

酿酒酵母 *gpd1* 和 *hor2* 基因在大肠杆菌中的共表达 Co-expression of *gpd1* and *hor2* from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*

杜丽琴¹, 韦宇拓^{1,2}, 陈发忠³, 罗兆飞³, 黄日波^{1,2*}

DU Li-Qin¹, WEI Yu-Tuo^{1,2}, CHEN Fa-Zhong³, LUO Zhao-Fei³ and HUANG Ri-Bo^{1,2*}

1. 广西大学生命科学与技术学院 发酵与酶工程研究所, 南宁 530005

2. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005

3. 广西南宁中诺生物工程有限责任公司, 南宁 530003

1. Institute of Fermentation and Enzyme engineering, Guangxi University, Nanning 530005, China

2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Nanning 530005, China

3. Sinozyme Biotech Co., Ltd. Keyuan Ar., Nanning 530004, China

摘要 利用途径工程的方法, 在大肠杆菌中构建一条新的产甘油的代谢途径。从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 克隆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 (*gpd1*) 和 3-磷酸甘油酯酶基因 (*hor2*), 并将两个基因串连到启动子 *trc* 的下游, 构建由 *trc* 启动子控制的能高效表达的多顺反子重组质粒 pSE-*gpd1-hor2*, 将重组质粒导入大肠杆菌 BL21 菌株中, 构建得到的重组菌株 GxB-gh 能将葡萄糖转化为甘油。结果表明重组菌株 GxB-gh 以葡萄糖为底物进行发酵, 甘油产量为 46.67g/L, 葡萄糖的转化率为 42.87%。这为利用工程菌绿色生产甘油进行了前期的探索, 也为进一步构建能生产 1,3-丙二醇的工程菌打下了良好的基础。

关键词 甘油, 3-磷酸甘油脱氢酶, 3-磷酸甘油酯酶, 多顺反子, 工程菌

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0385-05

Abstract Based on the principle of the pathway engineering, a novel pathway of producing glycerol was built in *E. coli*. The *gpd1* gene encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase and the *hor2* gene encoding glycerol 3-phosphatase were cloned from *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. The two genes were inserted into expression vector pSE380 together. A recombinant plasmid pSE-*gpd1-hor2* containing polycistron was constructed under the control of the strong *trc* promoter. Then it was transformed into *E. coli* BL21. The result showed the recombinant microorganism GxB-gh could convert glucose to glycerol directly. And the recombinant microorganism GxB-gh was incubated to produce glycerol from D-glucose in the fermentor. The maximal concentration of glycerol was 46.67g/L at 26h. Conversion rate of glucose was 42.87%. The study is about "green" producing glycerol by recombinant microorganism and is also useful for further working in recombining microorganism of producing 1,3-propanediol.

Key words glycerol, GPD1, HOR2, polycistron, recombinant microorganism

甘油是一种重要的化工原料, 广泛地应用于化学、医药、食品、化妆品、烟草等行业中。甘油常见的

生产方法中, 皂化合成法由于肥皂工业处于行业低潮而使成本变得越来越不合算; 化学合成法由于资源匱

Received: December 15, 2004; Accepted: February 6, 2005.

The work was supported by The National 863 High-Tech R&D Program of China (No.2003AA0011039)

* Corresponding author. Tel:86-771-3235706; E-mail: riboh@public.nn.gx.cn

国家“863”高新技术研究与发展计划项目资助(No.2003AA0011039).

乏也面临着成本的压力;传统的微生物发酵法中厌氧发酵需要加亚硫酸盐但却增加了甘油的回收难度且过量的亚硫酸盐对菌株有毒害^[1],好氧发酵具有发酵终点难以控制、残糖较高且发酵过程中产物复杂^[2]和甘油的产率易受生长条件的影响^[3]等缺陷。

在现代社会,人类日益面临人口增加和环境污染的双重压力,现代工业迫切需要寻找一条效率高、环境污染小的发展道路。生物技术利用酶作为反应催化剂,所需要的反应条件温和,不需要耗费大量的能源来提供热量;酶反应的反应溶液是低盐、低离子的溶液,对环境的污染小;酶反应效率高,而且特异性强,还具有手性特异性。因而生物技术被称为“绿色的化学反应”,这个技术应用到工业上体现了高效、节能、环保的特点^[4]。因此,将酿酒酵母中产甘油的相关基因 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpd1*)和 3-磷酸甘油酯酶基因(*hor2*)导入到大肠杆菌中,从而在大肠杆菌中构建一条由葡萄糖经糖酵解途径生成磷酸二羟丙酮(DHAP)再经 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶的共同作用生成甘油的代谢途径,在不产甘油的大肠杆菌中构建一条新的转化葡萄糖生成甘油的代谢途径。利用这种工程菌生产甘油具有生产工艺简单、成本低廉、副产物少、产物分离简单等优点,因而是“绿色”生产甘油,具有广阔的应用前景;而且在此工作的基础上还可进一步改造代谢途径获得直接转化葡萄糖生产 1,3-丙二醇的基因工程菌。因而构建工程菌生产甘油是甘油生产的发展趋势,国外已有 Dupont 和 Genencor 公司进行相关研究,但国内还未有相关报道。本研究从酿酒酵母中克隆 *gpd1*^[5] 和 *hor2*^[6] 基因,构建由单个启动子 *trc* 控制两个基因表达的多顺反子表达质粒,然后导入大肠杆菌,进行利用大肠杆菌生产甘油的发酵研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 INVSc1 购自 Invitrogen 公司,克隆载体 pGEM-3zf(+) 购自 Promega 公司,表达载体 pSE380 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 BL21(*E. coli* BL21) 由本实验室保存。

1.2 培养基

YPD 培养基(1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖)用于酿酒酵母培养;LB 培养基(1% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl)用于细菌培养;种子培养基(每升:30g KH_2PO_4 、2.0g 柠檬酸、2.0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2mL 98% H_2SO_4 、0.3g 柠檬酸铁铵、0.2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5g 酵母提取物、2.5% 葡萄糖、5mL Modified Balch's Trace-Element Solution^[7]、100mg Ampicillin,用 NH_4OH 调 pH 至 6.8,过滤灭菌)用于种子的培养;发酵培养基(每升:6.8g KH_2PO_4 、2.0g

柠檬酸、2.0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0mL 98% H_2SO_4 、0.3g 柠檬酸铁铵、0.2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.5% 葡萄糖、4g 乳糖、5g 酵母提取物、0.2% NaCl、100mg Ampicillin,用 NH_4OH 调 pH 至 6.7)用于发酵罐发酵。

1.3 酶与化学试剂

限制酶、DNA Marker 购自大连 TaKaRa 公司;Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、CIP 去磷酸化酶、Protein Marker 购自 MBI 公司;其他试剂为国产分析纯;寡聚核苷酸由上海生工生物公司合成。

1.4 PCR 扩增 *gpd1* 基因和 *hor2* 基因

根据 GenBank 公布的酿酒酵母的 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpd1*)和 3-磷酸甘油酯酶基因(*hor2*)序列设计以下引物:

gpd1 基因上游引物:

5'-AGACCATGGCTGCTGCTGCTGATAGA-3'

gpd1 基因下游引物:

5'-CGAGGATCCCTAATCTTCATCTAGATCTAATTC-3'

hor2 基因上游引物:

5'-ATAGGATCCAGGAAA CAGACCATGGGATTGACTAC TAAACC-3'

hor2 基因下游引物:

5'-CGACTGCAGGGACTCTATCTGAGAATTATTACT-3'

gpd1 基因的引物中分别引入了 *Nco*I 和 *Bam*H I 位点;*hor2* 基因的上游引物中引入 *Bam*H I 位点和核糖体结合位点(RBS)序列 AGGAAA,下游引物引入 *Pst*I 位点。以酿酒酵母总 DNA 为模板,用 Pfu DNA 聚合酶 PCR 扩增 *gpd1* 和 *hor2* 基因,然后分别平端连接到经 *Sma*I 酶切的 pGEM-3zf(+)

1.5 含多顺反子的重组质粒的构建

将测序验证正确的两目的片段与表达载体 pSE380 连接,构建由单个启动子启动两个基因表达的多顺反子(见图 1)。然后转化到大肠杆菌 JM109,酶切鉴定含多顺反子的重组质粒,重组质粒命名为 pSE-*gpd1-hor2*。由于在多顺反子中 *gpd1* 和 *hor2* 这两个外源基因含有各自的 RBS 序列以及翻译起始终止信号,能独立翻译出 GPD1 和 HOR2 这两个异源

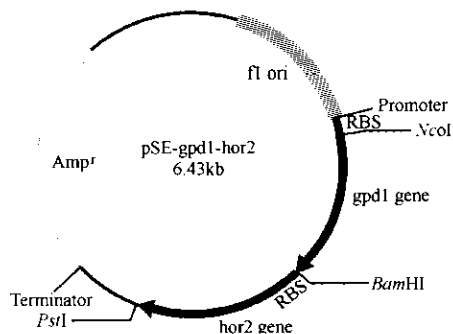


图 1 含 *gpd1* 和 *hor2* 多顺反子的构建
Fig. 1 Construction of polycistron containing *gpd1* and *hor2*

蛋白。所运用的基因操作、质粒提取、大肠杆菌感受态细胞制备和转化等操作按文献[8]。

1.6 重组质粒的稳定性检测

将重组质粒 pSE-*gpd1-hor2* 转化到大肠杆菌菌株 BL21 命名为 GxB-gh, 再接种单菌落在含 100 μg/mL Amp 固体培养基上, 从平板上挑取菌落接种于 LB 培养基培养, 每隔 8h 以 1% 接种量转接于新鲜 LB 培养基中, 连续培养 72h。每 8h 取样稀释涂布于 LA 平板上, 37℃ 培养 14h, 生长菌落逐个转接到含 100 μg/mL Amp 固体培养基上, 经培养检出生长菌落并作鉴定。

$$\text{稳定率} = (\text{生长菌落数} / \text{转接菌落数}) \times 100\%$$

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 分析

挑取重组菌株 GxB-gh 单菌落接种到 LB 培养基中(100 μg/mL Amp), 以含 pSE380 质粒的大肠杆菌菌株 BL21 菌株作对照, 37℃ 振荡培养过夜后, 次日按 1% 量接种到 LB 培养基中(100 μg/mL Amp), 37℃ 培养至 OD_{600} 为 0.4 ~ 0.6 时, 加诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 30℃ 诱导 10h 后取 1 mL 培养液离心收集菌体, 分别加 20 μL ddH₂O 和 2 × 蛋白质电泳上样缓冲液, 煮沸 5 min, 然后 10 000 r/min 离心 1 min, 取 5 μL 上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 表达产物的可溶性分析

取 5 mL 重组菌培养物, 离心收集菌体, 重悬于 100 μL ddH₂O 中, 用超声波破碎菌体, 离心, 收集上清, 另将所得沉淀重悬于 40 μL ddH₂O。分别取 20 μL 上清和沉淀, 各加入 2 × 上样缓冲液混匀后煮沸 5 min, 离心, 再各取 15 μL 和 8 μL 进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 重组菌株 GxB-gh 以葡萄糖为底物发酵生产甘油

将重组菌株 GxB-gh 单菌落接种到 LB 培养基中培养过夜, 第二天以 2.5% 量接种于种子培养基中 30℃ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.5 ~ 0.6 时, 再以 4% 量接种于盛有 25 L 发酵培养基的发酵罐 (B. Braun Biotech. BioSTAT DL30) 中, 37℃ 发酵培养 32h, 发酵 8h 后开始流加葡萄糖, 通过流加柠檬酸和氨水来保持发酵液 pH 的稳定。每隔 1h 取 1 mL 发酵液经离心取上清进行 HPLC, 以 1% 分析纯甘油为标样测甘油的产量。

高效液相色谱工作条件: 仪器: Waters 201DC 色谱仪, 色谱柱: 氨基柱, 流动相: 乙腈: 水/75: 25, 流速: 1.0 mL/min, 监测器: RID。

2 结果

2.1 *gpd1* 基因和含 RBS 序列的 *hor2* 基因的克隆及其序列测定

以酿酒酵母总 DNA 为模板扩增目的基因, 产物经

0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析有 1.2 kb 和 0.8 kb 特异性扩增带, 与预期相符(图 2、图 3)。将 PCR 产物分别平端连接到 pGEM-3zf(+) 载体上进行测序分析, 测序结果和 GenBank 公布的序列进行比较, 表明基因 *gpd1* 和 *hor2* 序列无差异, 可用于构建表达质粒。

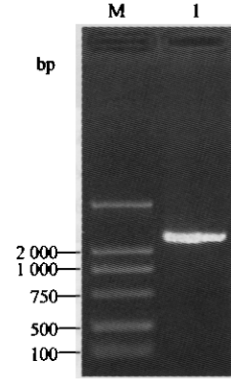


图 2 *gpd1* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR product of *gpd1* gene

M: Marker DL2000; 1: PCR product.

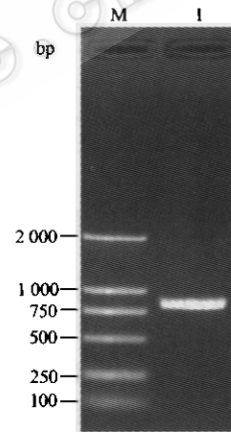


图 3 *hor2* 基因的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR product of *hor2* gene

M: Marker DL2000; 1: PCR product.

2.2 含多顺反子的重组质粒 pSE-*gpd1-hor2* 的构建与鉴定

将序列分析正确的 *gpd1* 基因和含 RBS 序列的 *hor2* 基因分别用 *Nco* I、*Bam* H I 和 *Bam* H I、*Pst* I 从克隆载体 pGEM-3zf(+) 上酶切下来, 同时连接到经 *Nco* I、*Pst* I 酶切处理的表达载体 pSE380 上。经 *Nco* I、*Bam* H I 或 *Bam* H I、*Pst* I 酶切鉴定, 分别切下大小约为 1.2 kb 和 0.8 kb 的目的片段(图 4) 与预期的相符, 表明 *gpd1* 和 *hor2* 基因已经连接到表达质粒 pSE380 上。

2.3 重组菌株 GxB-gh 的遗传稳定性测定

本研究结果表明表达质粒 pSE-*gpd1-hor2* 在有选择压力(即培养基中含有 100 μg/mL Amp) 条件下, 该质粒几乎不丢失, 能稳定传代。表 1 是重组菌株在不含 100 μg/mL Amp 的 LB 培养基中连续传代培

养,定时取样测定稳定性的数据。

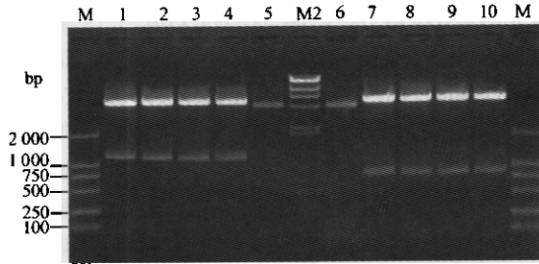


图4 质粒 pSE-*gpd1-hor2* 的酶切鉴定

Fig.4 Enzyme analysis of recombinant plasmid

pSE-*gpd1-hor2*

M: Marker DL2000; M2: λ Hind III; 1-4: pSE-*gpd1-hor2*/Nco I + BamH I; 5: pSE380/Nco I + BamH I; 6: pSE380/BamH I + Pst I; 7-10: pSE-*gpd1-hor2*/BamH I + Pst I.

表1 重组菌株在 LB 培养基中的稳定性

Table 1 Stability of recombinant strain in LB-broth

Fermentation time	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
Recombinant strain GxB-gh	150	150	149	150	150	148	150	148	147	142

2.4 质粒 pSE-*gpd1-hor2* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取诱导表达后的菌体和超声波破碎菌体后的上清及沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 5。重组菌在相对分子量约 42.9 kD 和 27.8 kD 处有明显的蛋白表达带,蛋白分子量与由基因序列推测所得理论分子量一致,表明构建成多顺反子的 *gpd1* 和 *hor2* 基因在大肠杆菌中都能得到表达。且由图 5 可以看出两目的蛋白主要是以可溶性形式存在。

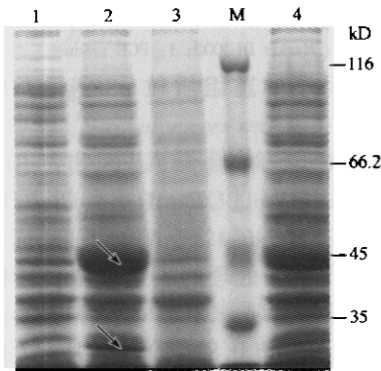


图5 pSE-*gpd1-hor2* 在大肠杆菌 BL21 中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of BL21/pSE-*gpd1-hor2*

1: BL21/pSE380; 2: BL21/pSE-*gpd1-hor2*/IPTG soluble protein; 3: BL21/pSE-*gpd1-hor2*/IPTG insoluble protein; 4: BL21/pSE-*gpd1-hor2*/IPTG; M: Protein marker.

2.5 重组菌株 GxB-gh 以葡萄糖为底物发酵产物的分析

发酵期间每隔 1h 取样,分别进行发酵液中的甘油产量、菌体密度、葡萄糖消耗累加量及葡萄糖浓度指标的测定。结果如图 6。图 6 说明发酵 26h,葡萄糖消耗约 2970g,菌株产甘油量最高,为 46.67g/L。

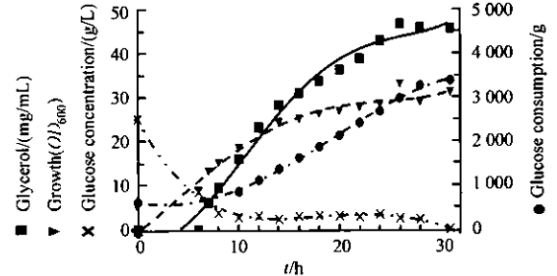


图6 重组菌 GxB-gh 在发酵罐中发酵的进程曲线

Fig.6 Time course of recombinant strain GxB-gh in fermentation

3 讨论

本研究是利用途径工程在大肠杆菌中引入酿酒酵母的 3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpd1*)和 3-磷酸甘油酯酶基因(*hor2*),从而在大肠杆菌中构建一条由葡萄糖经糖酵解途径生成磷酸二羟丙酮(DHAP)再经 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶的共同作用生成甘油的代谢途径,使本不产甘油的大肠杆菌能发酵生成甘油。本研究的工程菌的甘油产量为 46.67g/L,葡萄糖的转化率为 42.87%。目前,国际上甘油产量最高为 200g/L,国内甘油产量最高为 100g/L,这些均是在大型发酵罐中进行的,而本研究是实验室阶段小体积发酵的结果。从我们使用的表达系统的特点来看,通过以下措施可以提高工程菌的甘油产量:优化发酵条件(优化培养基成分、补加葡萄糖保持糖过量、控制溶氧量、保持合适的菌体密度等),预计甘油的产量将有大幅度的提高;对 *hor2* 基因表达的控制也是提高甘油产量的关键,*hor2* 基因的产物对宿主有毒害,必须小心控制 *hor2* 基因的表达^[9],但 *hor2* 在甘油缓慢积累阶段又会处于低水平表达,限制甘油的合成^[10],因此,控制好 *hor2* 基因的表达并维持其表达产物的活力将提高甘油的产量;调整合适的 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶在大肠杆菌中的酶活比配置^[11]也将提高甘油的产量;另外,甘油可作为碳源被大肠杆菌利用,而且大肠杆菌还有将甘油逆转化为磷酸二羟丙酮的酶类,如利用生物技术方法将相关酶类基因(*glpK* 和 *gldA*)缺失^[11],可减少甚至消除大肠杆菌在甘油发酵后期同化甘油的作用来进一步提高甘油的产量以及葡萄糖的转化效率(目前生产甘油得到的最高产量 200g/L 是使用大肠杆菌缺陷型的重组菌株),而葡萄

糖转化效率是决定生产成本的关键因素。

本结果也为进一步构建一个由葡萄糖生产 1,3-丙二醇的工程菌奠定了基础。利用以生物技术为特点的途径工程“绿色”生产甘油^[12]是具有独立知识产权的高技术项目,是生物技术在重要化工原料生产中应用的又一新尝试,具有重大的经济效益和社会效益。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Petrovska B, Winkelhansen E, Kuzmanova S. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Can J Microbiol*, 1999, 45(8): 695 - 699
- [2] Zhang CH (张超), Pu YW (浦跃武), Li ZH (李忠) *et al.* The survey of glycerol fermentation and the new direction of technology study. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* (日用化学工业), 1999, 4(2): 38 - 41
- [3] Zhuge J (诸葛健), Fang HY (方慧英). Trends in production of glycerol by fermentation. *Fine and Specialty Chemicals* (精细与专用化学品), 2002, 3/4: 3 - 5
- [4] R. Azerad. Chemical biotechnology Better enzymes for green chemistry. *Current opinion in biotechnology*, 2001, 12: 533 - 534
- [5] Larsson K, Ansell R, Eriksson P *et al.* A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 1993, 10 (5): 1101 - 1111
- [6] Norbeck I, Pahlman A-K, Akhtar N *et al.* Purification and characterization of two isoenzymes of D, L-glycerol 3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1996, 271 (23): 13875 - 13881
- [7] Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA *et al.* *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington D. C., 1994, p. 158
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 19 - 59
- [9] Bulthuis BA, Gatenby AA, Haynie SL *et al.* Method for the production of glycerol by recombinant organisms. US 6358716B1, 2002-3-19
- [10] Wang ZX (王正祥), Zhuge J (诸葛健), Cao Y (曹钰) *et al.* The key enzymes of metabolisms of glycerol in *Candida Glycerolgenesis*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2000, 40 (2): 180 - 187
- [11] Nair V, Payne MS, Trimbur DE *et al.* Method for the production of glycerol by recombinant organisms. WO 9928480, 1999 - 6 - 10
- [12] Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MC. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, 2003, 299 (5613): 1694 - 1697