

## 研究报告

# 利用代谢工程构建 D-甘露醇生产菌株

王小芳<sup>1,2,3\*</sup>, 陈晶<sup>1,2,3\*</sup>, 刘萍萍<sup>2,3</sup>, 徐洪涛<sup>2,3</sup>, 郁彭<sup>1</sup>, 张学礼<sup>2,3</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

王小芳, 陈晶, 刘萍萍, 等. 利用代谢工程构建 D-甘露醇生产菌株. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1450–1462.

Wang XF, Chen J, Liu PP, et al. Production of D-mannitol by metabolically engineered *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1450–1462.

**摘要:** D-甘露醇广泛应用于食品、制药、化学品工业等领域。从野生型大肠杆菌出发, 将来自假肠膜明串珠菌 *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 菌株的甘露醇脱氢酶与果糖转运蛋白编码基因整合到大肠杆菌 ATCC 8739 的染色体中, 并失活其他的发酵途径 (丙酮酸甲酸裂解酶、乳酸脱氢酶、富马酸还原酶、乙醇脱氢酶、甲基乙二醛合成酶和丙酮酸氧化酶), 构建了一株遗传稳定的 D-甘露醇生产菌株。使用无机盐培养基和葡萄糖果糖作为混合碳源, 厌氧发酵 6 d, D-甘露醇产量达 1.2 mmol/L。基于细胞生长和 D-甘露醇合成的偶联, 进一步通过代谢进化技术提高细胞合成 D-甘露醇的生产能力。经过 80 代的驯化, D-甘露醇产量提高了 2.6 倍, 甘露醇脱氢酶的活性提高了 2.8 倍。构建获得的遗传稳定的工程菌能直接发酵糖生产 D-甘露醇, 不需添加抗生素、诱导剂和甲酸, 在工业化生产时有一定优势。

**关键词:** D-甘露醇, 代谢进化, 甘露醇脱氢酶, 大肠杆菌

**Received:** July 18, 2013; **Accepted:** September 4, 2013

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00800), the Hundred Talents Program of the Chinese Academy of Sciences.

**Corresponding author:** Xueli Zhang. Tel/Fax: 86-22-84861983; Email: zhang\_xl@tib.cas.cn

\* These authors contributed equally to this study.

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00800), 中国科学院百人计划资助。

网络出版时间: 2013-09-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130923.1040.001.html>

# Production of D-mannitol by metabolically engineered *Escherichia coli*

Xiaofang Wang<sup>1,2,3\*</sup>, Jing Chen<sup>1,2,3\*</sup>, Pingping Liu<sup>2,3</sup>, Hongtao Xu<sup>2,3</sup>, Peng Yu<sup>1</sup>,  
and Xueli Zhang<sup>2,3</sup>

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

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** D-Mannitol has wide applications in food, pharmaceutical, and chemical industries. In this study, we constructed a genetically stable *Escherichia coli* strain for D-mannitol production by integrating mannitol dehydrogenase (*mdh*) and fructose permease (*fupL*) genes of *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 into chromosome of *E. coli* ATCC 8739 and inactivating other fermentation pathways (including pyruvate formate-lyase, lactate dehydrogenase, fumarate reductase, alcohol dehydrogenase, methylglyoxal synthase and pyruvate oxidase). Using mineral salts medium with glucose and fructose as carbon sources, the engineered strain could produce 1.2 mmol/L D-mannitol after anaerobic fermentation for 6 days. Based on the coupling of cell growth and D-mannitol production, metabolic evolution was used to improve D-mannitol production. After evolution for 80 generations, D-mannitol titer increased 2.6-fold and mannitol dehydrogenase activity increased 2.8-fold. Genetically stable strains constructed in this work could ferment sugars to produce D-mannitol without the addition of antibiotics, inducers and formate, which was favorable for industrial production.

**Keywords:** D-mannitol, metabolic evolution, mannitol dehydrogenase, *Escherichia coli*

D-甘露醇作为一种重要的多元醇,广泛应用于食品、制药、化学品工业等领域<sup>[1]</sup>。目前,工业中 D-甘露醇的合成主要是通过以镍作为催化剂在高温高压条件下催化葡萄糖-果糖混合物和氢气来合成<sup>[2-3]</sup>。催化获得的化合物中 D-甘露醇只占总量的 25%,其余 75%是副产物 D-山梨醇。较低的选择性和催化效率使得这种化学合成 D-甘露醇的方法需要高昂成本来进行下游的分离纯化。随着合成生物学的发展,通过构建微生物细胞工厂生产生物基化学品因其具有绿色清洁的生产工艺和更高的生产特异性而得到越来越多的关注。

自然界中的多种生物,如细菌、真菌、藻类和多种植物,均能合成 D-甘露醇。D-甘露醇生产性能最佳的是异型发酵乳酸菌(Hetero-fermentative lactic acid bacteria),其能够直

接以 D-果糖和葡萄糖的混合物发酵生产 D-甘露醇,并且没有副产物 D-山梨醇的生成<sup>[3-11]</sup>。负责催化 D-果糖生成 D-甘露醇的关键蛋白为甘露醇脱氢酶(Mannitol dehydrogenase, MDH)。然而,乳酸菌的发酵需要复杂的培养基,并且培养条件相对复杂,利用乳酸菌生产 D-甘露醇的成本较高。另一方面,大肠杆菌作为研究最透彻的模式生物,由于其遗传和生理性能非常清楚,并有一套成熟的遗传操作方法,被认为是用来合成生物基化学品的很好的底盘细胞。Kaup 等构建了一株大肠杆菌菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pZY507 *glf* pET24 *fdh mdh*,该菌株通过生物转化能够以 500 mmol/L 的 D-果糖为底物生成 362 mmol/L 的 D-甘露醇。该系统中甘露醇脱氢酶基因的表达是通过构建到高拷贝质粒 pET24 中实现的<sup>[12]</sup>。细胞中同时存在表达

甲酸脱氢酶基因的质粒。甲酸脱氢酶能够将甲酸转化为二氧化碳，同时生成还原力 NADH 用于甘露醇脱氢酶的催化反应。这种多个高拷贝质粒同时存在会增加细胞的代谢负荷，同时需要添加多种抗生素来维持质粒生存。另外，发酵过程中还需要添加甲酸来提供还原力。

在本研究中，我们采用代谢工程技术构建了用于 D-甘露醇生产的大肠杆菌工程菌，其遗传稳定，D-甘露醇合成途径中的甘露醇脱氢酶和果糖转运蛋白的编码基因均整合在大肠杆菌的染色体中，不需要高拷贝质粒的参与，避免了质粒对细胞的代谢负荷；其能使用无机盐培养基和葡萄糖果糖作为混合碳源，避免了甲酸的依赖；其发酵过程中无需添加抗生素、诱导剂和丰富培养基，节省了 D-甘露醇发酵生产的成本。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素，购自上海生工生物工程有限公司；质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司；DNA 回收试剂盒购自美国 Biomiga 公司；PrimeSTAR HS DNA 聚合酶，DNA marker trans2K，购自大连宝生物工程有限公司；限制性内切酶 *Kpn* I、*Xba* I、*Dpn* I、T4

DNA 连接酶、快连酶、T4 多聚核苷酸激酶购自 NEB 公司；D-甘露醇，D-果糖和葡萄糖标品购自美国 Sigma 公司；其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计，Shimadzu UV-2550 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan); PCR 扩增仪，Eppendorf Mastercycler gradient; 全自动凝胶成像系统，AlphaImager HP; 电转仪 MicroPulser; 台式高速离心机，Eppendorf 5415D; 高速冷冻离心机，Thermo Sorvall Evolution RC; 高效液相色谱，Agilent Technologies Series 1200。

#### 1.1.3 菌株

*Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 菌株的基因组 DNA 用作克隆 *mdh-fupL* 基因簇的模板。*Escherichia coli* ATCC 8739 是构建 D-甘露醇工程菌的出发菌株。本研究所用的大肠杆菌菌株见表 1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基

每升 LB 培养基包括 10 g 胰蛋白酶蛋白胨，5 g 酵母提取物和 5 g 氯化钠；氨苄青霉素、氯霉素和硫酸卡那霉素终浓度分别为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

D-甘露醇发酵用培养基为添加了 1% (W/V) 葡萄糖和 2% (W/V) D-果糖的 AM1 无机盐培养基<sup>[4]</sup>。

表 1 本研究所用的大肠杆菌菌株

Table 1 *Escherichia coli* strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Source or reference
ATCC 8739	Wild type	[13]
Mtl-001	ATCC 8739, $\Delta ldhA$ , $\Delta pflB$ , $\Delta frdBC$ , $\Delta adhE$ , $\Delta mgsA$ , $\Delta poxB$	This study
Mtl-002	Mtl-001, $ldhA::MltP-mdh-fupL$	This study
Mtl-003	Mtl-002, $\Delta ptsI$ , $Ppck^*-galP$	This study
Mtl-004	metabolic evolution of Mtl-003 for 80 generations	This study

### 1.2.2 质粒构建

构建用于表达外源甘露醇脱氢酶基因的质粒 pXZ401。以 *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 基因组 DNA 为模板, 通过引物 Lpmdh-F-*Kpn* I / Lpmdh-R-*Xba* I (表 2) PCR 扩增获得 *mdh* 基因。将纯化后的 *mdh* 基因及 pTrc99A-M 质粒<sup>[15]</sup>经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切, 在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 °C 连接, 得到质粒 pXZ401 (表 3)。*mdh* 基因的表达受 *trc* 启动子的控制, 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) 可以诱导该基因的转录。

用于基因敲除的质粒的构建方法如下<sup>[16]</sup>: 以富马酸还原酶基因(Fumarate reductase, *frd*)基因的敲除为例, 首先以野生型大肠杆菌 ATCC 8739 基因组 DNA 为模板, 使用引物 XZ-*frdB*-up/XZ-*frdC*-down 进行扩增。获得的 PCR 片段纯化后克隆至 pEASY-Blunt 载体中, 获得质粒 pXZ005。然后, 以质粒 pXZ005 为模板, 使用引物 XZ-*frdC*-1/XZ-*frdB*-2 进行反向扩增。同时以质粒 pXZ-CS 为模板, 用 *cat-sacB*-up/*cat-sacB*-down 引物 PCR 扩增含有氯霉素抗性基因 (Chloramphenicol resistance gene, *cat*) 和果聚糖蔗糖酶基因 (Levansucrase gene, *sacB*) 的 *cat-sacB* 基因簇片段<sup>[17]</sup>。将该片段与反向扩增获得的 PCR 片段连接得到质粒 pXZ006C。同时, 反向扩增获得的片段纯化, 磷酸化处理并进行自连获得质粒 pXZ007。质粒 pXZ006C 和 pXZ007 作为模板制备用于两步法同源重组敲除 *frdBC* 基因的片段。用于敲除其他基因的质粒通过类似的方法构建, 包括丙酮酸甲酸裂解酶基因 (Pyruvate formate-lyase, *pflB*), 乙醇脱氢酶基因 (Aldehyde-alcohol dehydrogenase, *adhE*), 甲基乙二醛合酶基因 (Methylglyoxal synthase, *mgxA*), 以及丙酮酸氧化酶基因(Pyruvate oxidase, *poxB*)。依赖于磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸

转移酶 (Phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system, PTS) 系统的失活是通过敲除 *ptsI* 基因完成的 (图 1A)。所使用的引物见表 2, 所构建的质粒见表 3。

用于通过两步同源重组的方法将 *mdh-fupL* 基因簇整合到大肠杆菌 ATCC 8739 染色体中乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, *ldhA*) 位点的质粒构建如下: 以 *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 基因组 DNA 为模板, 使用引物 XZ-*mdh-Nhe* I / *fupL*-R-*Kpn* I 进行 PCR 扩增获得的片段纯化后进行磷酸化处理, 并与使用引物 XZ-*ldhA*-2-*Nhe* I / XZ-*ldhA*-1, 以 pXZ001 为模板反向扩增获得的片段进行连接, 获得质粒 pXZ460。然后, 将人工合成的启动子元件 MltP (序列为: GCTAGCCAG AAAATTATTTTAAATTCCTCTTGACAATTAAT CATCCGGCTCGTATAATGTGTGGACCTCGAGT TATCTCGAGTGAGATATTGTTGACGG) 通过 *Nhe* I 酶切位点克隆到 pXZ460 质粒中, 得到质粒 pXZ054 (图 2)。所使用的引物见表 2, 所构建的质粒见表 3。

### 1.2.3 遗传修饰

大肠杆菌 ATCC 8739 中基因敲除、基因整合和基因调控是通过两步同源重组的方法完成的<sup>[17-19]</sup>。大肠杆菌的半乳糖透性酶 (Galactose permease, *galP*) 基因的原始启动子被替换为 *Ppck*\*启动子<sup>[17]</sup>。获得的重组菌株中无抗生素基因和 FRT 序列残留<sup>[20]</sup>。第一步同源重组中, 染色体上的目标基因被 *cat-sacB* 基因簇替代。第二步同源重组中, *cat-sacB* 基因簇被用于基因敲除、基因整合或基因调控的片段取代。克隆的筛选是通过在含有蔗糖的无盐 LB 培养基中培养完成的。在蔗糖存在的情况下, 表达 *sacB* 基因的菌株因为在培养过程中积累果聚糖对细胞产生毒性而被杀死。*cat-sacB* 基因簇被替换掉的细胞通过富集而被筛选出来<sup>[16-18]</sup>。

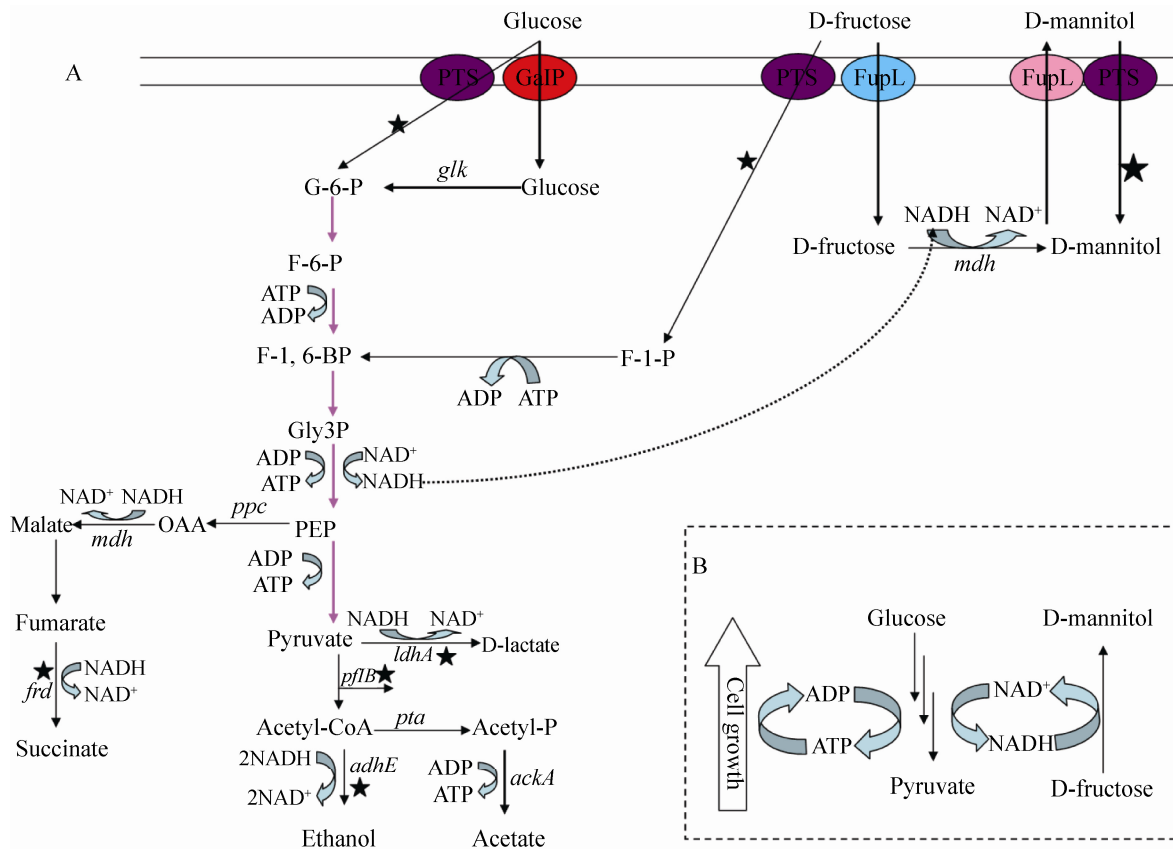


图 1 大肠杆菌细胞中 D-甘露醇的合成途径

Fig. 1 D-mannitol synthetic pathway in engineered *E. coli*. (A) Native and recombinant fermentation pathways. Mannitol dehydrogenase (*mdh*) and fructose permease (*fupL*) genes were from *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291. Solid stars represent deletions of native *E. coli* genes. (B) Coupling of cell growth and D-mannitol production. Glucose was metabolized to pyruvate through glycolysis, which produced ATP to support cell growth. NADH was oxidized to NAD<sup>+</sup> by mannitol dehydrogenase, allowing glycolysis and ATP production to continue.

#### 1.2.4 酶活测定方法

用于制备粗酶液的细胞取自对数中期培养的细胞。对于用质粒 pXZ401 表达的 MDH 的酶活测定，细胞在 LB 培养基中好氧培养至  $OD_{550}$  为 0.6 左右时，加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导。30 °C 培养 4 h 后，收集细胞，并破碎备用。

对于整合到细菌染色体 DNA 中的 MDH 的活性测定，细胞在添加了 1% (W/V) 葡萄糖和 2% (W/V) D-果糖的 AM1 培养基中培养至对数中期后收集细胞，并破碎备用。

MDH 活性测定的溶液包括 (1 mL)：100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0，200 μmol/L NADH 和 200 mmol/L D-果糖。加入粗酶液起始反应。MDH 的活性通过测定 NADH 在 340 nm 吸光值的改变完成<sup>[6]</sup>。酶的活力单位为 1 分钟消耗 1 μmol NADH 所用的酶量。

#### 1.2.5 D-甘露醇的发酵生产

D-甘露醇的发酵用培养基为添加了 1% (W/V) 葡萄糖和 2% (W/V) D-果糖的 AM1 无机盐培养基<sup>[14]</sup>，pH 7.0。首先从平板上挑取 3~4 个单克隆接种到

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')
<b>Plasmid for <i>mdh</i> gene cloning</b>	
Lpmdh-F- <i>Kpn</i> I	GCATGGTACCAAAAGGAGAACAAACATGGAAGCAC
Lpmdh-R- <i>Xba</i> I	GCATTCTAGATTATGCCTCTTCGCCACCAACC
<b><i>ldhA</i> gene deletion and integration of <i>mdh-fupL</i> gene at <i>ldhA</i> site</b>	
XZ- <i>ldhA</i> -up	GATAACGGAGATCGGGAATG
XZ- <i>ldhA</i> -down	CTTTGGCTGTCAAGTTCACCA
XZ- <i>ldhA</i> -1	TCTGGAAAAAGGCGAAACCT
XZ- <i>ldhA</i> -2	TTTGTGCTATAAACGGCGAGT
XZ- <i>mdh-Nhe</i> I	GCATGCTAGCCAAGGAGGAAAACAGCTATGGAAGCACTTGTG
<i>fupL</i> -R- <i>Kpn</i> I	CGATGGTACCTTAATTACCAACATCTATTGCCTG
XZ- <i>ldhA</i> -2- <i>Nhe</i> I	GCATGCTAGC TTTGTGCTATAAACGGCGAGT
<b><i>frd</i> gene deletion</b>	
XZ- <i>frdB</i> -up	TGCAGAAAACCATCGACAAG
XZ- <i>frdC</i> -down	CACCAATCAGCGTGACAAC
XZ- <i>frdC</i> -1	GCCACCATCGTAATCCTGTT
XZ- <i>frdB</i> -2	ATAGCGCACCACTCAATTT
<b><i>adhE</i> gene deletion</b>	
XZ- <i>adhE</i> -up	CATGCTAATGTAGCCACCAAA
XZ- <i>adhE</i> -down	TTGCACCACCATCCAGATAA
XZ- <i>adhE</i> -1	TCCGGCTAAAGCTGAGAAAA
XZ- <i>adhE</i> -2	GTGCGTTAAGTTCAGCGACA
<b><i>mgsA</i> gene deletion</b>	
XZ- <i>mgsA</i> -up	CAGCTCATCAACCAGGTCAA
XZ- <i>mgsA</i> -down	AAAAGCCGTCACGTTATTGG
XZ- <i>mgsA</i> -1	AGCGTTATCTCGCGGACCGT
XZ- <i>mgsA</i> -2	AAGTGCGAGTCGTCAGTTCC
<b><i>poxB</i> deletion</b>	
XZ- <i>poxB</i> -up	AAGCAATAACGTTCCGGTTG
XZ- <i>poxB</i> -down	CCACTTTATCCAGCGGTAGC
XZ- <i>poxB</i> -1	GACGCGGTGATGAAGTGAT
XZ- <i>poxB</i> -2	TTTGCGGATATAAGCTGCAA

表 3 本研究所用的质粒

Table 3 Plasmids used in this work

Plasmids	Relevant characteristic	Sources
<b>Plasmid for <i>mdh</i> gene cloning</b>		
pTrc99A	<i>bla</i> ; expression vector with <i>trc</i> promoter	Lab collection
PTrc99A-M	<i>bla</i> ; expression vector with <i>trc</i> promoter	[15]
pXZ401	<i>mdh</i> from <i>L. pseudomesenteroides</i> ATCC 12291 cloned into pTrc99A-M (Lpmdh-F- <i>Kpn</i> I/Lpmdh-R- <i>Xba</i> I)	This study
<b>Plasmid for <i>red</i> recombination</b>		
pKD46	<i>bla</i> ; <i>exo</i> ; temperature-conditional replicon	[21]
<b>Plasmid for <i>cat-sacB</i> cassette cloning</b>		
pXZ-CS	<i>cat</i> gene from pACYC-184M and <i>sacB</i> gene from <i>Bacillus subtilis</i> cloned into pEASY-Blunt vector	[17]
<b>Integration of <i>mdh-fupL</i> gene at <i>ldhA</i> site</b>		
pXZ001	<i>bla kan</i> ; <i>ldhA</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	[17]
pXZ002C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>ldhA</i> (XZ- <i>ldhA</i> -1/XZ- <i>ldhA</i> -2) of pXZ001	[17]
pXZ003	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ001 (XZ- <i>ldhA</i> -1/XZ- <i>ldhA</i> -2), kinase treated, then self-ligated	[17]
pXZ460	<i>mdh-fupL</i> of <i>L. pseudomesenteroides</i> ATCC 12291 (XZ- <i>mdh-Nhe</i> I/ <i>fupL</i> -R- <i>Kpn</i> I) cloned into pXZ001 (XZ- <i>ldhA</i> -2- <i>Nhe</i> I/XZ- <i>ldhA</i> -1)	This study
pXZ054	MltP cloned into pXZ460 in front of <i>mdh</i>	This study
<b><i>pflB</i> gene deletion</b>		
pXZ015	<i>bla kan</i> ; <i>pflB</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	[17]
pXZ016C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>pflB</i> of pXZ015 (XZ- <i>pflB</i> -1/XZ- <i>pflB</i> -2)	[17]
pXZ017	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ015 (XZ- <i>pflB</i> -1/XZ- <i>pflB</i> -2), kinase treated, then self-ligated	[17]
<b><i>frd</i> gene deletion</b>		
pXZ005	<i>bla kan</i> ; <i>frdBC</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	This study
pXZ006C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>frdBC</i> of pXZ005 (XZ- <i>frdC</i> -1/XZ- <i>frdB</i> -2)	This study
pXZ007	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ005(XZ- <i>frdC</i> -1/XZ- <i>frdB</i> -2), kinase treated, then self-ligated	This study
<b><i>mgsA</i> gene deletion</b>		
pXZ071	<i>bla kan</i> ; <i>mgsA</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	This study
pXZ072C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>mgsA</i> of pXZ071 (XZ- <i>mgsA</i> -1/XZ- <i>mgsA</i> -2)	This study
pXZ073	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ071 (XZ- <i>mgsA</i> -1/XZ- <i>mgsA</i> -2), kinase treated, then self-ligated	This study
<b><i>adhE</i> gene deletion</b>		
pXZ020	<i>bla kan</i> ; <i>adhE</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	This study
pXZ021C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>adhE</i> of pXZ020 (XZ- <i>adhE</i> -1/XZ- <i>adhE</i> -2)	This study

续表 3

Plasmids	Relevant characteristic	Sources
pXZ022	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ020 (XZ-adhE-1/XZ-adhE-2), kinase treated, then self-ligated	This study
<b><i>poxB</i> deletion</b>		
pXZ074	<i>bla kan</i> ; <i>poxB</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	This study
pXZ075C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>poxB</i> of pXZ074 (XZ- <i>poxB</i> -1/XZ- <i>poxB</i> -2)	This study
pXZ076	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ074 (XZ- <i>poxB</i> -1/XZ- <i>poxB</i> -2), kinase treated, then self-ligated	This study
<b><i>ptsI</i> deletion</b>		
pXZ008	<i>bla kan</i> ; <i>ptsI</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	[17]
pXZ009C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>ptsI</i> of pXZ008 (XZ- <i>ptsI</i> -1/XZ- <i>ptsI</i> -2)	[17]
pXZ010	PCR fragment amplified inside-out product from pXZ008 (XZ- <i>ptsI</i> -1/XZ- <i>ptsI</i> -2), kinase treated, then self-ligated	[17]
<b><i>galP</i> promoter replacement</b>		
pXZ011	<i>bla kan</i> ; <i>galP</i> from <i>E. coli</i> ATCC8739 cloned into pEASY-Blunt vector	[17]
pXZ012C	<i>cat-sacB</i> cassette ( <i>cat-sacB</i> -up/ <i>cat-sacB</i> -down fragment of pXZ-CS) cloned into <i>galP</i> of pXZ011 (XZ- <i>galP</i> -P-1/XZ- <i>galP</i> -P-2)	[17]
pXZ013	<i>Ppck*</i> (XZ- <i>pck</i> -P-1/XZ- <i>pck</i> -P-2) cloned into <i>galP</i> (XZ- <i>galP</i> -P-1/XZ- <i>galP</i> -P-2) of pXZ011	[17]

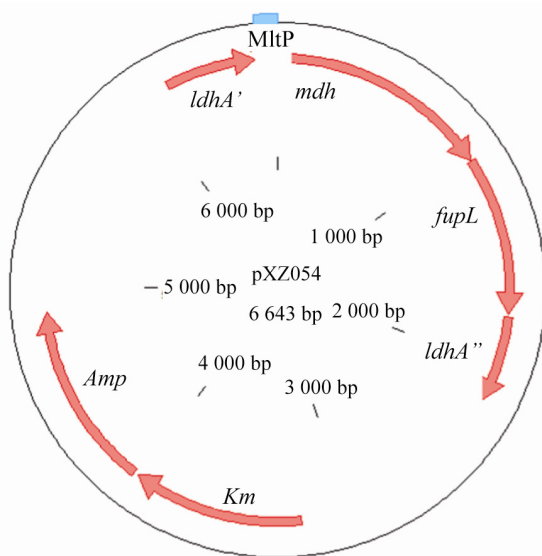


图 2 pXZ054 的质粒图谱

Fig. 2 Plasmid used for integration of *mdh-fupL* gene operon into *E. coli* chromosome at *ldhA* site. Sequences encoding the N-terminal and C-terminal regions of *ldhA* gene were designated *ldhA'* and *ldhA''*, respectively. MltP represented the synthetic promoter.

4 mL 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养过夜, 然后将该培养物转接到含有 100 mL 新鲜培养基的 250 mL 三角瓶中在相同条件下继续培养至  $OD_{550}$  为 2.0 左右。获得的培养物收集菌体, 5 000 r/min 离心 5 min, 转接到含有 250 mL 新鲜培养基的 500 mL 发酵罐中使初始  $OD_{550}$  为 0.05, 37 °C、150 r/min 厌氧发酵。整个发酵过程通过自动添加 2 mol 的氢氧化钾维持在 pH 7.0。

### 1.2.6 代谢进化技术

基于细胞生长与 D-甘露醇的合成相偶联 (图 1B), 通过代谢进化技术提高细胞合成 D-甘露醇的能力。在含有 250 mL 添加了 1%(W/V) 葡萄糖和 2%(W/V) D-果糖的 AM1 无机盐培养基的发酵罐中, 对菌株 Mtl-003 进行连续的传代。每次传代的初始  $OD_{550}$  为 0.05, 待细胞  $OD$  生长至 0.4~0.8, 取适量体积的菌液转接至新的发酵罐中。连续转接 24 次后, 取发酵液稀释涂平板, 挑取单克隆进



行 PCR 验证。验证正确的克隆命名为 Mtl-004。

### 1.2.7 分析方法

细胞生长通过测定  $OD_{550}$  的吸光值完成。有机酸和葡萄糖的浓度使用 HPLC 的方法进行测定<sup>[16]</sup>。D-果糖和 D-甘露醇的浓度也通过 HPLC 完成, 所用分析柱为 Aminex HPX-87C Carbohydrate column。蛋白质的浓度使用 Bradford 法<sup>[22]</sup>进行测定, 对照为牛血清白蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘露醇脱氢酶的克隆与表达

甘露醇脱氢酶能够催化 D-果糖直接生成 D-甘露醇, 同时伴随 NADH 氧化为  $NAD^+$  (图 1A)<sup>[6,12]</sup>。目前已经从多株乳酸菌中分离得到 MDH 的编码基因。本研究选择了来自 *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 菌株的甘露醇脱氢酶, 通过 PCR 扩增、酶切、连接, 将其克隆到质粒 pTrc99A-M 中, 获得质粒 pXZ401。甘露醇脱氢酶基因的表达受 *trc* 启动子的控制。IPTG 诱导后的细胞粗酶液中甘露醇脱氢酶的活性为 0.63 U/mg 蛋白。之前报道的使用 pET24a(+)质粒在 BL21 (DE3)菌株中表达同一甘露醇脱氢酶基因的活性为 70 U/mg 蛋白<sup>[6]</sup>。这种酶活性的差异可能与使用的质粒类型有很大关系。pET24a(+)质粒拷贝数高, 所使用的 T7 启动子表达强度高, 因此酶活更高。

### 2.2 D-甘露醇生产菌株的构建与发酵生产

大肠杆菌厌氧发酵会产生很多有机酸, 包括乳酸、甲酸、乙酸、丁二酸等。这些杂酸的生成会与甘露醇脱氢酶竞争 NADH (图 1A)。为了避免杂酸的合成, 并使甘露醇合成成为胞内唯一能氧化 NADH 的途径, 我们从大肠杆菌 ATCC 8739 出发, 首先对丙酮酸甲酸裂解酶基因 (Pyruvate formate-lyase, *pflB*)、富马酸还原酶基因 (Fumarate reductase, *frd*)、乙醇脱氢酶基因 (Aldehyde-alcohol

dehydrogenase, *adhE*)、甲基乙二醛合酶基因 (Methylglyoxal synthase, *mgsA*) 以及丙酮酸氧化酶基因 (Pyruvate oxidase, *poxB*) 进行敲除, 得到菌株 Mtl-001。

在 *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 菌株中, *mdh* 基因和 *fupL* 基因位于同一个操纵子中。刚分离到 FupL 时, 它被认为是 D-甘露醇透性酶, 但后来的实验发现该蛋白是一个 D-果糖转运蛋白<sup>[23]</sup>。为了在菌株 Mtl-001 中构建 D-甘露醇合成途径, 通过两步同源重组的方法, 将 *mdh-fupL* 基因簇和人工启动子 MltP 整合到 Mtl-001 菌株染色体的 *ldhA* 位点, 获得菌株 Mtl-002。厌氧发酵条件下, Mtl-002 菌株糖酵解过程中生成的 NADH 将会被甘露醇脱氢酶利用, 将 D-果糖转化为 D-甘露醇 (图 1A)。

使用无机盐培养基, 葡萄糖和果糖作为碳源, 对 Mtl-002 菌株进行发酵。其中, 葡萄糖用于维持细胞生长并提供 NADH, 果糖被用于转化生产 D-甘露醇。厌氧发酵 6 d 后, Mtl-002 菌株能够合成 1.2 mmol/L 的 D-甘露醇。细胞生长的最大  $OD_{550}$  为 0.73。

### 2.3 Mtl-002 菌株中 PTS 系统的失活

在野生型大肠杆菌细胞中, 糖类一般通过 PTS 系统转运进细胞并被磷酸化<sup>[24-25]</sup>。然而, 只有非磷酸化形式的 D-果糖才能作为甘露醇脱氢酶的底物合成 D-甘露醇。目前已经有多种能够通过非 PTS 系统转运糖类的途径被报道<sup>[24,26]</sup>。为了避免 D-果糖被磷酸化, Mtl-002 菌株中的 *ptsI* 基因被敲除, 从而使 PTS 系统失活。另一方面, 为了使细胞能继续代谢葡萄糖, *galP* 基因的原始启动子被替换为强启动子 *Ppck\**<sup>[17,24,27]</sup>来提高其表达, 使其能够有效地转运葡萄糖。获得的菌株 Mtl-003 能通过 FupL 转运 D-果糖。然而, 厌氧发酵 6 d 后, Mtl-003 的 D-甘露醇产量与 Mtl-002 菌株基本相同。PTS 系

统的失活并未能提高 D-甘露醇的生产能力。

## 2.4 Mtl-003 菌株的代谢驯化

为了改善 Mtl-003 生产 D-甘露醇的能力, 我们采用了代谢进化技术对该菌株进行优化。在 Mtl-003 菌株中, 细胞的生长与 D-甘露醇的生产相偶联 (图 1B)。这种偶联为通过代谢进化技术提升菌株的生长能力和 D-甘露醇合成能力奠定了基础。在连续传代的过程中, 其中一些细胞因为自发突变生长变快而被富集。由于细胞的生长和 D-甘露醇的合成相偶联, 细胞生长变快的菌株其 D-甘露醇生产能力也得以提高。

随着传代的进行, 细胞生长能力不断提高 (图 3)。经过 80 代的传代, 获得重组菌 Mtl-004。该菌

厌氧发酵 6 d 能生产 4.4 mmol/L D-甘露醇。细胞生长的最大  $OD_{550}$  能够达到 1.95。相对于 Mtl-003 中 D-甘露醇的产量和细胞量都得到了明显提高。

## 2.5 甘露醇脱氢酶的活性分析

甘露醇脱氢酶的活性可能和细胞生产 D-甘露醇的能力密切相关。为了解析经过代谢进化后, D-甘露醇生产能力提高的机制, 我们对进化前后菌株的甘露醇脱氢酶进行了活性测定。Mtl-003 菌株中甘露醇脱氢酶的活性为 0.1 U/mg 蛋白, 而 Mtl-004 菌株中甘露醇脱氢酶的活性为 0.38 U/mg 蛋白。推测在代谢进化过程中, 甘露醇脱氢酶活性的提高很可能是细胞生长和 D-甘露醇生产能力提高的主要原因。

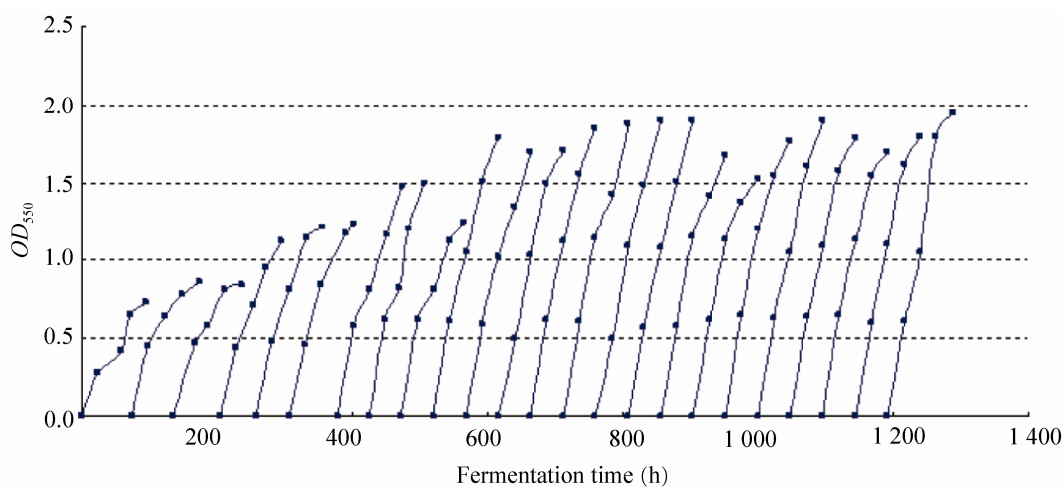


图 3 使用代谢进化技术提高 Mtl-003 菌株的细胞生长

Fig. 3 Metabolic evolution for improving cell growth of strain Mtl-003. Serial transfers were carried out at 3-days intervals in AM1 mineral salts medium with 1% glucose and 2% D-fructose with an initial  $OD_{550}$  of 0.05.

## 3 讨论

以前文献报道的利用重组大肠杆菌生产 D-甘露醇主要是通过生物转化完成的。在这些菌株中, 甘露醇脱氢酶一般是通过高拷贝质粒表达。甘露醇脱氢酶需要的还原力 NADH 通过表达甲酸脱氢

酶使其催化甲酸脱氢来提供<sup>[12,23]</sup>。这种生物转化体系通常需要多个质粒同时表达来获得较高的 D-甘露醇产量<sup>[12]</sup>。在生产过程中需要添加抗生素来防止质粒的丢失, 需要添加诱导剂来诱导外源基因的表达, 需要添加甲酸来提供 NADH, 需要使用丰富培养基来提高细胞量, 这都将增加工业化

生产的成本。本研究将 D-甘露醇合成相关的甘露醇脱氢酶和果糖转运蛋白的编码基因整合在大肠杆菌染色体上, 并且其表达由组成型的人工合成启动子控制, 在发酵过程中无需额外添加抗生素或诱导剂。另外, 本研究构建的工程菌利用葡萄糖代谢提供 NADH, 而不需要额外添加甲酸。这种遗传稳定的工程菌在工业化规模生产时有一定优势。

甘露醇脱氢酶可能是 D-甘露醇合成途径的限速步骤。在 Mtl-003 菌株中, 尽管所有的厌氧发酵竞争途径都被失活, 但由于其甘露醇脱氢酶的活性只有 0.1 U/mg 蛋白, 其 D-甘露醇的产量依旧较低。通过进化代谢技术, 获得的 Mtl-004 菌株能够生产 4.4 mmol/L 的 D-甘露醇, 相对于出发菌株 Mtl-003 提高了 2.6 倍。同时, 高产菌株的甘露醇脱氢酶相比出发菌株提高了 2.8 倍。这表明提高甘露醇脱氢酶的活性能显著提高 D-甘露醇的生产能力。

代谢进化技术已经被成功用于提高细胞工厂生产乙醇<sup>[28]</sup>、乳酸<sup>[29-30]</sup>、L-丙氨酸<sup>[19]</sup>和丁二酸<sup>[13,25]</sup>的能力。这种技术是使目标产品的合成在厌氧条件下成为唯一的能氧化 NADH 的途径, 并且消耗的 NADH 和糖酵解过程合成的 NADH 保持平衡, 从而使细胞生长和目标产品的合成相偶联。在此基础上, 通过选择生长越来越快的细胞, 获得目标产品合成能力不断提高的细胞。本文结果表明基于细胞生长和 D-甘露醇合成的偶联, 利用代谢进化技术提高菌株合成 D-甘露醇的能力是一种行之有效的方法。经过测序发现, Mtl-004 菌株与 Mtl-003 菌株相比较, MDH 基因的启动子区域未发生突变, 但在 MDH 的编码基因内部发生突变 D301Y(g901t)。MDH 酶活的提高可能来源于 MDH 中 D301Y 的点突变, 也可能是代谢驯化过程中 MDH 蛋白量的改变造成的。在下一步的工作中,

将继续对 Mtl-004 菌株进行驯化, 并结合高通量组学分析技术对高产菌株的遗传机制进行解析, 从而更好地用于构建高效生产 D-甘露醇的工程菌。

## REFERENCES

- [1] Yue M, Cao H, Zhang J, et al. Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, Apr 27. [Epub ahead of print]
- [2] Savergave LS, Gadre RV, Vaidya BK, et al. Two-stage fermentation process for enhanced mannitol production using *Candida magnoliae* mutant R9. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2013, 36(2): 193–203.
- [3] Sasaki Y, Laivenieks M, Zeikus JG. *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 *mdh* gene cloning and recombinant mannitol dehydrogenase characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(1): 36–41.
- [4] Aarnikunnas J, Ronnholm K, Palva A. The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(6): 665–671.
- [5] Grobber GJ, Peters SW, Wisselink HW, et al. Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(6): 2867–2870.
- [6] Hahn G, Kaup B, Bringer-Meyer S, et al. A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol*, 2003, 179(2): 101–107.
- [7] Helanto M, Aarnikunnas J, von Weymarn N, et al. Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *J Biotechnol*, 2005, 116(3): 283–294.
- [8] Saha BC. A low-cost medium for mannitol

- production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(4): 676–680.
- [9] Saha BC. Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus intermedius*. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(2): 537–542.
- [10] H.W. Wisselink RAW, G. Eggink, J. Hugenholtz, G.J. Grobben. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Intern Dairy J*, 2002, 12: 151–161.
- [11] Niklas von Weymarn MH, Matti Leisola. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem*, 2002, 37: p. 1207–1213.
- [12] Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(3): 333–339.
- [13] Zhang X, Jantama K, Shanmugam KT, et al. Reengineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(24): 7807–7813.
- [14] Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, et al. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(3): 397–404.
- [15] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving *beta*-carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17C: 42–50.
- [16] Shi A, Zhu X, Lu J, et al. Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production. *Metab Eng*, 2013, 16: 1–10.
- [17] Tan Z, Zhu X, Chen J, et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improving succinate production. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(16): 4838–4844
- [18] Jantama K, Zhang X, Moore JC, et al. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(5): 881–893.
- [19] Zhang X, Jantama K, Moore JC, et al. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 355–366.
- [20] Jarboe LR, Zhang X, Wang X, et al. Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. *J Biomed Biotechnol*, 2010:761042.
- [21] 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.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [23] Heuser F, Marin K, Kaup B, et al. Improving d-mannitol productivity of *Escherichia coli*: impact of NAD, CO<sub>2</sub> and expression of a putative sugar permease from *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Metab Eng*, 2009, 11(3): 178–183.
- [24] Tang J, Zhu X, Lu J, et al. Recruiting alternative glucose utilization pathways for improving succinate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(6): 2513–2520.
- [25] Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(5): 1140–1153.
- [26] Hernandez-Montalvo V, Martinez A, Hernandez-Chavez G, et al. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(6): 687–694.
- [27] Zhang X, Jantama K, Moore JC, et al. Metabolic evolution of energy-conserving pathways for

- succinate production in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(48): 20180–20185.
- [28] Yomano LP, York SW, Zhou S, et al. Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. Biotechnol Lett, 2008, 30(12): 2097–2103.
- [29] Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, et al. Fermentation of 12% (W/V) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. Biotechnol Lett, 2006, 28(9): 663–670.
- [30] 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.

(本文责编 陈宏宇)



### 过程工程所在利用生物油发酵生产丁二酸方面取得进展

生物质经过热化学裂解作用产生生物油 (bio-oil) , bio-oil 经过进一步的加工之后, 可以转化为车用燃料, 有望代替传统的汽油等。与汽油相比, 生物油的氧含量高 (40%~50%, W/W), H/C 比例低, 并且含水量比较大 (15%~30%, W/W)。这些因素造成了生物油的低热值。近来的研究发现, 通过简单的分级可以将生物油分割为水相生物油和有机相生物油两部分。分级之后的有机相部分加工比较方便, 水相部分则因为含水量高很难进一步加工。

过程工程所邢建民研究员团队提出了将这部分生物油作为菌体生长和丁二酸发酵的碳氮源研究思路。首先, 在传统的丁二酸发酵培养基中添加 0%、12.5%、25%、50%、100% 的 bio-oil, 考察产丁二酸大肠杆菌的菌体生长情况。结果显示, 在添加 12.5% bio-oil 时菌体生长得最好, 继续增加 bio-oil 的浓度, 菌体生长会受到抑制。葡萄糖消耗和丁二酸的产生也和菌体生长相对应, 即菌体生长最好时, 糖耗和产生的丁二酸都最多。该结果表明, bio-oil 可以为微生物生长及丁二酸发酵提供营养。进一步确定了生物油中哪些成分可以被利用, 该团队采用改进的 M9 培养基, 分别在仅有碳源 (葡萄糖) 和氮源 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 的情况下, 添加 5% 和 20% 的 bio-oil, 结果显示, 在以葡萄糖作为碳源, bio-oil 充当氮源的情况下, 菌体生长和产生的丁二酸都随着 bio-oil 浓度增加而稍有增加。而在以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  充当氮源, 不同浓度 bio-oil 充当碳源的情况下, 菌体的生长和产生的丁二酸都明显增加。最后, 将生物质酶解糖液与 bio-oil 混合, 在这种仅添加无机盐的生物质源培养基中进行了丁二酸发酵, 当 bio-oil 添加量为 12.5% 时, 丁二酸产量达到 11.5 g/L。同时, 利用 GC-MS 对发酵前后生物油的组分进行了分析, 发现 bio-oil 中的多种成分可以被微生物利用。相关成果发表在该领域国际著名期刊 *Biotechnology for Biofuels* 上。

(来源: 中国科学院过程工程研究所; 日期: 2013-08-14)