

利用温度调节实现新型重组菌高效转化甘油为 D-乳酸

田康明¹, 周丽¹, 陈献忠¹, 沈微¹, 石贵阳², Suren Singh³, 路福平⁴, 王正祥⁴

1 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 发酵粮食国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122

3 德班理工大学 生物工程与食品技术学院应用科学系, 南非 德班 4001

4 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

田康明, 周丽, 陈献忠, 等. 利用温度调节实现新型重组菌高效转化甘油为 D-乳酸. 生物工程学报, 2013, 29(1): 111-114.
Tian KM, Zhou L, Chen XZ, et al. Temperature-switched high-efficient D-lactate production from glycerol. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 111-114.

摘 要: 油脂水解来源的甘油将是未来发酵工业主要原料之一。文中探索 D-乳酸高产大肠杆菌 *Escherichia coli* CICIM B0013-070 菌株不同培养温度下好氧与厌氧代谢甘油的特征后, 建立并优化了一种新型 D-乳酸变温发酵工艺, 甘油到乳酸的得率由 64% 提高到 82.6%。另外, 在 B0013-070 中引入了温度诱导型乳酸脱氢酶的转录系统, 甘油到乳酸的得率进一步提高到 88.9%。

关键词: D-乳酸, 甘油, 变温发酵

Temperature-switched high-efficiency D-lactate production from glycerol

Kangming Tian¹, Li Zhou¹, Xianzhong Chen¹, Wei Shen¹, Guiyang Shi², Suren Singh³, Fuping Lu⁴, and Zhengxiang Wang⁴

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Department of Biotechnology & Food Technology, Faculty of Applied Sciences, Durban University of Technology, P.O. Box 1334, Durban, 4001, South Africa

4 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Glycerol from oil hydrolysis industry is being considered as one of the abundant raw materials for fermentation industry. In present study, the aerobic and anaerobic metabolism and growth properties on glycerol by *Escherichia coli* CICIM B0013-070, a D-lactate over-producing strain constructed previously, at different temperatures were investigated, followed by a novel fermentation process, named temperature-switched process, was established for D-lactate production from glycerol. Under the optimal condition, lactate yield was increased from 64.0% to 82.6%. Subsequently, the yield of

Received: November 19, 2012; **Accepted:** December 19, 2012

Supported by: International Science and Technology Cooperation Program (No. CS06-L11).

Corresponding author: Zhengxiang Wang. Tel/fax: +86-510-85918121; E-mail: zx.wang@yahoo.com.

国际科技合作项目 (No. CS06-L11) 资助。

D-lactate from glycerol was reached up to 88.9% while a thermo-inducible promoter was used to regulate D-lactate dehydrogenase transcription.

Keywords: D-lactate, glycerol, temperature-swifted process

油脂水解工业中的主要副产物甘油正成为发酵工业中重要的碳源之一^[1]。生物柴油工业的健康发展从某种意义上讲,决定于副产物甘油的就地快捷转化工业的成功实施^[2]。由于甘油分子较葡萄糖具有更高的还原力,因此,以甘油为碳源的生物转化过程一定有其特点^[3-9]。作者所在的课题组,前期建立了好氧菌体生长和微好氧发酵产酸两阶段甘油发酵产D-乳酸的工艺,并通过构建同型乳酸发酵的重组大肠杆菌显著地提高了D-乳酸的合成速率^[10]。不足的是,氧气的存在使得甘油较多地流向了细胞合成,因此,尽管通过增加乳酸脱氢酶的基因拷贝数增强了乳酸的合成效率,最优发酵条件下的乳酸得率达到了78%,但提升的空间仍然巨大^[10]。

为进一步提高甘油到D-乳酸的转化率,本研究首先探索不同培养温度下重组菌好氧与厌氧代谢甘油的特征,在此基础上建立并优化了一种新型D-乳酸变温发酵工艺,并进一步引入了温度诱导型D-乳酸脱氢酶的转录系统,甘油到乳酸的得率得到显著提高。

1 材料与方法

1.1 菌株

重组菌 *Escherichia coli* CICIM B0013-070 (B0013, $\Delta ack-pta$ Δpps $\Delta pflB$ Δdld $\Delta poxB$ $\Delta adhE$ $\Delta frdA$) 和 *E. coli* CICIM B0013-070B (B0013-070, $ldhAp::kan-cf^{857-p_R-p_L}$), 由江南大学中国高校工业微生物资源信息中心 (CICIM-CU, <http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn>) 提供。

1.2 培养基

LB 培养基^[10], 添加琼脂 2% 即为固体培养基。发酵培养基^[10]: M9 培养基添加 0.1% 的 $MgSO_4$ 母液 (1 mol/L) 和 0.1% 的微量元素母液。甘油添加

量根据不同发酵方式进行确定。

1.3 试验设计方案

1.3.1 最适生长温度和最适产酸温度的确定

在 30 °C~45 °C 条件下确认最适的菌体生长温度; 在 37 °C~50 °C 和 150 r/min 条件下, 摇床培养, 确认最适的发酵产酸温度。

1.3.2 温度诱导型 D-乳酸脱氢酶表达系统的引入

按照文献[11]进行。

2 结果与分析

2.1 适宜的菌体生长温度有助于获得高活性的细胞

发酵工业体系中最高生物量以及最高细胞代谢活力与产物形成最大化之间, 往往不能统一, 有时甚至互为矛盾。在有机酸发酵过程中, 这一矛盾尤为显著^[12]。为此, 首先探讨了培养温度对细胞生长和产物积累间影响特征, 结果如图 1A 所示。在 34 °C~37 °C 下表现出最优的生长性能。进一步分析发现, 在 34 °C 下, 好氧菌体生长阶段后期乳酸的积累量明显低于 37 °C (图 1B)。因此, 选择 34 °C 培养温度为菌体生长的最适温度。

2.2 发酵阶段适度提升发酵温度更有利于 D-乳酸合成

在获得了较高活性的菌体后, 发酵温度达到 42 °C 时, 菌体总量较发酵初始时没有明显增加, 乳酸积累量则达到最大值。在此温度下, 甘油到乳酸的得率最高 (图 2)。

2.3 变温工艺下重组菌合成 D-乳酸的效率得到显著提升

在 7 L 发酵罐中, 细胞生长阶段使用 34 °C 培养, 发酵产物形成阶段使用 42 °C 培养。好氧阶段

由原来的 9.7 h 缩短为 9.4 h。产物形成阶段, 升高的培养温度, 提高了乳酸脱氢酶的催化活性并限制了菌体的生长, 甘油到乳酸的得率提高到 82.6% (图 3A)。

2.4 温度诱导 D-乳酸脱氢酶表达提高了甘油到 D-乳酸的转化效率

将 *ldhA* 的启动子替换为温度诱导型 λ 噬菌体的 p_R-p_L 串联启动子, 获得了重组菌 070B^[11]。在 7 L 发酵罐中, 好氧阶段的生长周期进一步缩短为 8.7 h。变温发酵工艺下, 经过 30 h 的好氧菌体生长和微好氧发酵产酸过程, 发酵液中的乳酸终浓度达到 127.0 g/L, 产酸速率也由 3.66 g/(L·h) 提高到 4.23 g/(L·h)。甘油到乳酸的得率进一步提高到 88.9% (图 3)。

大肠杆菌利用甘油合成乳酸的研究, 始于 2009

年清华大学首次报道的一株野生大肠杆菌代谢甘油合成乳酸的研究^[13], 尽管野生菌株合成乳酸过程中伴生了乙酸、琥珀酸、甲酸和酒精等副产物^[10,13-14]。随后的研究中, 通过代谢途径修饰实现了甘油到乳酸的同型发酵生产^[2,10], 但全程限氧发酵工艺中, 甘油到乳酸的转化速率不高^[2,13]。因此, 作者所在的课题组提出了充分好氧获得足够的菌体活性, 然后在转入微好氧发酵产酸的发酵方式^[10]。

温度提高对菌体生长的限制存在多种解释。目前被认可的一种解释是, 温度提高后, 用于赖氨酸合成的关键酶的活性降低, 导致甲硫氨酸合成受阻, 最终导致菌体生长受到限制^[15]。可以确认的是, 发酵温度升高到 42 °C 后, 菌体的生长受到了一定的限制, 而乳酸的合成过程在发酵阶段前期有所增强, 因此最终提高了甘油到乳酸的转化效率。引入

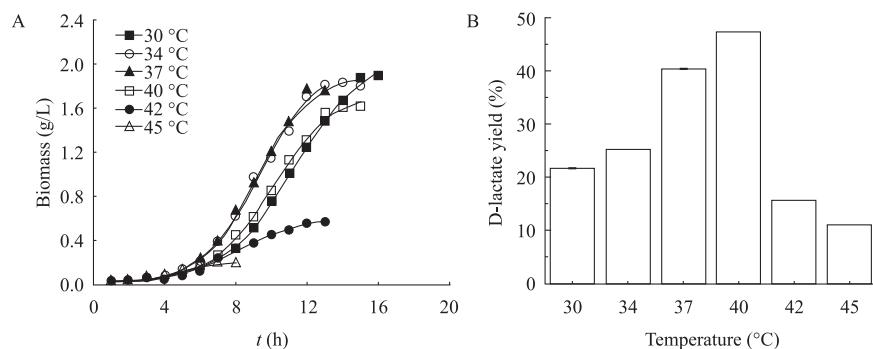


图 1 不同温度下 *E. coli* CICIM B0013-070 的生长特征和 D-乳酸合成

Fig. 1 Growth and D-lactate yield of CICIM B0013-070 at different temperatures. (A) Cell growth. (B) D-lactate yield.

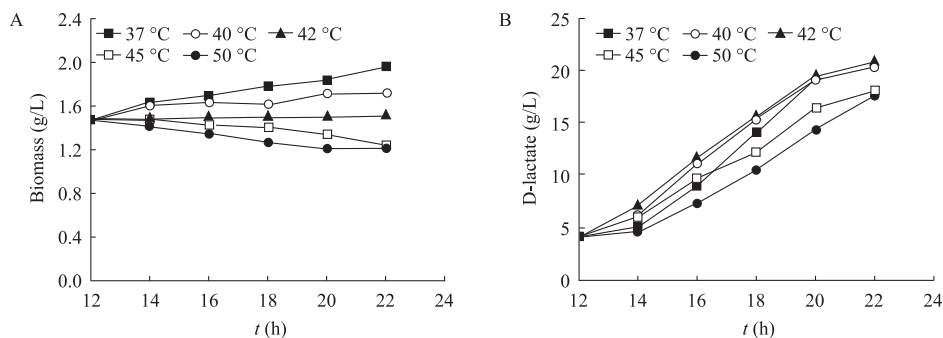


图 2 发酵产酸阶段不同发酵温度下 *E. coli* CICIM B0013-070 菌体量的积累和乳酸生成

Fig. 2 Biomass accumulation and D-lactate production of *E. coli* CICIM B0013-070 during the fermentation phase under different temperature. (A) Cell growth. (B) D-Lactate accumulation.

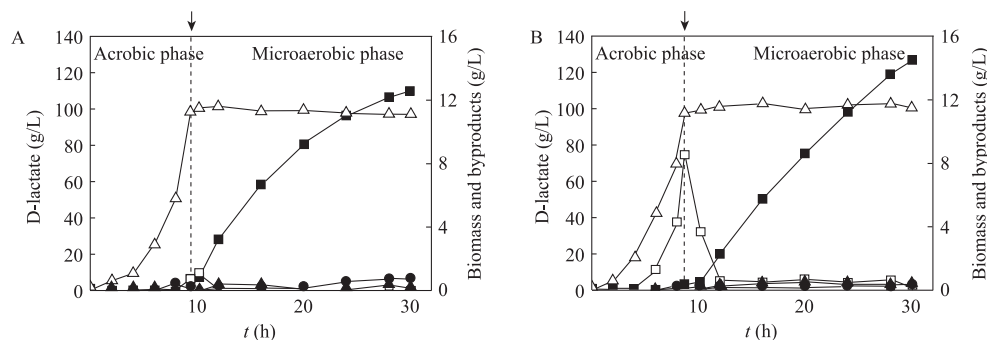


图3 变温工艺下重组菌在7 L发酵罐中的生长和产酸情况

Fig. 3 Cell growth and D-lactate production using temperature-switched fermentation process. The arrow indicates the time when the culture was switched from the aerobic cultivation at 34 °C to the microaerobic production phase at 42 °C. (A) *E. coli* CICIM B0013-070. (B) *E. coli* CICIM B0013-070B; ■: D-lactate; ●: acetate; ▲: succinate; □: pyruvate; △: cell mass.

D-乳酸脱氢酶温度诱导表达后,使得在整个发酵产酸过程中D-乳酸脱氢酶的酶活水平持续维持在较高的水平,从而实现了甘油到乳酸的高效合成。可以看出,变温发酵工艺的建立和温度诱导型乳酸脱氢酶转录系统的引入有效地提高了甘油到乳酸的合成速率和得率。这一过程的实现对于解决其他重大发酵产物合成过程与菌体生长之间的矛盾关系同样有借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103: 148–161.
- [2] Mazumdar S, Clomburg JM, Gonzalez R. Engineered *Escherichia coli* strains for the homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 4327–4336.
- [3] Blankschien MD, Clomburg JM, Gonzalez R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metab Eng*, 2010, 12: 409–419.
- [4] Ito T, Nakashimada Y, Senba K, et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100: 260–265.
- [5] Pagliaro M, Ciriminna R, Kimura H, et al. From glycerol to value-added products. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46: 4434–4440.
- [6] Shams Yazdani S, Gonzalez R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metab Eng*, 2008, 10: 340–351.
- [7] Yazdani SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18: 213–219.
- [8] Zhang X, Shanmugam KT, Ingram LO. Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 2397–2401.
- [9] Liu H, Kang J, Qi Q, et al. Production of lactate in *Escherichia coli* by redox regulation genetically and physiologically. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 164: 162–169.
- [10] Tian KM, Chen XZ, Shen W, et al. High-efficiency conversion of glycerol to D-lactic acid with metabolically engineered *Escherichia coli*. *Afri J Biotechnol*, 2012, 11: 4860–4867.
- [11] Zhou L, Niu DD, Tian KM, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2012, 14: 560–568.
- [12] Zhou L, Tian KM, Niu DD, et al. Improvement of D-lactate productivity in recombinant *Escherichia coli* by coupling production with growth. *Biotechnol Lett*, 2012, 34: 1123–1130.
- [13] Hong AA, Cheng KK, Peng F, et al. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *J Chem Technol Biotechnol*, 2009, 84: 1576–1581.
- [14] Zhu Y, Eiteman MA, DeWitt K, et al. Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 456–464.
- [15] Ron EZ, Davis BD. Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine. *J Bacteriol*, 1971, 107: 391–396.

(本文责编 陈宏宇)