

以甘油为底物利用重组大肠杆菌生产聚 3-羟基丙酸

杨鹏^{1,2} 王琦² 咸漠² 赵广^{2*} 薛永常^{1*}

(1. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

(2. 中国科学院生物材料重点实验室 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 山东 青岛 266101)

摘要:【目的】解决前期研究中所构建的以甘油为底物合成聚 3-羟基丙酸(P3HP)的代谢途径中存在两个主要的问题——细胞内还原力不平衡和质粒丢失,以提高 P3HP 的产量。【方法】克隆来源于肺炎克雷伯氏菌的 1,3-丙二醇(1,3-PDO)氧化还原酶基因,构建 P3HP 和 1,3-PDO 联产的菌株,解决细胞内还原力不平衡的问题。利用自杀性载体系统介导的同源重组技术,将甘油脱水酶及其激活因子的基因整合到大肠杆菌基因组中,提高质粒的稳定性。同时,对发酵条件进行优化。【结果】菌种改造和发酵条件优化显著提高了 P3HP 产量,在摇瓶条件下到达 2.7 g/L,比以前的报道提高 2 倍,并可同时得到 2.4 g/L 1,3-PDO。【结论】该重组大肠杆菌合成 P3HP 的产量得到提高,具有较好的工业化生产前景。

关键词:聚 3-羟基丙酸,自杀质粒,同源重组,基因工程,重组大肠杆菌

The production of poly(3-hydroxypropionate) by recombinant *Escherichia coli* from glycerol

YANG Peng^{1,2} WANG Qi² XIAN Mo² ZHAO Guang^{2*} XUE Yong-Chang^{1*}

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. CAS Key Laboratory of Bio-based Materials, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)

Abstract: [Objective] In previous study, we constructed a metabolic pathway to synthesize poly(3-hydroxypropionate) (P3HP) from glycerol. But two main issues, the reducibility imbalance and plasmid loss, still remained. In order to increase the yield of P3HP, we must solve those problems. [Methods] The 1,3-propanediol (1,3-PDO) dehydrogenase gene was cloned from *Klebsiella pneumoniae* and a P3HP and 1,3-PDO co-product strains was built to solve the reducibility imbalance in cell. The genes encoding glycerol dehydrogenase and its reactivatase were inserted into the *Escherichia coli* chromosome by suicide vector-mediated homologous recombination to improve the stability of plasmid. [Results] After optimization of fermentation condition, our recombinant strain produced 2.7 g/L P3HP, two times higher than the previous report, and 2.4 g/L 1,3-PDO was also obtained at the same time. [Conclusion] The production of P3HP by recombinant *Escherichia coli* from glycerol was improved and has great potential in various industrial applications.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200030); 中国科学院“百人计划”

*通讯作者: ✉: 赵广: zhaoguang@qibebt.ac.cn; 薛永常: xueych@dlpu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-06; 接受日期: 2014-04-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-17

Keywords: Poly(3-hydroxypropionate), Suicide plasmids, Homologous recombination, Genetic engineering, Recombinant *Escherichia coli*

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) 是近二十多年迅速发展起来的生物可降解材料, 是微生物体内合成的一类由 3-羟基脂肪酸组成的线性聚酯的总称, 是在细胞内碳氮源不平衡时作为碳源和能源的贮藏物质形成的高分子聚酯^[1]。自 Lemoigne 在巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 中首次发现聚羟基丁酸酯 (Poly-hydroxybutyric acid, PHB) 后, 已有超过 150 种单体被确定可用来聚合生成 PHA^[2]。

聚 3-羟基丙酸 [Poly(3-hydroxypropionate), P3HP] 是一种新型的生物可降解塑料, 具有优异的生物材料性质和机械性能, 如高机械强度和拉伸强度、高断裂伸长量、生物降解性、生物相容性、不溶于水、无毒、压电性、热塑性等^[3]。目前, 聚 3-羟基丙酸的化学合成方法以 β -丙内酯开环聚合为主, 但 β -丙内酯价格昂贵且为致癌物质, 限制了该方法的应用^[4]。生物合成 P3HP 的研究还刚刚起步。在绝大多数生物中 3-羟基丙酸 (3-Hydroxypropionate, 3HP) 不是天然代谢途径产生的化合物, 因此合成 P3HP 需要向培养基中添加与 3HP 结构相关的化合物, 如 3-HP、丙烯酸等^[5]。这些前体物质具有细胞毒性, 会抑制细胞的生长且价格昂贵, 不适用于大规模工业化生产。为解决这一问题, 研究者构建了分别以廉价碳源 (葡萄糖和甘油) 为底物合成 P3HP 的代谢途径^[6-7], 发酵结束后, 利用丙酮-氯仿抽提法得到 P3HP, 并通过核磁

共振法测定聚合物纯度。同时, 利用凝胶渗透色谱法测得 P3HP 的数均分子量 (M_n) 和重均分子量 (M_w) 分别为 1.2×10^5 Da 和 1.78×10^5 Da。但以葡萄糖为底物的 P3HP 的合成途径, 产量仅有 13 mg/L^[6], 而以甘油为底物的合成途径, 虽然经过发酵条件的优化, 产量也远没有达到工业化生产的要求^[7]。这一方面是由于以甘油为底物生产 P3HP 的过程中, 3-羟基丙醛被还原为 3-羟基丙酰辅酶 A 的过程中产生的 NADH 无法及时再生成 NAD^+ , 导致细胞内 NAD^+ 不足, 最终影响了 P3HP 的合成 (图 1)。同时, 也与发酵过程中携带合成基因的质粒大量丢失有关。

本研究在前期构建的 P3HP 合成途径的基础上, 引入来源于肺炎克雷伯氏菌的 1,3-丙二醇 (1,3-Propanediol, 1,3-PDO) 氧化还原酶, 通过 1,3-PDO 的生产, 平衡 P3HP 生产过程中的还原力, 达到提高 P3HP 产量的目的, 同时, 也可获得 1,3-PDO 这种重要的化工原料^[8]。此外, 利用高效自杀性载体系统介导的染色体整合技术, 将部分合成基因整合到大肠杆菌基因组中, 防止发酵过程中质粒的丢失^[9]。通过对发酵条件的优化, 有效地提高了 P3HP 的产量。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

本研究所用的菌株、质粒及引物见表 1。

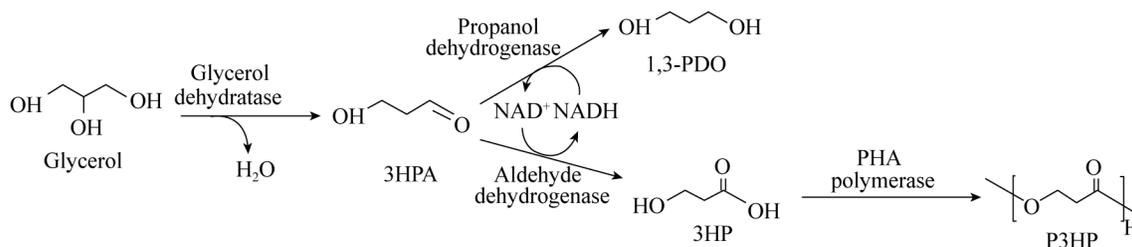


图 1 大肠杆菌以甘油为底物合成 P3HP 的代谢途径

Figure 1 The biosynthetic pathway of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol in the recombinant *Escherichia coli*

表 1 本研究所用的菌株、质粒及引物
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

| 菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers | 特征和基因型 Characteristics and genotypes | 来源 Resources |
|---|--|----------------------------|
| 菌株 Strains | | |
| <i>E. coli</i> BL21 | 表达载体宿主菌 | 全式金 |
| <i>E. coli</i> X7213 | 自杀质粒宿主菌 | 本实验室保藏 |
| <i>E. coli</i> BL21(A) | 基因组 <i>prpR</i> 中插入甘油脱水酶 <i>dhaB123</i> 和激活因子 <i>gdrAB</i> | This study |
| <i>E. coli</i> BL21(B) | <i>E. coli</i> BL21 带有质粒 pWQ02 和 pWQ04 | 参见文献[7] |
| 质粒 Plasmids | | |
| pET21a | Amp, 表达载体 | 本实验室保藏 |
| pWQ02 | Amp, 重组表达载体, pET21a 上带有 <i>pdup</i> 和来 <i>phaC</i> | 参见文献[7] |
| pET21a(A) | Amp, 重组表达载体, 在 pWQ02 上连接了来源于肺炎克雷伯菌的 <i>dhaT</i> | This study |
| pWQ04 | Cm, 重组表达载体, 带有 <i>dhaB123</i> 和 <i>gdrAB</i> | 参见文献[7] |
| pRE112 | Cm, 自杀质粒 | 亚利桑那州立大学 Roy Curtiss 博士 |
| pRE112(A) | Cm, 重组自杀质粒, 带有来源于 BL21 的 <i>prpR</i> | This study |
| pRE112(B) | Cm, 重组自杀质粒, <i>dhaB123</i> 和 <i>gdrAB</i> , 插入 pRE112(A)中的 <i>prpR</i> 片段中 | This study |
| 扩增基因 Gene amplified | | |
| | 序列 Sequences (5'→3') | 序号 Number |
| prpR-up-5' | CAGAGCTCGGTGACCTACATCCACAAG | ZG-268 |
| prpR-up-3' | GTACCGGTACCGATCGTTCTAGACAGTTGACTGCAACAAACGGATGC | ZG-269 |
| prpR-down-5' | TCTAGAACGATCGGTACCGGTACGCTGTTTCTCGATGAG | ZG-270 |
| prpR-down-3' | ATCTGCGCTAGCGCTGCATTCCGGCAGTTCAG | ZG-271 |
| seq-dhaB-5' | CGTGGTTCAGCCCGACAC | ZG-143 |
| ID-prpR-3' | CATGCCCGATGCGTAAGTTTATCG | ZG-272 |
| dhaT-5' | CAGTAAGCTTAAGGAGATATAATGAGCTATCGTATGTTTGATTATC | ZG-440 |
| dhaT-3' | ACGTCTCGAGTCAGAATGCCTGGCGGAAAATCGCG | ZG-441 |
| T7-term | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | ZG-141 |

注: 全部引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

Note: All primers were synthesized by Shanghai Generay Biotech Co., Ltd.

1.2 试剂

氨苄青霉素钠、氯霉素、IPTG 等购自上海生物工程技术有限公司; 维生素 B₁₂、甘油、硫酸铵、磷酸二氢钾、氯仿等购自国药集团化学试剂有限公司; DNA Marker、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶等购自大连 TaKaRa 公司; OMEGA 质粒小量提取试剂盒、OMEGA DNA 胶回收试剂盒购自青岛瑞德合益商贸有限公司。

1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0 酵母浸膏 5.0,

NaCl 10.0, pH 7.0。

发酵培养基(g/L): 甘油 20, (NH₄)₂SO₄ 3, 葡萄糖 3, KH₂PO₄ 1.5, KCl 1.9, 柠檬酸 1, 柠檬酸钠 1, FeSO₄·7H₂O 0.138, 微量元素 1 mL/L, 维生素 B₁ 0.045, pH 7.0。

微量元素组成(g/L): (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.37, H₃BO₄ 2.47, MnCl₂·4H₂O 1.58, ZnSO₄·7H₂O 0.29, CuSO₄·5H₂O 0.25。

大肠杆菌培养时根据需要加入终浓度 25 mg/L 的氯霉素(Chloramphenicol, Cm), 100 mg/L 氨苄

青霉素钠(Ampicillin, Amp), 大肠杆菌 X7213 培养时需加入二氨基庚二酸(DL- α , ϵ -Diamino pimelic acid, DAP), 终浓度 50 mg/L。

1.4 质粒的构建

质粒 pET21(A)构建: 以肺炎克雷伯氏菌基因组 DNA 为模板, 用引物 ZG-440 和 ZG-441 克隆 *dhaT* 基因, *dhaT* 片段与质粒 pWQ02 经 *Hind* III、*Xho* I 酶切后连接。

质粒 pRE112(B)的构建: 以 *E. coli* BL21 的基因组为模板, 分别利用引物 ZG-268 和 ZG-269、引物 ZG-270 和 ZG-271 扩增出片段 *prpR* 基因两侧同源片段, 再以两个扩增片段为模板, 利用引物 ZG-268 和 ZG-271 扩增出片段 *prpR*。限制性内切酶 *Sac* I 和 *Nhe* I 酶切 *prpR* 后, 将其连接到经过限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切后的质粒 pRE112, 构建成重组质粒 pRE112(A)。再利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切重组质粒 pRE112(A)和 pWQ04, 切胶回收质粒 pRE112(A)和 *dhaB-gdrAB* 片段, 进行酶连后, 构建完成重组质粒 pRE112(B), 测序正确。

1.5 同源重组突变株的构建

1.5.1 第一次重组: 以 *E. coli* X7213/pRE112(B) 为质粒供体菌, 以待突变菌种 *E. coli* BL21(DE3) 作质粒受体菌。将供体菌和受体菌进行活化后, 各取 1.5 mL, 离心后用无菌水重悬洗 2 次, 以除去抗生素, 再用 500 μ L 的无菌水重悬菌体沉淀后各取 100 μ L 并混匀, 离心后用 50 μ L 的 1% DAP 重悬菌体, 涂布于无抗性平板, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。收集平板上的菌体重悬到无菌水中。将重悬菌液稀释 10^{-1} – 10^{-4} 倍, 各倍数均取 30 μ L 涂布于氯霉素平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。PCR 验证单克隆菌落, 标记阳性菌。

1.5.2 第二次重组: 将标记的一次重组阳性单克隆接入无抗性 LB 试管, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 15 h。将菌液稀释 10^{-1} – 10^{-6} 倍, 各倍数均取 20 μ L 涂布于 10% 蔗糖平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。挑选蔗糖板上的单克隆菌落, 分别划到氯霉素平板和 10%蔗糖平板,

两个平板的同一划线处做相同编号后, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 h。选取蔗糖平板上生长而氯霉素平板未生长的菌做 PCR 验证, 标记阳性菌。划蔗糖平板分离单克隆 2 次, 以确保二次重组菌纯净。最终将 PCR 验证正确、并在氯霉素 LB 试管中检测不生长的菌, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 P3HP 生产

种子在 LB 培养基中活化, 转入 1/5 装液量的 500 mL 带挡板的三角摇瓶中, 接种量 1%, 同时加入 100 mg/L 氨苄青霉素钠和 34 mg/L 氯霉素, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, OD_{600} 达到 0.6–1.0 时加入 IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside), 以及 0.03 g/L 维生素 B₁₂ 并将培养温度调整到 30 $^{\circ}$ C。培养 72 h 后, 检测生物量、P3HP 和 1,3-PDO 的产量。

1.7 发酵条件优化^[10]

辅助碳源优化: 发酵过程中每 12 h 向发酵培养基中分别补加不同浓度的葡萄糖, 其它方法同 1.6, 筛选最适辅助碳源浓度。

氮源优化: 在发酵培养基中分别加入 3 g/L 有机氮源(蛋白胨、酵母粉、牛肉膏), 替换原培养基中的 (NH₄)₂SO₄, 其它方法同 1.6, 筛选最适氮源。

IPTG 浓度: 发酵过程中以 0.025、0.050、0.100、0.300、0.500 mmol/L 5 种不同的 IPTG 浓度诱导, 其它方法同 1.6, 筛选最适 IPTG 浓度。

1.8 分析方法

1.8.1 菌体生物量的测定: 大肠杆菌的生物量通过测定 600 nm 下的吸光度来表示。菌体浊度通过测定发酵液在 600 nm 处的吸光度值 OD_{600} 来衡量。将培养液或菌悬液用水稀释适当的倍数, 使 OD_{600} 值在 0.6–1.0 之间, 采用 Cary 50 UV-Vis 紫外可见分光光度计测定 600 nm 处的吸光度值 A_{600} 。菌体浊度 OD_{600} 为: $OD_{600}=A_{600}\times$ 稀释倍数。

1.8.2 P3HP 含量的测定: 摇瓶发酵 72 h 后, 离心收集菌体, 用无菌水和 95%的乙醇清洗菌体沉淀。冷冻干燥至恒重得到细胞干重(Cell dry weight, CDW), 用氯仿法萃取干菌体细胞内的 P3HP^[11]。在室温条件下, 称取一定量的冷干菌体, 加入 10 倍

菌体量的丙酮溶剂混合洗涤一次,蒸发干燥后,将干菌体包好置于索氏提取器中,加入 10 倍菌体量的氯仿,90 °C 萃取 4 h,萃取完毕后静置冷却,过滤,吸取上清液(氯仿相)得澄清 P3HP 溶液,使用旋转蒸发仪在 45 °C 将氯仿蒸出,蒸馏烧瓶底部的析出物即为提取纯化得到的聚合物,60 °C 干燥 12 h,完全除尽残留氯仿,利用核磁共振测定其单体聚合形式和含量。

1.8.3 1,3-PDO 含量的测定: 摇瓶发酵 72 h 后,离心收集上清液,液相色谱分析测定 1,3-PDO 含量。试验中所用高效液相色谱仪为 Agilent 1200 型高效液相色谱仪,检测器为 RID-10A 型折光示差检测器。色谱柱为 Bio-Rad 公司的 AminexHPX-87H 柱,操作条件为柱温 55 °C,流动相为 0.5 mmol/L 的 H₂SO₄,流速 0.5 mL/min。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

来源于肺炎克雷伯氏菌的 *dhaT* 基因编码 1,3-丙二醇氧化还原酶,可催化 3-羟基丙醛生成 1,3-PDO,同时消耗 NADH。本研究用 PCR 扩增了肺炎克雷伯氏菌基因组中的 *dhaT*,并克隆到质粒 pWQ02 中构建了重组质粒 pET21(A)。

重组质粒 pET21(A)的扩增鉴定如图 2 所示。*dhaT* 大小为 1.51 kb,扩增验证结果表明重组质粒 pET21(A)构建成功。

2.2 同源重组突变株的筛选

自杀载体是指能在一种宿主内复制但在另一宿主中却不能复制的质粒,当进入寄主细胞时,要么不能复制而被消除,要么被整合入染色体上,和染色体一起复制。利用自杀载体的这个特点,将构建的基因缺失或突变的 DNA 片段克隆入自杀载体,利用缺失基因两端的同源片段,定位自杀质粒的整合位点。通过接合法将构建的 DNA 导入受体菌。利用同源性 DNA 片段可发生重组的原理,构建精确基因缺失或突变菌株。本实验中使用的自杀质粒 pRE112 具有两个筛选标记:正筛选标记氯霉素抗性基因和负筛选标记蔗糖果聚糖酶

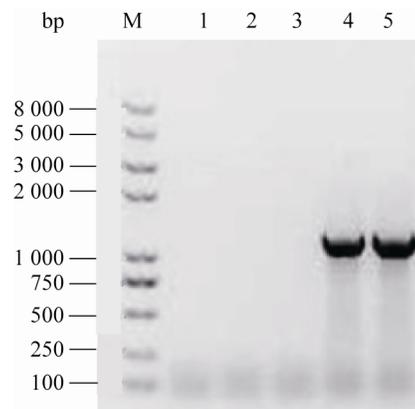


图 2 重组质粒 pET21(A) PCR 验证图谱
Figure 2 Identification of recombinant plasmid pET21(A) by PCR

注:所用引物为 ZG-440 和 ZG-141。M: DNA marker; 1-5: 选取的单克隆进行 PCR 验证。

Note: The primer of this reaction is ZG-440 and ZG-141. M: DNA marker; 1-5: PCR amplification of the monoclonal.

(Levansucrase) *sacB* 基因。

prpR 是大肠杆菌中与丙酸分解相关的基因,它的缺失既不会对整个细胞内的代谢反应产生影响,还能避免由于丙酸分解导致 P3HP 产量下降,因此我们选择 *prpR* 片段作为甘油脱水酶基因 *dhaB123* 及其辅助因子 *gdrAB* 的插入位点。利用 PCR 方法成功扩增出 *prpR* 基因上下游同源臂片段,在其中插入 *dhaB123* 和 *gdrAB* 基因,并连入 pRE112 自杀质粒载体成功构建了重组质粒 pRE112(B)。将质粒 pRE112(B)转化至 *E. coli* X7213 菌株中,与 *E. coli* BL21 接合,通过氯霉素抗性 LB 平板筛选一次重组菌。此时,发生了第一次重组的细菌染色体上携带有包含氯霉素抗性基因的 pRE112 整条序列,因而可在氯霉素平板上生长。只要得到抗性菌即为一次重组菌,PCR 验证一次重组菌(图 3)。

sacB 基因编码蔗糖果聚糖酶,该酶能催化蔗糖水解成葡萄糖和果糖,并且将果糖聚合成高分子量的果聚糖。但高分子量果聚糖积累对细胞存在潜在的毒性作用,可造成细胞死亡。一次重组菌含有 *sacB* 基因,在含有蔗糖的条件下无法稳定传代,

会逐渐重组丢失自杀性载体,因此选取蔗糖平板上生长而氯霉素平板未生长的菌做 PCR 验证。如图 4 所示,PCR 鉴定结果与预期相符,大小为 1.9 kb,表明二次重组成功。

2.3 同源重组突变株提高 P3HP 产量

微生物代谢甘油生成 1,3-PDO 的过程会消耗 NADH,因此在 P3HP 的合成途径中引入 1,3-PDO 的合成,可以平衡菌体内还原力。通过自杀性载体系统介导的同源重组技术,将甘油脱水酶及其激活因子的合成基因整合到大肠杆菌基因组中,能够有

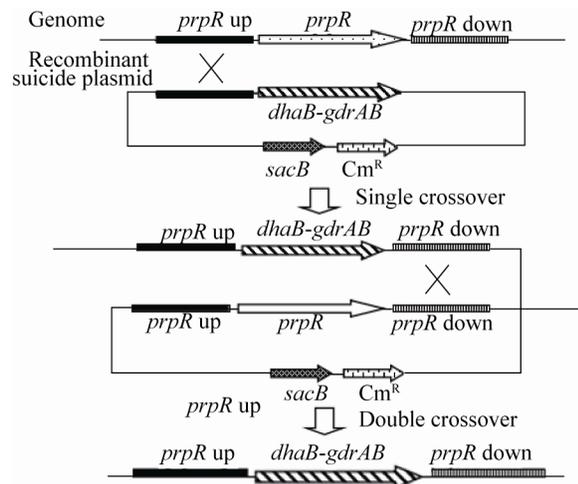


图 3 大肠杆菌 BL21 同源重组突变株的构建
Figure 3 Construction of recombination *E. coli* BL21 by homologous recombination

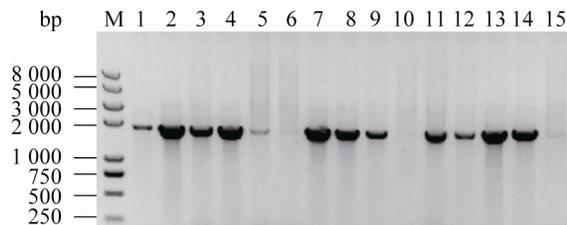


图 4 PCR 验证二次重组单克隆
Figure 4 Identification of homologous recombination mutant by PCR

注:所用引物为 ZG-143 和 ZG-272。M: DNA marker; 1-13: 选取的单克隆进行 PCR 验证。

Note: The primer of this reaction is ZG-143 and ZG-272. M: DNA marker; 1-13: PCR amplification of the monoclonal.

效地降低质粒的丢失率,保持质粒稳定性。为了确定共表达 *dhaT* 的同源重组突变株对 P3HP 产量有促进作用,作者以甘油为唯一碳源进行发酵,实验结果表明,含有 pWQ02 和 pWQ04 的 *E. coli* BL21(B)发酵后 P3HP 为 0.2 g/L,占细胞干重的 6.5%^[7];共表达 *dhaT* 基因的同源重组突变株发酵后 P3HP 为 0.8 g/L,占细胞干重的 14.6%,P3HP 产量为前者 4 倍,这一结果证实了作者之前的猜想。

2.4 发酵条件的优化

培养条件在目的产物的微生物法合成中发挥了重要作用,因此培养条件的优化是提高产品产量的一种有效方法。本实验中,为了提高 P3HP 的产量,采用单因素优化法分别对碳源、氮源及诱导剂 (IPTG) 浓度进行了优化。

2.4.1 碳源:培养基中的碳源在促进重组菌株生长以及产物积累中发挥了重要作用。在大肠杆菌以甘油为底物合成 1,3-PDO 的试验中,以葡萄糖为辅助碳源可以提高重组菌的生物量和 1,3-PDO 产量^[12]。为了确定碳源的添加量对 P3HP 产量的促进作用,在发酵过程中每隔 12 h 分别向培养基中补加 0.50、0.30、0.10 和 0.05 g/L 的葡萄糖。实验结果表明,适量的葡萄糖可促进 P3HP 的合成,当葡萄糖添加量为 0.05 g/L 时,P3HP 的产量为 2 g/L,同时获得 1.69 g/L 的 1,3-PDO,聚合物占细胞干重的 32%。而随着葡萄糖浓度的进一步增高,P3HP 和 1,3-PDO 的产量均有所下降,可能与葡萄糖浓度过高,抑制重组菌的生长有关(图 5)。

2.4.2 氮源:培养基中的氮源在提高目的产物的产量中发挥了重要作用。为了测试有机氮源的添加是否提高了 P3HP 的产量,我们分别用等量的有机氮源(蛋白胨、酵母粉、牛肉膏)替代原培养基中的无机氮源硫酸铵。与无机氮源相比,有机氮源的添加显著提高了 P3HP 和 1,3-PDO 的产量,其中蛋白胨对 P3HP 和 1,3-PDO 的促进都比较明显,如图 6 所示,氮源为蛋白胨时,P3HP 产量为 2.2 g/L,占细胞干重的 45%,1,3-PDO 产量为 2.5 g/L。

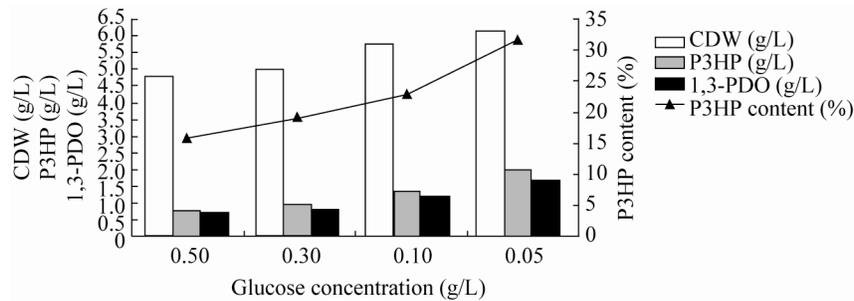


图 5 不同浓度葡萄糖对产量的影响

Figure 5 Effect of different glucose concentration on the P3HP production

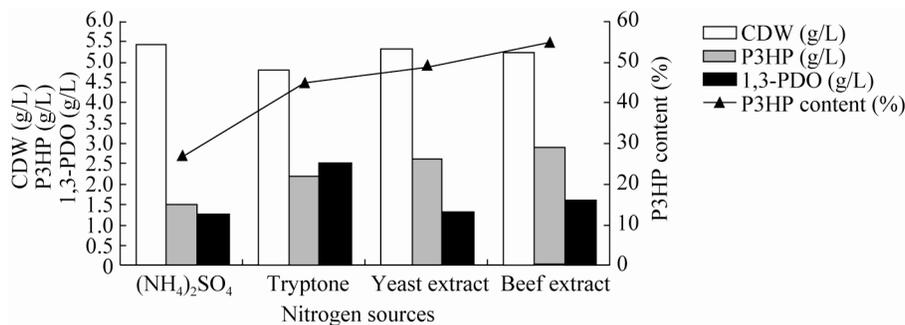


图 6 不同氮源对产量的影响

Figure 6 Effect of different nitrogen sources on the P3HP production

2.4.3 IPTG 浓度: 在工程菌株的发酵生产中,外源基因通过添加诱导剂(IPTG)诱导表达,因此,外源基因的表达水平仅受诱导剂(IPTG)浓度的调控。IPTG 浓度过低时,会影响合成基因的表达;浓度过高时,外源蛋白会在细胞内形成包涵体,影响酶活性。因此,选用合适的 IPTG 浓度,对产物的合成具有重要的影响。本研究选用了 0.025、0.050、0.100、0.300、0.500 mmol/L 5 个不同的 IPTG 浓度。如图 7 所示,

IPTG 浓度为 0.050 mol/L 时 P3HP 产量最高,为 2.7 g/L,占细胞干重的 49%,1,3-PDO 产量为 2.4 g/L。

通过以上优化,最终的发酵条件为:以 20 g/L 甘油和 3 g/L 葡萄糖为初始碳源,3 g/L 蛋白胨为氮源,发酵过程中每隔 12 h 补加 0.05 g/L 葡萄糖,并以 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导外源基因的表达。在此条件下,重组菌可同时生产 2.7 g/L P3HP 和 2.4 g/L 1,3-PDO。

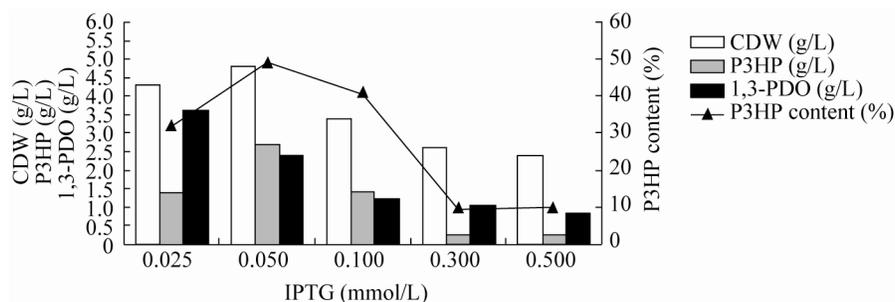


图 7 不同 IPTG 浓度对产量的影响

Figure 7 Effect of different IPTG concentration on the production

3 结论

以甘油为底物生物合成 P3HP 的代谢途径中, NAD⁺作为辅酶在催化 3-羟基丙醛生产 3HP 的同时会产生大量的 NADH。NADH 的升高所造成的重组菌体内氧化还原平衡失调是限制 P3HP 产量进一步提高的原因之一。微生物代谢甘油生成 1,3-PDO 的过程会消耗 NADH,因此在 P3HP 的合成途径中引入 1,3-PDO 的合成,可以平衡菌体内还原力。通过自杀性载体系统介导的同源重组技术,将甘油脱水酶及其激活因子的合成基因整合到大肠杆菌基因组中,能够有效的降低质粒的丢失率,保持质粒稳定性。经过发酵条件优化后,最终构建的工程菌可以获得 2.7 g/L 的 P3HP 和 2.4 g/L 的 1,3-PDO,相比之前报道的 1.54 g/L 的 P3HP 摇瓶产量^[7],有了近两倍的提高,且同时获得了 1,3-PDO。值得注意的是,以甘油为底物合成 P3HP 和 1,3-PDO 的过程中需要添加蛋白胨和 IPTG 两种昂贵的物质,这在实际的工业生产过程中会增加生产成本,不利于 P3HP 大规模生产,本文的研究结果只是为工业化生产提供一些理论依据。

参考文献

- [1] Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(2): 81-96.
- [2] Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry[J]. Chemical Society Reviews, 2009, 38(8): 2434-2446.

- [3] Green PR, Kemper J, Schechtman L, et al. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*[J]. Biomacromolecules, 2002, 3(1): 208-213.
- [4] Yamashita M, Takemoto Y, Ihara E, et al. Organolanthanide-initiated living polymerizations of ϵ -caprolactone, δ -valerolactone, and β -propiolactone[J]. Macromolecules, 1996, 29(5): 1798-1806.
- [5] Valentin HE, Mitsky TA, Mahadeo DA, et al. Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5253-5258.
- [6] Wang Q, Liu CS, Xian M, et al. Biosynthetic pathway for poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(4): 693-697.
- [7] Wang Q, Yang P, Liu CS, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol by recombinant *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 548-551.
- [8] 陈宏文, 聂金峰, 陈国, 等. 克雷伯杆菌甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的动力学机制[J]. 生物工程学报, 2010, 26(2): 177-182.
- [9] 肖硕, 洪华珠, 彭建新. 基因工程菌中重组质粒的稳定性研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 2(4): 9-12.
- [10] 董晓宇, 朱晓丽, 袁玉莲, 等. 响应面法优化生产 1,3-丙二醇的克雷伯氏菌突变体发酵条件[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(2): 10-18.
- [11] Koller M, Niebelschütz H, Braunnegg G. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass[J]. Engineering in Life Sciences, 2013, 13(6): 549-562.
- [12] 程可可, 凌宏志, 张丽莉, 等. 葡萄糖作辅助碳源对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油生产 1,3-丙二醇的影响[J]. 过程工程学报, 2004, 4(6): 561-566.