, 设计乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯 P(GA-LA-3HB) 的生物合成途径。如图 2 所示, 葡萄糖经糖酵解途径生成丙酮酸, 丙酮酸在乳酸脱氢酶 LdhA 催化下生成乳酸, 表达辅酶 A 转移酶 Pct, 使乳酸转化为乳酰 CoA, 作为乳酸聚合的前体。表达 β -酮硫解酶 PhaA 和乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 PhaB, 使乙酰辅酶 A 生成 3-羟基丁酰辅酶 A, 作为 3-羟基丁酸聚合的前体。木糖在木糖异构酶 XylA、塔格糖-3-差向异构酶 Dte、核酮糖激酶 FucK、醛缩酶 FucA 和醛脱氢酶 AldA 的催化下生成乙醇酸, 再表达辅酶 A 转移酶 Pct, 使乙醇酸转化为乙醇酰 CoA, 作为乙醇酸聚合的前体。最后, 表达 PHA 聚合酶 PhaC, 催化乙醇酰辅酶 A、乳酰辅酶 A 和 3-羟基丁酰辅酶 A 的聚合反应, 获得含有乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸 3 种单体组分的聚合物。

构建大肠杆菌 PGA21, 过表达 *dte*、*fucK*、*fucA*、*aldA*、*pct*、*phaA*、*phaB* 和 *phaC* 基因。按照 1.6.1

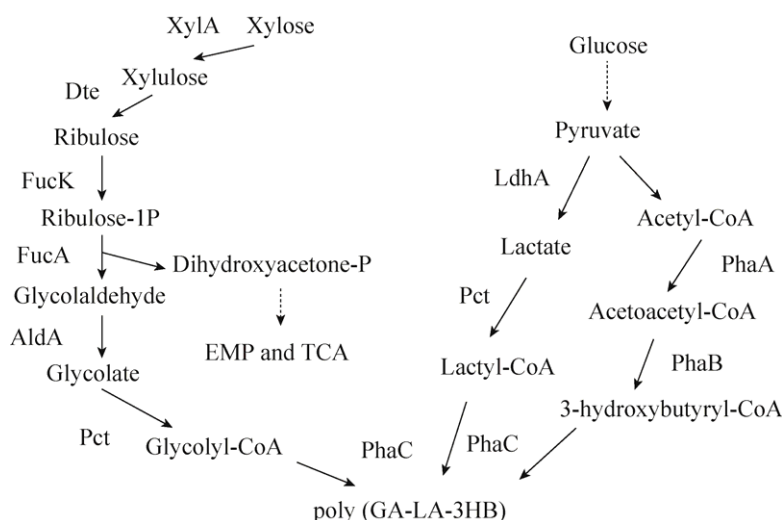


图 2 葡萄糖和木糖合成 P(GA-LA-3HB) 的代谢途径

Fig. 2 P(GA-LA-3HB) biosynthetic pathway from glucose and xylose.

所述的方法进行摇瓶实验,检测重组菌的细胞生长和聚合物合成情况。结果表明,PGA21 的细胞干重达 2.58 g/L,含有 10.44 wt%的 P(21.75 mol% GA-14.21 mol% LA-3HB)。这说明设计的共聚酯合成途径能够在大肠杆菌中成功表达。重组菌首先利用木糖合成乙醇酸单体,接下来利用葡萄糖合成 P(GA-LA-3HB) 聚合物,但共聚酯的含量较低,仅为细胞干重的 10%左右。

2.2 PHA 颗粒结合蛋白表达对共聚酯合成的影响

细胞内合成的聚羟基脂肪酸酯以不溶于水的颗粒形式存在,其表面除存在 PHA 聚合酶外,还有一类双亲性的 PHA 颗粒结合蛋白,能够阻止不同 PHA 颗粒之间的融合,调控细胞内 PHA 颗粒的大小和比表面积^[21]。罗氏真养菌 *R. eutropha* H16 的 PhaP1 是研究最为清楚的 PHA 颗粒结合蛋

白^[22],其编码序列经密码子优化后,在大肠杆菌中异源表达。构建重组菌 PGA22,研究 PHA 颗粒结合蛋白过表达对 P(GA-LA-3HB) 合成的影响。如图 3A 和图 3B 所示,PGA22 的细胞干重达 3.73 g/L,含有 38.72 wt% 的 P(22.69 mol% GA-8.88 mol% LA-3HB)。过表达 PhaP1 明显提高了细胞干重和聚合物含量,与对照菌 PGA21 相比,PGA22 中 P(GA-LA-3HB) 产量由 0.27 g/L 提高到 1.44 g/L。de Almeida 等^[23]和 Zhou 等^[24]分别报道了 PHA 颗粒结合蛋白对聚-3-羟基丁酸酯和聚 4-羟基丁酸酯合成的促进作用,所使用的 PhaP 和聚合酶 PhaC 均来自于相同的菌株。本研究所使用的聚合酶 PhaC 来自于假单胞菌,这说明 *R. eutropha* H16 的 PhaP1 对异源聚合酶催化的 PHA 合成也有促进作用。

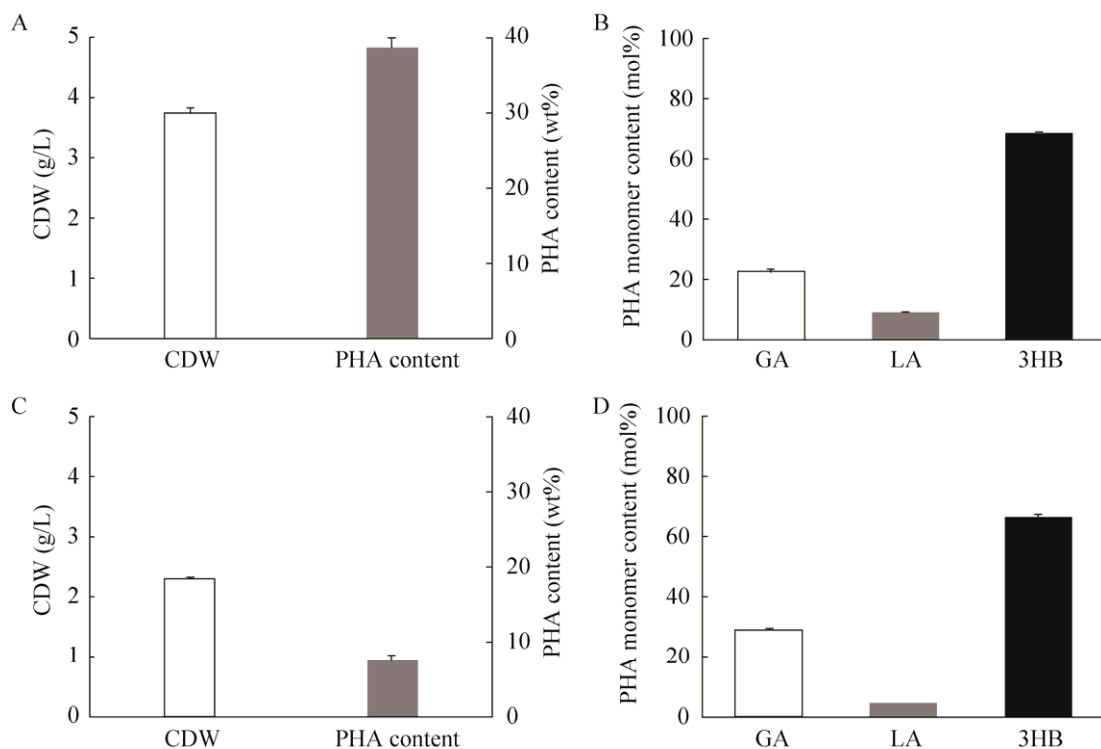


图 3 大肠杆菌 PGA22 和 PGA23 合成 P(GA-LA-3HB) 的摇瓶实验

Fig. 3 P(GA-LA-3HB) production by *E. coli* PGA22 or PGA23 grown in shake flasks. (A) CDW and PHA content of PGA22. (B) PHA monomer content of PGA22. (C) CDW and PHA content of PGA23. (D) PHA monomer content of PGA23.

2.3 *ldhA* 基因敲除对共聚酯合成的影响

乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 在大肠杆菌中负责催化丙酮酸还原为乳酸。对 *ldhA* 基因进行敲除, 研究其缺失对 P(GA-LA-3HB) 合成的影响。如图 3C 和图 3D 所示, 与对照菌 PGA22 相比, *ldhA* 基因敲除菌 PGA23 的细胞干重和聚合物含量都有明显降低, 细胞干重从 3.73 g/L 下降到 2.30 g/L, 聚合物含量从 38.72 wt% 下降到 7.49 wt%。虽然 PGA23 中的乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 被敲除, 但所得聚合物中仍然检测到少量乳酸单体。有研究表明, 大肠杆菌细胞内存在甲基乙二醛循环, 能以糖酵解中间体磷酸二羟丙酮为前体合成少量乳酸^[25]。*ldhA* 基因缺失导致了聚合物产量下降, 提示乳酸单体的存在有利于 P(GA-LA-3HB) 的合成。

2.4 混菌共培养合成 P(GA-LA-3HB)

由于碳代谢物阻遏 (Carbon catabolite repression, CCR) 效应, 大肠杆菌在含有葡萄糖和木糖的混合碳源中, 首先利用葡萄糖进行生长, 当葡萄糖耗尽后才能够代谢木糖^[26-27]。因此, 在单菌摇瓶培养中, 首先向培养基中加入木糖, 分解产生乙醇酸单体, 再加入葡萄糖来合成聚合物。在木质纤维素水解液中, 葡萄糖和木糖是同时存在的。为了达到两者的同时利用, 采用了混菌共培养的方法。

构建磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统基因 *pts* 缺失的突变体 K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$, 该突变体在含有葡萄糖和木糖混合碳源的基本培养基中, 只能利用葡萄糖进行生长, 但葡萄糖代谢速度变慢 (图 4A)。转入木糖合成乙醇酸相关基

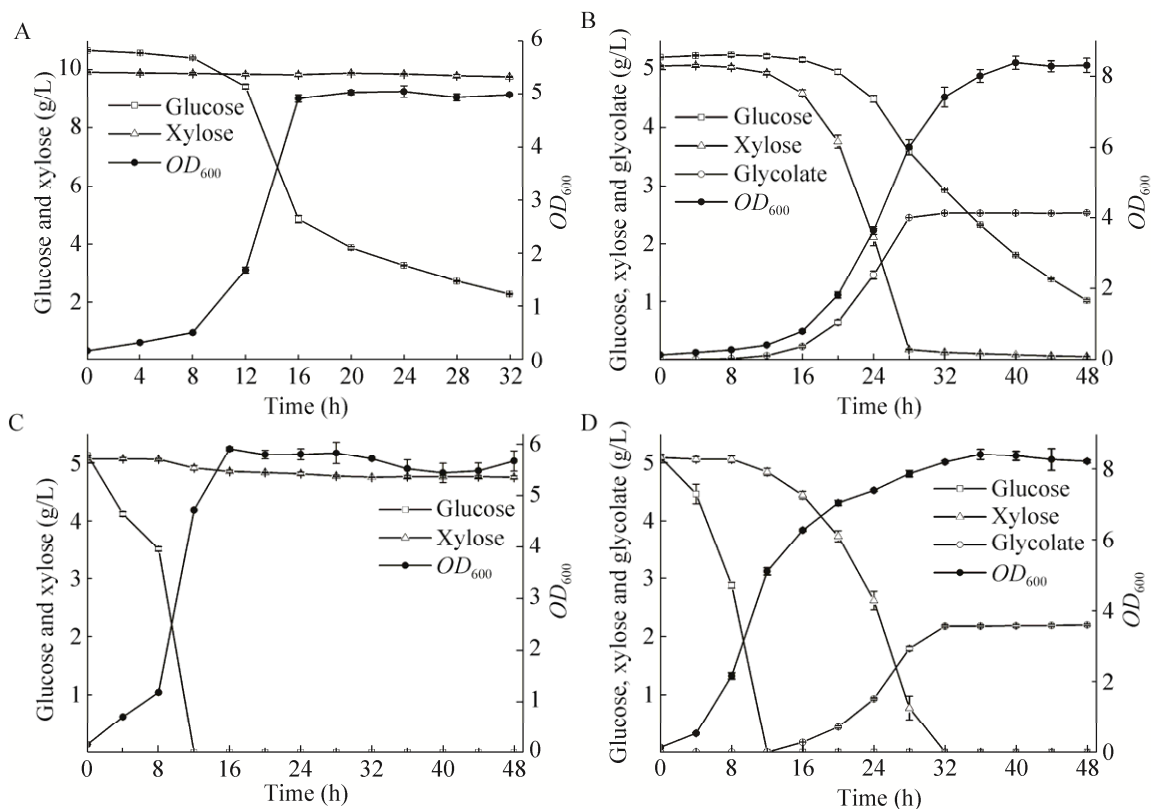


图 4 构建同时利用葡萄糖和木糖的混菌培养体系

Fig. 4 The construction of a coculture system to simultaneously utilize glucose and xylose. (A) K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta pts$. (B) PGA24. (C) K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$. (D) PGA24 and PGA25 coculture.

因 *dte*、*fucK*、*fucA*、*aldA*，所得重组菌 PGA24 在葡萄糖和木糖同时存在的条件下，首先利用木糖生产乙醇酸，随后开始代谢葡萄糖 (图 4B)。构建木糖异构酶基因 *xylA* 缺失的突变体 K12 $\Delta xylB \Delta glcD \Delta xylA$ ，该突变体在含有葡萄糖和木糖混合碳源的基本培养基中，只能利用葡萄糖进行生长 (图 4C)。转入聚合物合成基因 *pct*、*phaA*、*phaB*、*phaC*，构建重组菌 PGA25。在葡萄糖和木糖混合物中，PGA24 首先利用木糖，PGA25 只能利用葡萄糖，将 PGA24 和 PGA25 混合共培养，两种碳源可以同时被消耗 (图 4D)。

进行混菌共培养合成 P(GA-LA-3HB)的摇瓶实验，将 PGA24 和 PGA25 混合共培养在含有葡萄糖和木糖的 MMYE 培养基中，获得了 4.01 g/L 的细胞干重，含有 21.54 wt% 的 P(2.81 mol% GA-2.82 mol% LA-3HB) (图 5A, 5B)。这说明，混

菌共培养能够在含有葡萄糖和木糖混合物的培养基中获得共聚酯，但聚合物中乙醇酸和乳酸单体的比例较低，3-羟基丁酸单体的比例超过 90 mol%。后续研究中，进一步调控 PGA24 和 PGA25 的接种比例，有可能获得单体含量多样的 P(GA-LA-3HB) 共聚酯材料。

3 结论

本研究通过在大肠杆菌中表达塔格糖-3-差向异构酶、核酮糖激酶、醛缩酶、醛脱氢酶、丙酰辅酶 A 转移酶、 β -酮硫解酶、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶和聚合酶，成功构建了葡萄糖和木糖为碳源合成乙醇酸、乳酸和 3-羟基丁酸共聚酯的生物合成途径。在此基础上，表达聚羟基脂肪酸酯颗粒结合蛋白，明显提高了聚合物的合成。

对大肠杆菌的糖代谢途径进行改造，获得在葡萄糖和木糖混合物中仅能利用葡萄糖或者木糖的突变体。将两种突变体混合培养，实现利用葡萄糖和木糖混合物合成聚合物，为将来纤维素水解物的有效利用提供了参考。

REFERENCES

- [1] Wang Y, Yin J, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30: 59–65.
- [2] Lenz RW, Marchessault RH. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 1–8.
- [3] Chen GQ, Jiang XR. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(3): 192–197.
- [4] Chen GQ, Hajnal I, Wu H, et al. Engineering biosynthesis mechanisms for diversifying polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(10): 565–574.
- [5] Becker J, Lange A, Fabarius J, et al. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 36: 168–175.

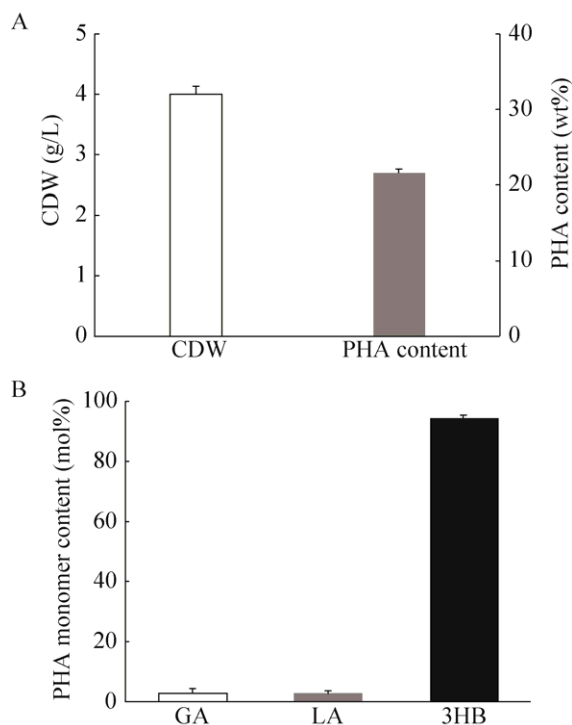


图 5 大肠杆菌混菌共培养转化葡萄糖和木糖混合物合成 P(GA-LA-3HB)

Fig. 5 Conversion of glucose-xylose mixture to P(GA-LA-3HB) using an *E. coli-E. coli* coculture strategy. (A) CDW and PHA content. (B) PHA monomer content.

- [6] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30(5): 279–291.
- [7] Liu WX, Fu J, Zhang B, et al. Engineering of the xylose metabolic pathway for microbial production of bio-based chemicals. *Chin J Biotech*, 2013, 29(8): 1161–1172 (in Chinese).
刘维喜, 付晶, 章博, 等. 微生物木糖代谢途径改造制备生物基化学品. *生物工程学报*, 2013, 29(8): 1161–1172.
- [8] Wang J, Shen XL, Lin YH, et al. Investigation of the synergetic effect of xylose metabolic pathways on the production of glutaric acid. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(1): 24–29.
- [9] Jeffries TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17(3): 320–326.
- [10] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, 267(5195): 240–243.
- [11] Wen M, Bond-Watts BB, Chang MCY. Production of advanced biofuels in engineered *E. coli*. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(3): 472–479.
- [12] Peralta-Yahya PP, Zhang FZ, del Cardayre SB, et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 2012, 488(7411): 320–328.
- [13] Yim H, Haselbeck R, Niu W, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1, 4-butanediol. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7): 445–452.
- [14] Choi YJ, Lee SY. Microbial production of short-chain alkanes. *Nature*, 2013, 502(7472): 571–574.
- [15] Tan ZG, Chen J, Zhang XL. Systematic engineering of pentose phosphate pathway improves *Escherichia coli* succinate production. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 262.
- [16] Shiue E, Prather KLJ. Improving D-glucaric acid production from *myo*-inositol in *E. coli* by increasing MIOX stability and *myo*-inositol transport. *Metab Eng*, 2014, 22: 22–31.
- [17] Xu P, Gu Q, Wang WY, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun*, 2013, 4: 1409.
- [18] Li ZJ, Qiao KJ, Shi WC, et al. Biosynthesis of poly(glycolate-*co*-lactate-*co*-3-hydroxybutyrate) from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2016, 35: 1–8.
- [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] Pereira B, Li ZJ, de Mey M, et al. Efficient utilization of pentoses for bioproduction of the renewable two-carbon compounds ethylene glycol and glycolate. *Metab Eng*, 2016, 34: 80–87.
- [21] Pötter M, Steinbüchel A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*, 2005, 6(2): 552–560.
- [22] Pötter M, Müller H, Steinbüchel A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 2005, 151(3): 825–833.
- [23] de Almeida A, Nickel PI, Giordano AM, et al. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(24): 7912–7916.
- [24] Zhou XY, Yuan XX, Shi ZY, et al. Hyperproduction of poly(4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 54.
- [25] Grabar TB, Zhou S, Shanmugam KT, et al. Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(–)-lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(19): 1527–1535.
- [26] Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT. Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanologenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6): 1766–1771.
- [27] Deutscher J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(2): 87–93.

(本文责编 陈宏宇)