



丁心成,孙瑞杰,贾士儒,等. 异源表达透明颤菌血红蛋白结合调控策略提高全细胞催化合成苯乳酸产量的研究[J]. 轻工学报,2026,41(1):69-80.

DING X C,SUN R J,JIA S R,et al. Study on improving the yield of whole-cell catalytic production of phenyllactic acid by heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin combined with regulation strategy[J]. Journal of Light Industry,2026,41(1):69-80. DOI:10.12187/2026.01.007

异源表达透明颤菌血红蛋白结合调控策略提高全细胞催化合成苯乳酸产量的研究

丁心成,孙瑞杰,贾士儒,侯颖

天津科技大学 生物工程学院,天津 300457

摘要:【目的】提高全细胞催化反应体系中菌株对 O_2 的利用率,高效催化苯丙氨酸(Phenylalanine,PHE)合成苯乳酸(Phenyllactic Acid,PLA)。【方法】基于异源表达透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* Hemoglobin,VHb)对宿主大肠杆菌生长情况的影响,采用基因工程技术构建包括 VHb、氨基酸脱氨酶(L-amino Acid Deaminase,L-AAD)和乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase,LDH)的多酶偶联表达体系,优化关键酶的表达调控策略,并通过连续传代实验评价重组菌株的遗传稳定性。【结果】异源表达 VHb 能提高菌株对 O_2 的利用率,明显促进宿主大肠杆菌的生长速度和最大生物量。在摇瓶培养中,菌株在扩大培养阶段进入对数生长期的时间缩短了 1.5 h,且在单独诱导表达 VHb 时最大生物量提高了 46%。经 VHb 表达调控策略优化,获得优势重组菌株大肠杆菌 BL21(pRSFDuet-aad-ldh-T7-rbs2-2vhhb);进一步优化全细胞催化反应体系,确定最优反应条件为 PBS 缓冲液浓度 0.010 mol/L、pH 值 7.0、温度 37 $^{\circ}C$ 、转速 250 r/min,在此条件下,优势重组菌株的 PLA 最大产量为 53.7 g/L;优势重组菌株稳定性良好,连续传代 10 次,每一代菌株 PLA 产量的变化率均小于 5%,具有成为工业化菌株的潜力。【结论】异源共表达 VHb 可促进大肠杆菌的生长,提高全细胞催化合成 PLA 的产量。

关键词:多酶偶联;全细胞催化;透明颤菌血红蛋白;苯乳酸;重组菌株

中图分类号:TS201;Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)01-0069-12

0 引言

苯乳酸(Phenyllactic Acid,PLA)是一种由乳酸菌等微生物代谢产生的具有较高应用价值的天然有机酸,其相对分子质量为 166.17^[1],化学式为 $C_9H_{10}O_3$ ^[2],结构相对稳定,亲水性优良,能够均匀

扩散在食品体系中^[3]。PLA 具有广谱抑菌特性^[4],对人与动物细胞均无毒副作用^[5],是一种新型安全的生物防腐剂,虽暂未纳入《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760—2024)^[6]杀菌剂范畴,但在食品、饲料、医药、化妆品等领域展现出良好的应用前景^[7]。目前,PLA 的合成方法主要为化

收稿日期:2025-03-31;修回日期:2025-06-26;出版日期:2026-02-15

基金项目:工业发酵微生物教育部重点实验室暨天津市工业微生物重点实验室资助课题项目(2020KF006);天津市研究生科研创新项目(2022SKYZ092)

作者简介:丁心成(1997—),女,湖北省武汉市人,天津科技大学硕士研究生,主要研究方向为生物合成。E-mail:xinchengding@yeah.net

通信作者:侯颖(1986—),女,河北省衡水市人,天津科技大学副教授,博士,主要研究方向为发酵工程。E-mail:houying@tust.edu.cn

学合成法和生物合成法,前者易造成环境污染^[8],后者因绿色安全逐渐成为研究热点。

透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* Hemoglobin, VHb)是由透明颤菌在好氧条件下诱导合成的一种可溶性血红素蛋白^[9],其结构、光谱、氧结合动力学、输送氧气等特性与真核生物的血红蛋白具有同源性和相似性^[10]。VHb与氧结合能力强,能降低透明颤菌的需氧量,是一种氧调节结合蛋白^[11]。将VHb导入宿主并实现异源表达后,能有效提高宿主对O₂的利用率,促进细胞生长^[12]。目前,编码VHb的透明颤菌血红蛋白基因(*Vitreoscilla* Hemoglobin Gene, *vgb*)已被克隆和测序^[13],并在多种异源宿主中被成功表达^[14]。VHb的异源表达可显著增加抗生素、酶、有机酸、多糖等多种目标产物的产量^[15-22]。由于给氧条件对菌株生长和产物合成都会产生影响,因此,VHb的表达水平常需根据不同微生物宿主进行调整^[23]。目前,对VHb表达的优化策略包括调整基因拷贝数、载体拷贝数和启动子强度^[24]。

多酶偶联生物催化中的关键问题是如何精准调控不同酶的表达水平,以避免多种酶之间表达水平的差异导致总反应失衡^[25]。目前,在构建多酶偶联全细胞催化剂时,可采用多种策略协调酶的表达,例如,优化启动子与核糖体的结合位点(Ribosome Binding Site, RBS)、调整基因拷贝数、改变基因排列顺序、进行稀有密码子的替换等^[26]。本研究团队^[27]前期已成功利用全细胞催化技术催化苯丙氨酸(Phenylalanine, PHE)合成了PLA,但该技术对O₂的高需求量严重限制了PLA的合成效率。也有研究^[28-29]表明,O₂供应不足是影响PLA生物合成的重要因素。

基于此,本研究拟考查异源表达VHb对宿主大肠杆菌生长情况的影响,并在研究团队前期已筛选出的共表达双基因氨基酸脱氨酶(L-amino Acid Deaminase, L-AAD)和乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)合成PLA菌株的基础上^[30],共表达多基因VHb、L-AAD和LDH,以提高菌株对O₂的利用率及催化合成PLA的产量;针对多酶偶联体系中VHb的表达(包括VHb的表达顺序、RBS翻译强度和拷

贝数)进行重点优化,通过PLA的产量筛选构建一种新型高效多酶偶联全细胞催化剂,并优化相应的全细胞催化反应体系,以进一步提高催化合成PLA的产量;此外,验证重组菌种的稳定性,以判断其是否具有成为工业化菌株的潜力,以期构建多酶偶联全细胞催化剂以催化合成PLA及其衍生物提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

L-PLA(纯度≥99%)、苯丙酮酸(PPA,纯度≥99%)、三氟乙酸(色谱级)、甲醇(色谱级),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;L-PHE(纯度≥99%)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素(Kana)、琼脂粉、*AurII* 快切酶、SanTaq PCR Mix 预混液、高保真 PCR Mix 预混液、即用型无缝克隆试剂盒,上海生工生物工程股份有限公司;PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒,北京宝日医生物技术有限公司;Plasmid Mini Kit 试剂盒、Cycle Pure Kit 试剂盒、Gel Extraction Kit 试剂盒、Bacterial RNA Kit 试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司;胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖,英国 Oxoid 公司;NaCl、甘油,天津市江天化工技术股份有限公司;K₂HPO₄、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、KCl,北京奥博星生物技术有限公司。如无特殊注明,其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

SPX-1000 型生化培养箱,上海精若科学仪器有限公司;L1T 型全温振荡微生物培养摇床,江苏晶创生物科技有限公司;HH-6 型电热数显恒温水浴锅,常州天瑞仪器有限公司;120 L 型立式压力蒸汽灭菌器,济南爱来宝医疗科技有限公司;Minispin Plus 微量高速离心机,德国 Eppendorf 公司;321 型电子分析天平,上海艾飞思精密仪器有限公司;Thermo VeritiPro 96 型基因扩增仪,NanoDrop One 型微量 UV-Vis 分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司;Sub-Cell GT 型水平核酸电泳槽、SYSTEM GelDoc XR 型凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;Agilent 1260 Infinity 型高效液相色谱(HPLC)仪,美国 Agilent 公司。

1.3 菌株、质粒和引物序列

实验所用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株与质粒见表 1,引物序列见表 2。

1.4 主要培养基

1)LB 培养基(1 L)。胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g,121 ℃ 高温灭菌 20 min。LB 固体

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

类别	名称	特征	来源
菌株	大肠杆菌 DH5α	克隆宿主	实验室保藏
	大肠杆菌 BL21(DE3)	表达宿主	实验室保藏
	大肠杆菌 BL21(pRSFDuet-1)	含空载质粒 pRSFDuet, KanR	实验室保藏
	大肠杆菌 BL21(pRSFDuet- <i>aad-ldh</i>)	质粒 pRSFDuet 携带 <i>aad</i> 和 <i>ldh</i> 基因, KanR	实验室保藏
	大肠杆菌 BL21(pRSFDuet- <i>vhb</i>)	质粒 pRSFDuet 携带 <i>vhb</i> 基因, KanR	实验室保藏
质粒	pRSFDuet- <i>aad-vhb-ldh</i>	<i>vhb</i> 与 <i>aad</i> 共用 T7 启动子	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-vhb</i>	<i>vhb</i> 与 <i>ldh</i> 共用 T7 启动子	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-T7-vhb</i>	<i>vhb</i> 具有单独 T7 启动子	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-T7-rbs1-vhb</i>	rbs1 调控	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-T7-rbs2-vhb</i>	rbs2 调控	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-T7-rbs3-vhb</i>	rbs3 调控	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-T7-rbs2-2vhb</i>	<i>vhb</i> 拷贝数为 2	本研究构建
	pRSFDuet- <i>aad-ldh-T7-rbs2-3vhb</i>	<i>vhb</i> 拷贝数为 3	本研究构建

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

引物	序列
D-A-R	CCGCAAGCTTTTACTTCTTAAAAACGATCCAAACTAAACGGCG
D-A-F	CCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGG
F-A-V	AGTAAAAGCTTGCGGCCTAGGATGCTGGATCAGCAGACCATC
R-A-V	TTAAGCATTATGCGGCCTAGGTTATTCAACGGCCTGGGCG
D-L-R	CCTAGGTTAATTAAGCTGCGCTAGTAGACGAGTCCATGTG
D-L-F	CTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT
F-L-V	AGCTTAATTAACCTAGGATGCTGGATCAGCAGACCATC
R-L-V	TCAGCGGTGGCAGCAGCCTAGGTTATTCAACGGCCTGGGCG
F-T7	AACCTAGGAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC
R-T7	CATTGTTTAGATGTGGGAATTGTTATCCGCTCACAATCCCCTATAGTGAGTCGTATT
F-V	CACATCTAAACAATGGAATTCATGCTGGATCAGCAGACCATC
R-V	TCAGTAACGTTAAGTGGATCCTTATTC AACGGCCTGGGC
D-R-R	GGAATTGTTATCCGCTCACAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTCCTAG
D-R-F	CCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA
F-r1-V	GCGGATAACAATTCTCTCAAAAACCAACTAGGACCTCAGTACCATGCTGGATCAGCAGACCATC
F-r2-V	GCGGATAACAATTCTCTCAATAAGAGAGCAATTACATGCTGGATCAGCAGACCATC
F-r3-V	GCGGATAACAATTCCAAGGAGATATACATATGCATGCTGGATCAGCAGACCATC
R-r-V	TGGCAGCAGCCTAGGTTATTCAACGGCCTGGGCGT
F-1V	GCTTAATTAACCTAGGAATACGACTCACTATAGGGGAA
R-1V	GATCCAGCATAGGGGTTCCGTTATTCAAC
F-2V	GCCGTTGAATAACGGAACCCCTATGCTGGATCAGCAGACCA
R-2V	GTGCCAGCAGCCTAGGTTATTCAACGGCCTGGGC
D-V-R	AGCGGTGGCAGCAGCCTAGGTTATTCAA
D-V-F	GAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCT
F-2v	CCTAGGCTGCTGCCACCGCTATGCTGGATCAGCAGACCATC
R-2v	CCAGCATAGCCGCTTATTTATTCAACGGCCTGGGCGTACAGATCGG
F-3v	CAGGCCGTTGAATAAATAAGCGGCTATGCTGGATCAGCAGACCATC
R-3v	GGGGTTATGCTAGTTATTGCTCCCTAGGTTATTCAACGGCCTGGGC
<i>vhb</i> -F	CACATCTAAACAATGGAATTCATGCTGGATCAGCAGACCATC
<i>vhb</i> -R	TCAGTAACGTTAAGTGGATCCTTATTC AACGGCCTGGGC

注:下划线为不同翻译强度的 RBS 序列。

培养基仅需在 LB 培养基中添加 15 g/L 的琼脂粉后,121 ℃ 高温灭菌 20 min。

2) TB 培养基(1 L)。A:胰蛋白胨 12 g、酵母提取物 24 g、甘油 5 g,定容至 900 mL; B: KH_2PO_4 2.31 g、 K_2HPO_4 12.54 g,定容至 100 mL; 均经 121 ℃ 高温灭菌 20 min。无菌条件下将 A 与 B 按体积比 9:1 混合后使用。

3) PBS 缓冲液(1 L)。 NaCl 8 g、 KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 1.44 g、 KH_2PO_4 0.24 g,调 pH 值至 7.4,121 ℃ 高温灭菌 20 min。

1.5 实验方法

1.5.1 菌株培养与预处理 1) 种子液制备:取冻存于 -80 ℃ 条件下的菌株,解冻后,在 LB 固体培养基中划线,于 37 ℃ 条件下培养 16 h;挑取单菌落,接种于装有 LB 培养基(含质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 Kana)的 5 mL 摇菌管中,于 37 ℃、220 r/min 条件下培养 12 h。根据实验所需,调整摇菌管数量。

2) 扩大培养:将种子液以 2% 的接种量接种于装有 100 mL TB 培养基的锥形瓶中,添加 Kana 至终质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,于 37 ℃、220 r/min 条件下培养,实时检测 OD_{600} 。

3) 诱导培养:当 OD_{600} 达到 0.4~0.6 时,添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,于 30 ℃、220 r/min 条件下诱导表达培养 12 h 后,离心弃上清液,再用 PBS 缓冲液重悬浮沉淀,离心弃上清液,清洗 3 次后,根据全细胞催化反应的需求重悬浮沉淀,并调整其 OD_{600} 。

1.5.2 质粒和重组菌株构建 1) 质粒 pRSFDuet-*aad- ν hb-ldh* 和 pRSFDuet-*aad-ldh- ν hb* 构建。以质粒 pRSFDuet-*aad-ldh* 为模版,分别以引物 D-A-R、D-A-F 和 D-L-R、D-L-F 为上、下游引物进行反向 PCR 扩增,得到线性化质粒;以质粒 pRSFDuet- *ν hb* 为模版,分别以引物 F-A-V、R-A-V 和 F-L-V、R-L-V 为上、下游引物进行 PCR 扩增,纯化回收得到基因 *vgb* 上、下游同源片段,同源重组后,获得对应质粒。

2) 质粒 pRSFDuet-*aad-ldh-T7- ν hb* 构建。分别以引物 F-T7、R-T7 为上、下游引物进行 PCR 扩增自连,得到含 T7 启动子的上、下游同源片段;以质

粒 pRSFDuet- *ν hb* 为模版,分别以引物 F-V、R-V 为上、下游引物进行 PCR 扩增,纯化回收得到基因 *vgb* 上、下游同源片段;利用 OE-PCR 扩增将 2 次 PCR 产物进行连接,纯化回收得到 T7- *ν hb* 基因片段;利用 *AvrII* 快切酶将质粒 pRSFDuet-*aad-ldh* 单酶切,纯化回收得到线性化质粒;将 T7- *ν hb* 基因片段和线性化质粒进行同源重组,获得对应质粒。

3) 质粒 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs1- ν hb*、pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2- ν hb* 和 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs3- ν hb* 构建。以质粒 pRSFDuet-*aad-ldh-T7- ν hb* 为模版,分别以引物 D-R-R、D-R-F 为上、下游引物进行反向 PCR 扩增,纯化回收得到线性化质粒;以质粒 pRSFDuet- *ν hb* 为模版,分别以引物 F-r1-V、F-r2-V、F-r3-V 为上游引物,均以引物 R-r-V 为下游引物,PCR 扩增纯化回收得到基因 *vgb* 上、下游同源片段,同源重组后,获得对应质粒。

4) 质粒 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-2 ν hb* 构建。以 T7- *ν hb* 基因片段为模版,分别以引物 F-1V、R-1V 和 F-2V、R-2V 为上、下游引物进行 2 次 PCR 扩增,纯化回收得到基因 *vgb* 上、下游同源片段;利用 OE-PCR 扩增将 2 次 PCR 产物进行连接,纯化回收得到双拷贝基因 *vgb* 片段;利用 *AvrII* 快切酶将质粒 pRSFDuet-*aad-ldh* 单酶切,纯化回收得到线性化质粒;将双拷贝基因 *vgb* 片段和线性化质粒进行同源重组,获得对应质粒。

5) 质粒 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-3 ν hb* 构建。以质粒 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2- ν hb* 为模版,分别以引物 D-V-R、D-V-F 为上、下游引物进行反向 PCR 扩增,纯化回收得到线性化质粒;以 T7- *ν hb* 基因片段为模版,分别以引物 F-2 ν 、R-2 ν 和 F-3 ν 、R-3 ν 为上、下游引物进行 2 次 PCR 扩增,纯化回收得到基因 *vgb* 上、下游同源片段;利用 OE-PCR 扩增将 2 次 PCR 产物进行连接,纯化回收得到双拷贝基因 *vgb* 片段;将线性化质粒和双拷贝基因 *vgb* 片段进行同源重组,获得对应质粒。

6) 重组菌株构建。将重组质粒电转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,通过 Kana 抗性平板和菌落 PCR 筛选阳性转化子,挑取阳性转化子进行摇菌

培养并提取质粒,通过质粒单酶切进行 2 次验证后送检,将序列比对正确的质粒电转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中;同样,通过 Kana 抗性平板、菌落 PCR、质粒单酶切进行双重验证后送检,获得目标重组菌株。

1.5.3 半定量逆转录聚合酶链式反应 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

使用 Bacterial RNA Kit 试剂盒提取 RNA 基因,使用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒进行 RNA 逆转录。以 1 μg cDNA 为模版进行 PCR 扩增,引物为 *vhb*-F 和 *vhb*-R;PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳分析,使用凝胶成像系统进行量化分析。

1.5.4 Vhb 表达优化 通过比较大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh*)、BL21 (pRSFDuet-*aad-vhb-ldh*)、BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-vhb*) 和 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-vhb*) 经全细胞催化反应合成 PLA 的产量,优化表达顺序。在此基础上,进一步改变菌株为大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs1-vhb*)、BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-vhb*) 和 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs3-vhb*),在保持其他操作条件不变的情况下,优化 RBS 翻译强度。随后,改变菌株为大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-vhb*)、BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-2vhb*) 和 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-3vhb*),在其他操作条件不变的情况下,优化拷贝数。

1.5.5 全细胞催化反应条件优化 全细胞催化反应体系为 50 mL,全细胞催化剂质量浓度为 20 g/L,底物 PHE 质量浓度为 60 g/L。其中,全细胞催化剂质量浓度通过细胞干重 (Dry Cell Weight, *DCW*) 进行计算,公式为 $DCW = 0.388 \ 9X - 0.610 \ 0$, *X* 为 *OD*₆₀₀。

全细胞催化反应在装有 PBS 缓冲液的 250 mL 锥形瓶中进行,反应条件为: PBS 缓冲液浓度 0.01 mol/L、pH 值 7、温度 35 ℃、转速 220 r/min。反应启动后,每间隔 2 h 取样 1 次,反应持续 12 h 后停止。所有样品离心后取上清液,使用超纯水稀释,过 0.22 μm 水系滤膜后,利用 HPLC 仪进行样品检测与分析。

采用单因素试验逐次进行条件优化,每次试验

仅改变 PBS 缓冲液浓度、pH 值、温度和转速中的 1 个变量,其他操作条件不变。

1.5.6 PLA、PPA 和 PHE 含量检测 参照 Y. Hou 等^[31]的方法,并作适当修改。使用 HPLC 仪检测 PLA、PPA 和 PHE 的含量。色谱分析使用 Agilent SB-C18 色谱柱,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μL,流速为 1 mL/min,检测器为 VWD,波长为 210 nm。流动相由 A (三氟乙酸/超纯水 = 0.5 g/L) 和 B (三氟乙酸/甲醇 = 0.5 g/L) 组成,洗脱程序如下: 0 ~ 20 min,流动相 B 占比由 10% 升至 100%; 20 ~ 23 min,流动相 B 占比为 100%; 23 ~ 25 min,流动相 B 占比由 100% 降至 10%。

1.5.7 重组菌株稳定性检测 将构建的重组菌株活化并扩大培养后,与甘油按体积比 1 : 1 混合,分装冻存,此即为第 1 代菌株。将该代菌株活化和扩大培养后,再与甘油按体积比 1 : 1 混合冻存,获得第 2 代菌株。依此类推,连续传代至第 10 代。将各代菌株在最优条件下进行全细胞催化反应,利用 HPLC 仪检测并记录各代菌株合成 PLA 的产量变化,以确保每一代菌株合成能力的差异。

1.6 数据处理

所有实验均重复 3 次。采用 SnapGene 4.2.4 进行引物设计和序列测序比对,利用 Excel 2019 进行数据处理与统计分析,使用 Origin 2021 进行作图。

2 结果与分析

2.1 Vhb 对宿主大肠杆菌生长情况的影响分析

宿主大肠杆菌的生长情况如图 1 所示。由图 1a) 可知,大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-1) 在培养 4.5 h 后才进入对数生长期,而大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*vhb*) 在培养 3 h 后即进入对数生长期,表明 Vhb 能加快大肠杆菌的生长速度;大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-1) 在 10 h 时 *OD*₆₀₀ 达到最大值,为 1.513,而大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*vhb*) 在 12 h 时 *OD*₆₀₀ 达到最大值,为 2.508,表明 Vhb 能提高大肠杆菌的最大生物量。由图 1b) 可知,在诱导不同时间点,大肠杆菌 BL21

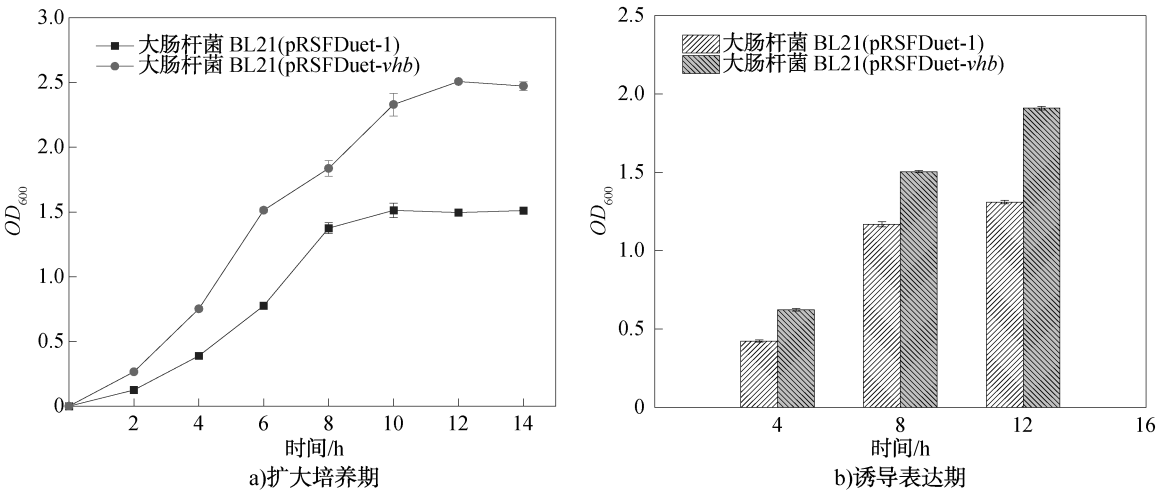


图 1 宿主大肠杆菌的生长情况
Fig. 1 Growth status of host *E. coli*

(pRSFDuet-vhb) 的 OD_{600} 均明显高于大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-1); 在诱导 12 h 后, 两菌株的 OD_{600} 均达到最大值, 且此时大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-vhb) 的 OD_{600} 是大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-1) 的 1.46 倍。以上结果表明, 单独表达 Vhb 能提高大肠杆菌对 O_2 的利用率, 并改善其生长速率与最大生物量。该结果与邓发军等^[32] 的报道较一致, 其研究也表明无论在高溶氧或低溶氧条件下, 在 TB 培养基中诱导表达 Vhb 均能提高菌体的生物量。基于上述结果初步判断, Vhb 能通过改善大肠杆菌的生长, 提高全细胞催化合成 PLA 的产量。

2.2 重组菌株构建及 Vhb 表达验证结果分析

以构建大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-vhb-ldh) 为例, 其他菌株的构建及验证过程与之类似, 故不再赘述。质粒 pRSFDuet-aad-vhb-ldh 构建及在大肠杆菌中的表达如图 2 所示, 其中泳道 M 为 Marker, 泳道 1 和 2 为阴性对照, 泳道 3 和 4 为阳性对照。由图 2a) 可知, 目的条带大小正确, 为 441 bp。由图 2b) 可知, *vgb* 基因在大肠杆菌 BL21 中成功表达。

2.3 Vhb 表达优化结果分析

2.3.1 Vhb 的表达顺序 Vhb 的顺序优化示意图如图 3 所示, 其中 a) 为 pRSFDuet-aad-ldh, b) 为 pRSFDuet-aad-vhb-ldh, c) 为 pRSFDuet-aad-ldh-vhb, d) 为 pRSFDuet-aad-ldh-T7-vhb。顺序优化后 PLA

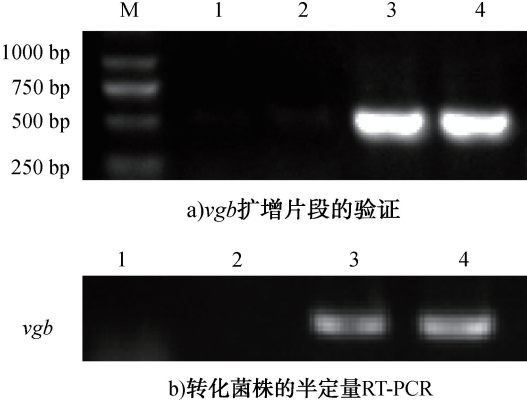


图 2 质粒 pRSFDuet-aad-vhb-ldh 构建
及在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 Construction of plasmid pRSFDuet-aad-vhb-ldh and its expression in *E. coli*

的产量及 PLA 的生物合成途径分别如图 4 和图 5 所示。由图 3—图 5 可知, 当 Vhb 与 L-AAD、LDH 共用 T7 启动子, 或具有单独 T7 启动子, 进行多基因共表达时, 相比大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-ldh) 的 PLA 产量, 共表达 Vhb 均可有效提升全细胞催化合成 PLA 的产量。大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-vhb-ldh) 与大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-ldh-vhb) 的 PLA 产量差异较小, 最大 PLA 产量分别为 36.7 g/L 和 37.5 g/L, 表明二者的催化能力较接近, 且均出现了中间产物 PPA 的累积, 推测为两步催化反应失衡所致。类似的现象在邵宇等^[33] 的研究中也有报道, 他们在构建多酶级联催化反应体系时发现, 由于 LaPPR 和 GDH 这 2 个关键酶之间的转化

过程不平衡,导致中间产物 PPA 大量累积,这一限速步骤极大影响了 L-PLA 的催化合成。相比之下,大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-vhb*) 的最大 PLA 产量为 40.7 g/L,且未出现中间产物 PPA 的累积,表明该菌株的反应较平衡,将在此基础上继续优化。

2.3.2 Vhb 的 RBS 翻译强度 Vhb 的 RBS 优化示意图如图 6 所示,其中 a) 为 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-vhb*, b) 为 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs1-vhb*, c) 为

pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-vhb*, d) 为 pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs3-vhb*。由图 6 可知,不同质粒的翻译强度为:rbs1<RBS<rbs2<rbs3。RBS 优化后的 PLA 产量如图 7 所示。由图 7 可知,整体上,优化 RBS 的翻译强度可对催化合成 PLA 的产量进行微调。大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs1-vhb*) 在各个时段中合成 PLA 的产量均下降,表明随着 RBS 翻译强度的减小,酶的表达水平也随之降低;大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs3-vhb*) 合成 PLA 的最大产量为 42.0 g/L,而大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh-T7-rbs2-vhb*) 的催化能力最强,合成 PLA 的最大产量为 42.7 g/L,表明酶的表达并不与 RBS 的翻译强度成正比,其中 rbs2 的调控作用最优,将在此基础上继续优化。

2.3.3 Vhb 的拷贝数 Vhb 的拷贝数优化示意图

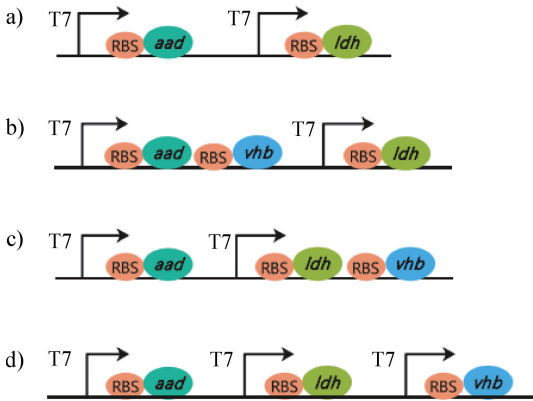


图 3 Vhb 的顺序优化示意图
Fig. 3 Schematic diagram of Vhb sequence optimization

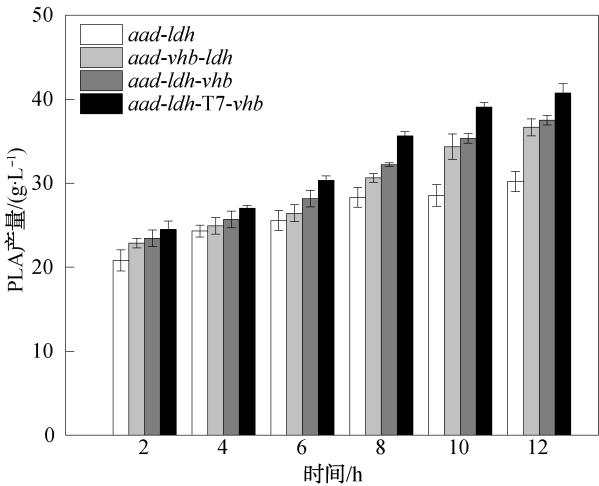


图 4 顺序优化后 PLA 的产量
Fig. 4 Yield of PLA after sequence optimization

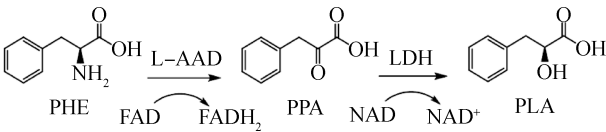


图 5 PLA 的生物合成途径
Fig. 5 Biosynthetic pathway of PLA

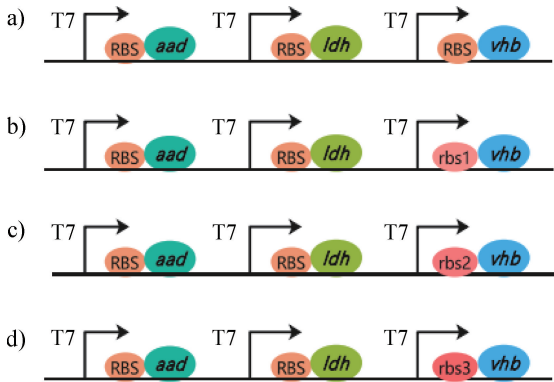


图 6 Vhb 的 RBS 优化示意图
Fig. 6 Schematic diagram of RBS optimization of Vhb

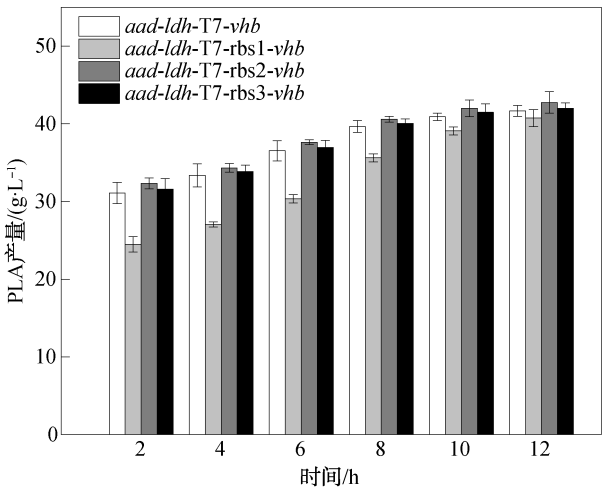


图 7 RBS 优化后的 PLA 产量
Fig. 7 Yield of PLA after RBS optimization

如图 8 所示,其中 a) 为 pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-*vhb*, b) 为 pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-2*vhb*, c) 为 pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-3*vhb*。拷贝数优化后 PLA 的产量如图 9 所示。由图 8 和图 9 可知,整体上,优化 Vhb 拷贝数对催化合成 PLA 产量的影响更明显。大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-2*vhb*) 催化合成 PLA 的产量随着反应时间增加显著上升,在反应 2~10 h 时,PLA 的合成速率高达每小时 1.32 g/L,当反应至 12 h 时,PLA 最大产量达 49.4 g/L,相较于大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-*vhb*),其 PLA 最大产量提升了 6.7 g/L,增长率为 13.6%,表明拷贝数为 2 时,能明显提升菌株的催化能力。对于大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-3*vhb*),在 2~4 h 内,PLA 最大产量为 45.9 g/L,合成速率高达每小时 3.45 g/L;但在 4~6 h 时,PLA 合成量下降至 40.0 g/L;在 6~12 h

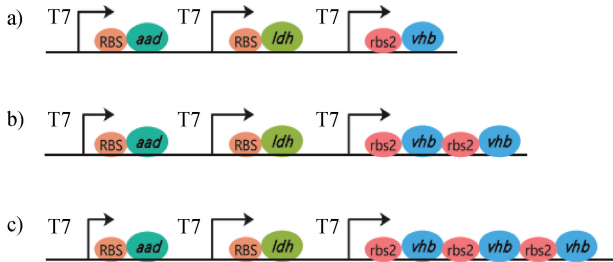


图 8 Vhb 的拷贝数优化示意图

Fig. 8 Schematic diagram of copy number optimization of Vhb

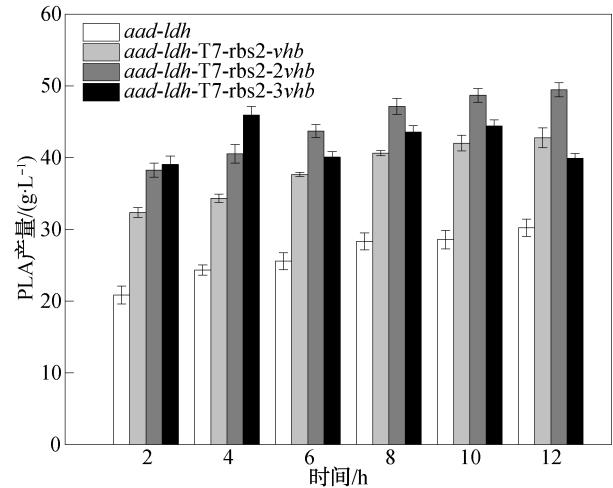


图 9 拷贝数优化后 PLA 的产量

Fig. 9 Yield of PLA after copy number optimization

时,PLA 产量先回升至 44.4 g/L 后又急速下降至 39.9 g/L,表明拷贝数为 3 时,可能菌株的代谢负荷过重,造成质粒不稳定,进而影响 PLA 的合成效率。类似现象在王亚丽等^[34]的研究中也有报道,他们在进行多拷贝表达优化时发现,当拷贝数为 7 时,菌株中 Rhv3 的表达量下降,推测可能是过多的重复序列导致其互相之间发生了同源重组,也可能是因为过多相同基因的合成消耗了过量核糖体,加重了宿主代谢负担,导致菌株生长状态恶化。至此,本研究成功构建了一种新型的多酶偶联全细胞催化剂大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-rbs2-2*vhb*)。

2.4 全细胞催化反应条件优化结果分析

全细胞催化反应条件优化结果如图 10 所示,其中不同小写字母表示有显著性差异($P<0.05$)。由图 10a) 可知,全细胞催化体系的最适 PBS 缓冲液浓度为 0.010 mol/L;当 PBS 缓冲液浓度升高至 0.020 mol/L 时,PLA 产量显著下降,这可能是由过高的 PBS 缓冲液浓度会造成菌株细胞盐失衡所致。由图 10b) 可知,pH 值为 7.0 时,PLA 产量最大,表明多酶偶联催化效果在中性环境中最佳;pH 值为 6.0 或 8.0 时,PLA 产量下降,这可能是由过酸或过碱的环境会降低酶的催化活性所致。由图 10c) 可知,全细胞催化体系的最适温度为 37 ℃,进一步升温至 39 ℃,PLA 产量显著下降,这可能是由高温会破坏多酶偶联催化中某一种酶的稳定性所致。全细胞催化需要大量的 O_2 ,转速与溶氧量相关,转速过低会导致氧传质效率降低,菌体获得的溶氧不充分,最终导致菌体密度偏低^[35]。由图 10d) 可知,随着转速的增加,PLA 的产量也随之增加,当转速为 250 r/min 时,PLA 产量最高,为 53.7 g/L;而当转速继续提高至 280 r/min 时,PLA 产量基本持平,表明全细胞催化体系的最适转速为 250 r/min,此时已达该锥形瓶的溶氧上限。

2.5 重组菌株稳定性分析

不同传代次数后全细胞催化合成 PLA 的产量如图 11 所示,其中 W 为初代菌株的 PLA 产量 (53.7 g/L)。由图 11 可知,连续传代 3 次后,优势

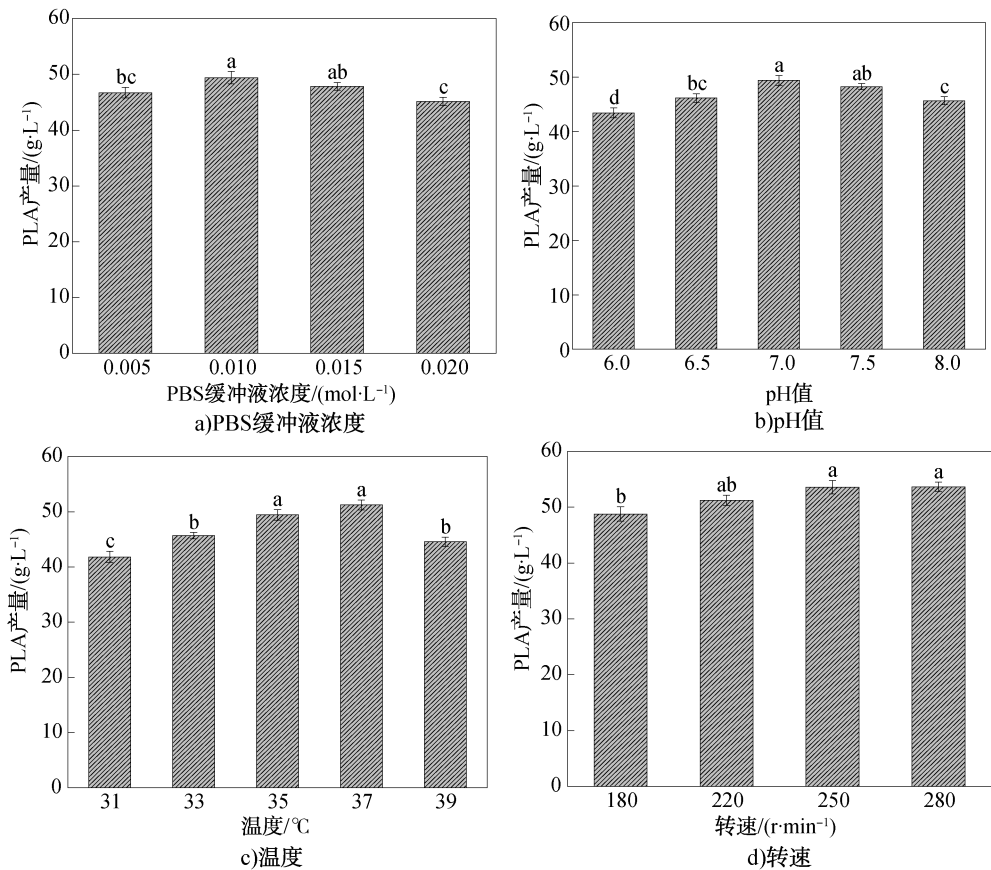


图 10 全细胞催化反应条件优化结果

Fig. 10 Optimization results of the whole-cell catalytic reaction conditions

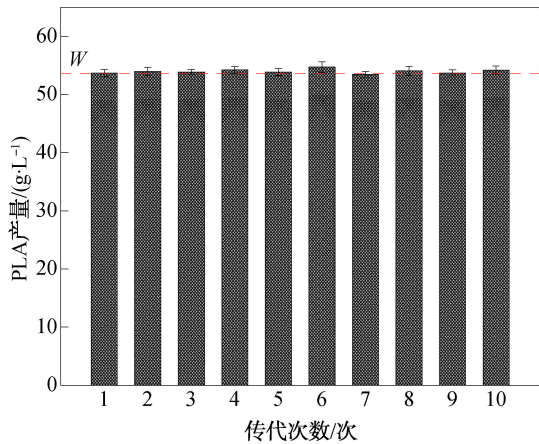


图 11 不同传代次数后全细胞催化合成 PLA 的产量
Fig. 11 Yield of PLA production via whole-cell catalysis after different passages

重组菌株大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-ldh-T7-rbs2-2v**h**b) 的 PLA 产量与初代菌株无明显差异。连续传代至第6次时,PLA 产量出现相对提升,这可能是由菌株在传代过程中适应性增强所致。连续传代 10 次,整体 PLA 产量的变化率均小于 5%,这表明该优势重组菌株的稳定性良好,具有成为工业化

菌株的潜力^[36]。

3 结论

本研究探究了异源表达 V**H**b 对宿主大肠杆菌生长情况的影响,初步评估了 V**H**b 在全细胞催化合成中的作用,利用基因工程手段共表达了 V**H**b、L-AAD 和 LDH,采用两步法催化 PHE 合成了 PLA,通过优化关键酶的表达调控策略构建了一种新型多酶偶联全细胞催化剂大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-ldh-T7-rbs2-2v**h**b),打破了全细胞催化体系因高需氧量导致 PLA 产量受限的问题。进一步通过单因素试验优化了全细胞催化反应条件,构建了高效的全细胞催化反应体系:PBS 缓冲液浓度 0.010 mol/L、pH 值 7.0、温度 37 °C、转速 250 r/min。在此条件下,优势重组菌株大肠杆菌 BL21 (pRSFDuet-aad-ldh-T7-rbs2-2v**h**b) 的 PLA 最大产量为 53.7 g/L。此外,连续传代实验验证了该重组菌株的稳定性良好,连续传代 10 次,每一代菌株 PLA

产量的变化率均小于5%,具有成为工业化菌株的潜力。未来将进一步研究重组菌株表达 Vhb 提高催化合成 PLA 的作用机制,例如氧参与合成的代谢途径;研究重组菌株合成 PLA 的中试放大实验,优化相关发酵工艺条件,以期多酶偶联全细胞催化剂的构建、PLA 及其衍生物的催化合成提供参考。

参考文献:

- [1] MARTINS F C O L, SENTANIN M A, DE SOUZA D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications [J]. Food Chemistry, 2019, 272: 732–750.
- [2] 李波, 郑凯茜, 皇甫露露, 等. 苯乳酸在食品保鲜中的应用研究进展[J]. 包装工程, 2022, 43(15): 129–136.
LI B, ZHENG K X, HUANGFU L L, et al. Application and research progress of phenyllactic acid in food preservation [J]. Packaging Engineering, 2022, 43(15): 129–136.
- [3] 罗希, 杨泽锋, 臧瑜, 等. 乳酸脱氢酶与葡萄糖脱氢酶偶联催化合成 D-苯基乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(7): 22–28.
LUO X, YANG Z F, ZANG Y, et al. Synthesis of D-phenyllactic acid catalyzed by coupled lactate dehydrogenase and glucose dehydrogenase [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(7): 22–28.
- [4] WU H, GUANG C E, ZHANG W L, et al. Recent development of phenyllactic acid: Physicochemical properties, biotechnological production strategies and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2023, 43(2), 293–308.
- [5] 贾以泽, 舒泉先, 丛瑞涛, 等. 苯乳酸与 DNA 相互作用及其抑菌机制研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(5): 67–75.
JIA Y Z, SHU Q X, CONG R T, et al. Interaction between phenyllactic acid and DNA and its antibacterial mechanism[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(5): 67–75.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2024 [J]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard—standards for uses of food additives: GB 2760—2024 [J]. Beijing: Standards Press of China, 2024.
- [7] WANG Y F, LUO X, SUN X L, et al. Lactate dehydrogenase encapsulated in a metal-organic framework: A novel stable and reusable biocatalyst for the synthesis of D-phenyllactic acid [J]. Colloids and Surfaces B (Biointerfaces), 2022, 216: 112604.
- [8] WU W Y, DENG G, LIU C J, et al. Optimization and multionic basis of phenyllactic acid overproduction by *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(6): 1741–1749.
- [9] 曹艳丽, 朱兵峰, 时明星, 等. 透明颤菌血红蛋白的结构与功能及其在生物医药生产中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(1): 37–47.
CAO Y L, ZHU B F, SHI M X, et al. Structure and function of *Vitreoscilla* hemoglobin and its application in the production of biomedicines [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2022, 53(1): 37–47.
- [10] 薛志勇, 代红生, 张显元, 等. 表达透明颤菌血红蛋白基因对酿酒酵母生长及细胞内氧化状态的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(11): 32–39.
XUE Z Y, DAI H S, ZHANG X Y, et al. Effects of *Vitreoscilla* hemoglobin gene on growth and intracellular oxidation state of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Biotechnology, 2021, 41(11): 32–39.
- [11] 苏嘉璈. 透明颤菌血红蛋白的定向进化及其催化合成吡啶类化合物的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
SU J L. Directed evolution of *Vitreoscilla* hemoglobin for the synthesis of indolizines [D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [12] JUÁREZ M, LA LOSA C H G D, MEMÚN E, et al. Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells [J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(3): 1600438.
- [13] WEBSTER D A, DIKSHIT K L, PAGILLA K R, et al. The discovery of *Vitreoscilla* hemoglobin and early studies on its biochemical functions, the control of its expression, and its use in practical applications [J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1637.
- [14] 韩琴, 徐新星, 王儒昕, 等. 敲除 *ptsG* 基因及共表达透明颤菌血红蛋白提高大肠杆菌 SHMT 产量[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 119–125.
HAN Q, XU X X, WANG R X, et al. Knockout of *ptsG* and co-expression with *Vitreoscilla* hemoglobin enhance the production of serine hydroxymethyltransferase in *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2020, 41(2): 119–125.
- [15] TANG R H, WENG C H, PENG X W, et al. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* H16 for improved chemoautotrophic growth and PHB production under oxygen-limiting conditions [J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 11–23.
- [16] LIU D, KE X, HU Z C, et al. Improvement of pyrroloquinoline quinone-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and regulation of dissolved oxygen tension for the biosynthesis of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose [J]. Journal of Bioscience and

- Bioengineering, 2021, 131(5):518-524.
- [17] ZHOU Q H, SU Z X, JIAO L C, et al. High-level production of a thermostable mutant of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 in *Pichia pastoris* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(1):279.
- [18] MIROŃCZUK A M, KOSIOROWSKA K E, BIEGALSKA A, et al. Heterologous overexpression of bacterial hemoglobin VHb improves erythritol biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1):176.
- [19] DA SILVA A J, DE SOUZA CUNHA J, HREHA T, et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production [J]. Metabolic Engineering, 2021, 64:15-25.
- [20] YE J R, LIU M M, HE M X, et al. Illustrating and enhancing the biosynthesis of astaxanthin and docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium* sp. SK4 [J]. Marine Drugs, 2019, 17(1):45.
- [21] WANG X T, DING Y T, GAO X Y, et al. Promotion of the growth and plant biomass degrading enzymes production in solid-state cultures of *Lentinula edodes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin gene [J]. Journal of Biotechnology, 2019, 302:42-47.
- [22] XUE S J, JIANG H, CHEN L, et al. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) and flavohemoglobin (Fhb) genes greatly enhances pullulan production [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132:701-709.
- [23] 张一帆, 刘晓艳, 万中义, 等. 不同启动子介导的 *vgb* 基因异源表达对诺沃霉素产量的影响 [J]. 河南农业科学, 2025, 54(4):91-100.
- ZHANG Y F, LIU X Y, WAN Z Y, et al. Effect of heterologous expression of the *vgb* gene mediated by different promoters on novonestmycin production [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2025, 54(4):91-100.
- [24] YU F, ZHAO X R, WANG Z W, et al. Recent advances in the physicochemical properties and biotechnological application of *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. Microorganisms, 2021, 9(7):1455.
- [25] 王冰冰. 重组色氨酸羟化酶的改造及多酶级联高效合成 5-羟基色氨酸 [D]. 无锡: 江南大学, 2024.
- WANG B B. Engineering of recombinant tryptophan hydroxylase and efficient multienzyme cascade synthesis of 5-hydroxytryptophan [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.
- [26] 陈春岑. 开发多酶级联催化体系实现萜类化合物的绿色合成 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
- SHEN C C. Development of multi-enzyme cascade system for green synthesis of terpenes [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024.
- [27] HOU Y, GAO B, CUI J D, et al. Combination of multi-enzyme expression fine-tuning and co-substrates addition improves phenyllactic acid production with an *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst [J]. Bioresource Technology, 2019, 287:121423.
- [28] 刘周玘, 王淼. 生物转化合成苯乳酸工程菌的培养条件优化 [J]. 工业微生物, 2019, 49(4):8-15.
- LIU Z P, WANG M. Optimization of culture conditions for phenyllactic acid-producing engineering bacteria [J]. Industrial Microbiology, 2019, 49(4):8-15.
- [29] KAWAGUCHI H, MIYAGAWA H, NAKAMURA-TSURUTA S, et al. Enhanced phenyllactic acid production in *Escherichia coli* via oxygen limitation and shikimate pathway gene expression [J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(6):1800478.
- [30] WANG X T, HOU Y, LIU L, et al. A new approach for efficient synthesis of phenyllactic acid from L-phenylalanine: Pathway design and cofactor engineering [J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(5):e12584.
- [31] HOU Y, ZHAO W Y, DING X C, et al. Co-production of 7-chloro-tryptophan and indole pyruvic acid based on an efficient FAD/FADH₂ regeneration system [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(15):4873-4885.
- [32] 邓发军, 潘宇, 常飞, 等. β -葡萄糖苷酶与透明颤菌血红蛋白在大肠杆菌中的共表达 [J]. 生物工程学报, 2018, 34(3):379-388.
- DENG F J, PAN Y, CHANG F, et al. Co-expression of β -glucosidase and *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(3):379-388.
- [33] 邵宇, 张显, 胡孟凯, 等. 重组大肠杆菌全细胞催化合成 L-苯乳酸 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14):1-8.
- SHAO Y, ZHANG X, HU M K, et al. Synthesis of L-phenyllactic acid catalyzed by recombinant *Escherichia coli* whole cell biotransformation [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(14):1-8.
- [34] 王亚丽, 刘秀霞, 杨艳坤, 等. 基于 3A 组装的多拷贝基因策略优化重组水蛭素变体 III 的生产 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(16):1-8.
- WANG Y L, LIU X X, YANG Y K, et al. Efficient production of Rhv3 using a multi-copy gene strategy based on 3A assembly [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(16):1-8.
- [35] 王星, 韩伟, 刘艳芳, 等. 灵芝三萜生物合成途径与溶氧调控液态发酵的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2025, 52(11):4914-4926.
- WANG X, HAN W, LIU Y F, et al. Biosynthetic pathways of triterpenoids in *Ganoderma lingzhi* and dissolved oxygen control in liquid fermentation: A review [J]. Microbiology China, 2025, 52(11):4914-4926.
- [36] 徐康, 侯运华, 赵建志. 酿酒酵母工业菌株中 II 型启

动子介导 sgRNA 表达的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的优化[J]. 齐鲁工业大学学报, 2024, 38(6): 24-32.
XU K, HOU Y H, ZHAO J Z. Optimization of a CRISPR/

Cas9 gene editing system for type II promoter-mediated sgRNA expression in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Qilu University of Technology, 2024, 38(6): 24-32.

Study on improving the yield of whole-cell catalytic production of phenyllactic acid by heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin combined with regulation strategy

DING Xincheng, SUN Ruijie, JIA Shiru, HOU Ying

School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] This study aims to improve the oxygen (O₂) utilization rate of strains in the whole-cell catalytic reaction system and efficiently catalyze the synthesis of phenyllactic acid (PLA) from phenylalanine (PHE). **[Methods]** Based on the effect of heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) on the growth of host *Escherichia coli*, genetic engineering technology was used to construct a multi-enzyme coupled expression system including VHb, L-amino acid deaminase (L-AAD) and lactate dehydrogenase (LDH). Subsequently, the expression regulation strategies of key enzymes were optimized, and the genetic stability of recombinant strains was evaluated by continuous passage experiments. **[Results]** Heterologous expression of VHb could improve the oxygen utilization rate of strains and significantly promote the growth rate and maximum biomass of host *E. coli*. In shake flask culture, the time for the strain to enter the logarithmic growth phase during the scale-up culture stage was shortened by 1.5 h, and the maximum biomass was increased by 46% when VHb expression was induced alone. The dominant recombinant strain *E. coli* BL21 (pRSFDuet-*aad-ldh*-T7-*rbs2-2vhhb*) was obtained by optimizing the VHb expression regulation strategy. Furthermore, the whole-cell catalytic reaction system was optimized, and the optimal reaction conditions were determined as follows: 0.010 mol/L PBS buffer, pH 7.0, temperature 37 °C, and rotation speed 250 r/min. Under these conditions, the maximum PLA yield of the dominant recombinant strain was 53.7 g/L; The dominant recombinant strain had good stability; after 10 consecutive passages, the change rate of PLA yield in each generation was less than 5%, showing potential to become an industrial strain. **[Conclusion]** Heterologous co-expression of VHb can promote the growth of *E. coli* and improve the yield of PLA via whole-cell catalysis.

Key words: multi-enzyme conjugation; whole-cell catalysis; *Vitreoscilla* hemoglobin; phenyllactic acid; recombinant strain

[责任编辑: 杨晓娟 申慧珊]