

温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 L-丙氨酸

周丽 邓璨 崔文璟 刘中美 周哲敏*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】L-丙氨酸的存在导致 *Escherichia coli* 的生长速率显著降低, 最终会降低发酵过程中 L-丙氨酸的体积合成速率。用温度调节基因开关($\lambda_{p_R-p_L}$)高效、动态调控重组 *E. coli* 菌株菌体生长与 L-丙氨酸合成过程, 使两者相协调。【方法】以野生型 *E. coli* B0016 为出发菌株, 敲除乙酸、甲酸、乙醇、琥珀酸、乳酸代谢产物合成途径以及丙氨酸消旋酶编码基因(*ackA-pta*、*pflB*、*adhE*、*frdA*、*ldhA*、*dadX*), 获得菌株 B0016-060B。将嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)来源的 L-丙氨酸脱氢酶基因(*alaD*)克隆于 p_L 启动子下游, 并在 B0016-060B 菌株中表达, 获得菌株 B0016-060B/pPL-*alaD*, 进行摇瓶和发酵罐发酵考察菌体生长和 L-丙氨酸发酵性能。【结果】竞争代谢途径的敲除显著降低了副产物合成量, 仅形成极少量的乙酸、琥珀酸和乙醇。28 °C 下菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 几乎不合成 L-丙氨酸, 可保证菌体快速生长; 而在 42 °C 下可高效合成 L-丙氨酸。经发酵罐发酵, 可合成 67.2 g/L L-丙氨酸, 体积生产强度达到 2.06 g/(L·h)。【结论】通过发酵培养温度的简单切换, 分阶段实现了细胞的快速增量和 L-丙氨酸的高强度合成。

关键词: L-丙氨酸, 基因开关, 大肠杆菌, 发酵, 代谢工程

L-alanine production in recombinant *Escherichia coli* with thermo-regulated genetic switch

ZHOU Li DENG Can CUI Wen-Jing LIU Zhong-Mei ZHOU Zhe-Min*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Specific growth rate of *Escherichia coli* could be significantly decreased by L-alanine, which would result in reduction in L-alanine volumetric productivity. Therefore, the $\lambda_{p_R-p_L}$ promoter was used as a thermo-controllable genetic switch to coordinate the processes of cell growth and L-alanine production in *E. coli*. [Methods] Synthetic routes for acetate, formate, ethanol, succinate and lactate as well as for L-alanine recemization were inactivated by deleting the corresponding genes (*ackA-pta*, *pflB*, *adhE*, *frdA*, *ldhA*, *dadX*) in the wild-type *E. coli* B0016 to generate B0016-060B. Subsequently, alanine dehydrogenase derived from *Geobacillus stearothermophilus* was cloned

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300087); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20130131); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. JUSRP1004)

*通讯作者: Tel: 86-510-85325210; 信箱: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-01-21; 接受日期: 2015-04-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-04

downstream of the p_L promoter and expressed in B0016-060B to produce B0016-060B/pPL-*alaD*. Shake-flask and bioreactor experiments were conducted to investigate the properties of cell growth and L-alanine fermentation. **[Results]** Deletions of the competing pathways significantly decreased by-products accumulation with formation of low levels of acetate, succinate and ethanol. Strain B0016-060B/pPL-*alaD* hardly produced L-alanine during cell growth phase at 28 °C, which facilitated high growth rate. Meanwhile, efficient L-alanine production was obtained when cultured at 42 °C under oxygen-limited conditions. In bioreactor experiment, strain B0016-060B/pPL-*alaD* produced 67.2 g/L L-alanine, with a productivity of 2.06 g/(L·h). **[Conclusion]** Efficient cell growth and L-alanine production were realized simply by switching the cultivation temperature.

Keywords: L-alanine, Genetic switch, *Escherichia coli*, Fermentation, Metabolic engineering

微生物作为细胞工厂, 已被应用于许多同源及异源代谢产物的生产, 包括发酵型产物(氨基酸、有机酸、有机醇)以及众多次级代谢产物的生产^[1-4]。然而, 其中多数代谢产物的过量合成会对细胞造成伤害, 抑制细胞的生长或者使代谢流失衡^[5-6]。例如, 提高培养基中 L-丙氨酸的浓度会显著抑制菌株的生长。因此, 希望在细胞生长至较高浓度后再可控地起始目的代谢产物的合成。将发酵过程分成独立的细胞生长阶段和产物合成阶段, 提高了发酵液中生物量, 从而获得了较高的体积生产强度^[7]。然而, 这种调控过程并不严密, 在菌体生长阶段仍可积累一定浓度的目的代谢产物, 与菌体生长竞争底物, 使得合成菌体的能力降低^[6-7]。因此, 需要通过基因工程手段对代谢流进行精确控制。 λ 噬菌体启动子 p_L 和 p_R ^[8] 能够通过改变培养温度快速、有效地开启或关闭重组蛋白的表达, 且调控严密, 基本无本底表达^[8-9], 显示了其作为代谢调控基因开关^[10]的潜在应用价值。在前期研究中, 用 p_L 和 p_R 启动子成功地对 D-乳酸发酵过程进行了开关控制, 而该方法在其他代谢产物合成中的应用至今未见报道。

L-丙氨酸是最小的手性分子之一, 被用于医药和兽药行业, 与其他 L-型氨基酸共同用作手术前和手术后的营养剂^[11]。由于 L-丙氨酸具有甜味, 也被用于食品添加剂^[12]。目前 L-丙氨酸是利用固定化 L-天冬氨酸- β -脱羧酶或者德阿昆哈假单胞菌 (*Pseudomonas dacunhae*) 的细胞菌悬液, 以 L-天冬氨酸为底物脱羧生产的^[13]。然而, 该生产过程成本

高, 其底物 L-天冬氨酸是由富马酸经天冬氨酸酶催化合成的, 而富马酸是经石油炼制生产的。随着石油资源的日渐短缺, 以石油基原料为前体进行 L-丙氨酸合成^[13]已不再符合市场发展趋势。利用可再生资源通过微生物发酵合成 L-丙氨酸受到了人们的关注^[11,14]。近年来, 利用基因工程手段, 将外源丙氨酸脱氢酶基因引入 *E. coli* 菌株, 在 *E. coli* 中实现了 L-丙氨酸的合成, 进一步通过代谢工程策略改造竞争代谢途径, 显著提高了 L-丙氨酸发酵合成水平和光学纯度^[12,15-16]。然而, 未见精细调节 L-丙氨酸发酵过程的报道。

本文以野生型 *E. coli* CICIM B0016 为出发菌株, 敲除副产物乙酸、甲酸、乙醇、琥珀酸、乳酸合成途径编码基因 *ackA-pta*、*pflB*、*adhE*、*frdA*、*ldhA*, 并敲除丙氨酸消旋酶编码基因 *dadX*; 进一步将来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的 L-丙氨酸脱氢酶编码基因 *alaD* 克隆在 p_L 和 p_R 启动子下游, 在上述重组菌中表达, 构建出可通过温度开关控制 L-丙氨酸合成的新型 *E. coli* 重组菌株。最后考察温度开关对该重组菌株 L-丙氨酸发酵过程的控制效果。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株、质粒和引物

菌株 *Geobacillus stearothermophilus* B0031 和 *Escherichia coli* CICIM B0016 由江南大学工业微生物资源和信息中心筛选和保藏 (<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn/>)。质粒 pKD46 (温度

敏感型, 含有阿拉伯糖启动子调控的 *gam*、*bet* 和 *exo* 基因, Amp^r、pKD13 (含有 FRT-Kan-FRT 突变盒, Kan^r)、pCP20 (温度敏感型, 含有 FLP 重组酶, Amp^r), 购于耶鲁大学基因保藏中心。pPL451 质粒由本中心保藏。所用菌株和质粒见表 1, 引物序列见表 2。

ExTaq DNA 聚合酶、Prime Star DNA 聚合酶、各种限制性内切酶和 T4 DNA 聚合酶, 宝生物工程(大连)公司; 质粒提取、纯化和胶回收试剂盒, 北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。

M9-1 液体培养基(g/L): Na₂HPO₄·12H₂O 15.1, KH₂PO₄ 3.0, NH₄Cl 1.0, NaCl 0.5, (NH₄)₂SO₄ 13.2, 补加 0.1% (体积比) 1 mol/L MgSO₄ 和 0.1% (体积比) 的微量元素母液。微量元素成分为(g/L): FeCl₃·6H₂O 2.4, CoCl₂·6H₂O 0.3, CuCl₂·2H₂O 0.15, ZnCl₂ 0.3, Na₂MoO₄·2H₂O 0.3, H₃BO₃ 0.075, MnCl₂·4H₂O 0.495。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株、质粒 Strains and plasmids	相应特征 Relevant characteristics	来源 Sources
菌株 Strains		
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> B0031	Wild type	CICIM-CU ^a
<i>Escherichia coli</i> strains		
B0016	Wild type	CICIM-CU ^a
B0016-010	B0016, Δ <i>ack-pta</i>	本研究构建
B0016-020	B0016, Δ <i>ack-pta</i> Δ <i>pf1B</i>	本研究构建
B0016-030	B0016, Δ <i>ack-pta</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i>	本研究构建
B0016-040	B0016, Δ <i>ack-pta</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>frdA</i>	本研究构建
B0016-050	B0016, Δ <i>ack-pta</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>frdA</i> Δ <i>ldhA</i>	本研究构建
B0016-060B	B0016, Δ <i>ack-pta</i> Δ <i>pf1B</i> Δ <i>adhE</i> Δ <i>frdA</i> Δ <i>ldhA</i> Δ <i>dadX</i>	本研究构建
B0016-060B/pPL- <i>alaD</i>	B0016-060B with pPL- <i>alaD</i> plasmid	本研究构建
质粒 Plasmids		
pKD46	Amp ^r , γ β <i>exo</i> (red recombinase), Temperature-conditional replicon	CGSC ^b ; [17]
pKD13	Amp ^r , Kan ^r , FRT-Kan-FRT cassette	CGSC ^b ; [17]
pCP20	Amp ^r , FLP, Temperature-conditional replicon	CGSC ^b ; [17]
pPL451	Amp ^r , λ cl ^{ts} 857, p _R p _L promoter	CICIM-CU ^a ; [8]
pPL- <i>alaD</i>	Amp ^r , <i>alaD</i>	本研究构建

注: ^a: 江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心; ^b: 耶鲁大学基因保藏中心。

Note: ^a: The Culture and Information Center of Industrial Microorganisms of China Universities, Jiangnan University; ^b: Genetic Stock Center, Yale University.

表 2 本研究中所使用的引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
AckA-pKD13F	TGGCTCCCTGACGTTTTTTTAGCCACGTATCAATTATAGGTACTTCCATG gtgtaggctggagctgcttc	
Pta-pKD13R	GCAGCGCAAAGCTGCGGATGATGACGAGATTACTGCTGCTGTGCAGACTG attccgggatccgctgacc	
YackAF	CAGGTATCCTTTAGCAGCCTGAAGG	
PflB-pKD13F	TTTTACTGTACGATTCAGTCAAATCTAATTACATAGATTGAGTGAAGGT gtgtaggctggagctgcttc ^a	
PflB-pKD13R	CGAAGTACGCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACATG attccgggatccgctgacc	
YpflBF	GAGTGAATGCGACCAATAACTGACATT	
YpflBR	CATACTGGGTCATTTACCTGCGTG	
AdhE-pKD13F	CCGTTTATGTTGCCAGACAGCGCTACTGATTAAGCGGATTTTTTCGCTTT gtgtaggctggagctgcttc	
AdhE-pKD13R	CGAGCAGATGATTTACTAAAAAAGTTTAAACATTATCAGGAGAGCATTATG attccgggatccgctgacc	
YadhER	ATCACAGTGAGTGTGAGCGCG	
FrdA-pKD13F	GCACCACCTCAATTTTCAGGTTTTTCATCTCAGCCATTCGCCTTCTCCTT gtgtaggctggagctgcttc	
FrdA-pKD13R	ACCCTGAAGTACGTGGCTGTGGGATAAAAAACAATCTGGAGGAATGTCGTG attccgggatccgctgacc	
YfrdAF	TAAGGCACTTCATAGAATGCGCTATGC	
YfrdAR	ATCATCTTCAGTGATAATTTAGCCCTCTTG	
LdhA-pKD13F	CTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGATTAAACCAGTTCGTTCCGGGCA gtgtaggctggagctgcttc	
LdhA-pKD13R	TATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAAGTCTTATG attccgggatccgctgacc	
YldhAR	AGCATGGGTAGTTAATATCCTGATTTAGCG	
DadX-pKD13F	CATCACGTCCGGGCCATTTACATGGCGCACACAGCTAAGGAAACGAGATG gtgtaggctggagctgcttc	
DadX-pKD13R	ACGTTGCTCCGATCCGGCTTACAACAAGTTACACCGTCACAACCGGGAC attccgggatccgctgacc	
YdadXF	GTTTTAATACCGAGCTGTTGCAACCG	
YdadXR	ACATTAACAACACTACAGTTGCTGACCAGCC	
AlaDF-BamH I	TTTGATCCTAAGGAGGTTAACTATGAAGATCGGCATTCCAAAAGAAATC	BamH I
AlaDR-EcoR I	TTTGAATTCGGATCTTCCAGAGATTGAAGGAGTTGATC	EcoR I

1.3 基因敲除方法

用 Datsenko 等^[17]报道的基因敲除方法依次敲除 B0016 菌株染色体上的 *ackA-pta*、*pflB*、*adhE*、*frdA*、*ldhA* 和 *dadX* 基因。其具体过程为: 以 pKD13 质粒为模板, 分别用引物对 AckA-pKD13F/Pta-pKD13R、PflB-pKD13F/PflB-pKD13R、AdhE-pKD13F/AdhE-pKD13R、FrdA-pKD13F/FrdA-pKD13R、LdhA-pKD13F/LdhA-pKD13R 和 DadX-pKD13F/DadX-pKD13R 进行 PCR 扩增, 获得两端各具有 50 bp 同源臂序列、中部为 FRT-Kan-FRT 的突变盒片段。借助质粒 pKD46 上的 Red 重组系统将突变盒整合于待突变菌株的染色体上, 并用相应的验证引物对 (YackAF/Pta-pKD13R, YpflBF/YpflBR, AdhE-pKD13F/YadhER, YfrdAF/YfrdAR, LdhA-pKD13F/YldhAR, YdadXF/YdadXR) 进行菌落 PCR 验证, 最后用 pCP20 质粒去除重组菌中的卡那抗性基因, 并进一步用相应验证引物进行验证。

1.4 发酵方法

1.4.1 摇瓶发酵方法: 将保藏于 -80°C 甘油保藏管的菌株划线于 LB 平板上培养 24 h, 将单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中, 28°C 、200 r/min 培养 10 h。8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 M9-1 培养基重悬, 以 0.02 g/L (菌体干重/培养基体积) 的接种量接种于 50 mL 含有 5 g/L 葡萄糖的 M9-1 液体培养基中(250 mL 三角瓶中), 进行好氧-限氧两阶段发酵培养。好氧菌体生长阶段以 28°C 、200 r/min 培养至细胞干重(DCW)达到 1.37 g/L, 限氧发酵阶段添加 1.5 mL 500 g/L 葡萄糖和 2 g CaCO_3 , 于 28°C 或 42°C 静置培养, 直至发酵液中葡萄糖被耗尽, 或两阶段共经 54 h 结束发酵。每组进行 3 个平行实验。上述培养过程中都添加终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素。

1.4.2 发酵罐发酵方法: 种子液培养方法: 菌体在 LB 平板及 LB 液体培养基中的培养方法同摇瓶发酵培养方法。8 000 r/min 离心 5 min, 收集 LB 液体培

养基中获得的菌体, 并以 0.1 g/L (菌体干重/培养基体积) 的接种量接种于 150 mL 含有 5 g/L 葡萄糖、100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 M9-1 液体培养基中 (500 mL 三角瓶中), 33°C 、200 r/min 摇床培养 9 h。

发酵罐接种方式: 将种子液以 0.062 g/L (菌体干重/培养基体积) 的接种量接种于含有 M9-1 培养基 (不添加氨苄青霉素) 的 5 L 发酵罐 (Winpact FS-02, Major Science, Saratoga, CA, USA), 接种后发酵液初始体积为 3 L, 葡萄糖初始浓度为 30 g/L。

好氧阶段培养方法: 好氧菌体生长阶段, 初始空气通量为 3 L/min, 搅拌桨转速为 200 r/min, 此时的溶解氧浓度设定为 100%, 菌体生长过程中调节空气流量直至 7 L/min, 同时将搅拌转速与 DO 值关联来控制溶解氧浓度始终大于 30%; 使用 NH_4OH 和 10% (体积比) H_2SO_4 维持 pH 7.0; 发酵温度控制在 33°C 。当菌体浓度达到 OD_{600} 为 20 时, 将发酵罐温度设定为 42°C 继续好氧培养 45 min, 再进入限氧发酵产酸阶段。

限氧阶段培养方法: 第二阶段, 空气流量调为 0, 搅拌桨转速控制为 100 r/min, 添加 NH_4OH 来维持 pH 为 7.0, 发酵温度为 42°C , 并补加两次浓度为 600 g/L 的葡萄糖, 每次补加 200 mL, 以维持发酵过程中发酵液残糖浓度高于 10 g/L, 当所有补加的葡萄糖消耗后即结束发酵。发酵罐发酵进行两次平行实验。

1.5 分析方法

1.5.1 菌体量测定方法: 菌体密度采用浊度法间接测量, 通过 OD_{600} 来表示, 并通过下列公式换算为菌体干重。

菌体干重(DCW)和 OD_{600} 的关系:

$$1 OD_{600} = 0.38 \text{ g/L DCW}.$$

1.5.2 葡萄糖测定方法: 葡萄糖用 SBA-40E 葡萄糖生物传感仪 (山东省科学院生物研究所) 进行分析。

1.5.3 进行高压液相分析的发酵液样品预处理方法: 有机酸测定样品预处理方法: 发酵过程中如果添加了 CaCO_3 , 发酵液样品用 5% (体积比) 浓硫酸酸化, 释放由 CaCO_3 中和的酸类代谢产物, 离心去

除 CaSO_4 沉淀后经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后进行高压液相检测。

氨基酸测定样品预处理方法: 用 NH_4OH 调节样品 pH 至 8.0, 适当稀释后再用苯基异硫酸酯(PITC)进行衍生。衍生步骤为: $500 \mu\text{L}$ 样品中加入 $250 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L PITC 乙腈溶液和 $250 \mu\text{L}$ 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液, 充分混匀, 避光室温放置 1 h, 加入 $500 \mu\text{L}$ 正己烷溶液, 涡旋振荡器振荡 1 min, 静置 60 min, 吸取下层溶液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 有机滤膜过滤后进行高压液相检测^[18]。

1.5.4 有机酸测定方法: 有机酸含量用高压液相色谱进行分析, 检测器为 UV (210 nm) 检测器, 色谱柱为 Prevail Organic Acid 5u (Grace Davison Discovery Sciences), 流动相为 25 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.5), 流速为 1 mL/min , 柱温为室温。

1.5.5 氨基酸测定方法: 色谱柱为 AccQ-Tag $3.9 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ (Waters)。流动相 A 液为 80% (体积比) 乙腈水溶液, B 液为 97:3 (体积比) 的 0.1 mol/L 乙酸钠-乙腈溶液。采用梯度洗脱: 0–20 min, B 液由 95% 下降到 80%; 20–30 min, B 液由 80% 上升到 95%; 30–40 min, B 液梯度不变。检测波长为 254 nm , 柱温为室温。

1.5.6 乙醇测定方法: 乙醇含量用 SBA-40E 葡萄糖生物传感仪(山东省科学院生物研究所)进行分析。

1.5.7 数据分析方法:

$$\text{平均比生长速率}(\mu) = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{t_2 - t_1};$$

$$\text{转化率} = \frac{P_2 - P_1}{G_2 - G_1} \times 100\%;$$

$$\text{体积生产强度} = \frac{P_2 - P_1}{V \times (t_2 - t_1)}。$$

其中: X (g/L) 为菌体浓度, t (h) 为时间, P (g) 为产物量, G (g) 为葡萄糖量, V (L) 为发酵结束时发酵液体积。

2 结果与分析

2.1 *E. coli* B0016-060B 重组菌株的构建

用 Datsenko 等^[17]报道的基因敲除方法, 在菌株

E. coli B0016 中依次叠加敲除 *ackA-pta*、*pflB*、*adhE*、*frdA*、*ldhA* 和 *dadX* 基因, 依次获得了 B0016-010、B0016-020、B0016-030、B0016-040、B0016-050 和 B0016-060B 菌株(表 1)。用验证引物对上述突变进行验证, 结果如图 1 所示, 均获得了大小 $0.3\text{--}0.5 \text{ kb}$ 左右的条带, 表明上述基因已成功删除。

2.2 *alaD* 基因的克隆及 *E. coli* B0016-060B/pPL-*alaD* 重组菌株的构建

根据 GenBank EF154460.1 报道的 *alaD* 基因序列设计引物 AlaDF-BamH I 和 AlaDR-EcoR I, 并以 *G. stearothermophilus* B0031 菌株染色体为模板, 进行 PCR 扩增, 获得了 *alaD* 基因及其部分下游基因序列, 其大小约为 1.2 kb 。经 DNA 测序并用 BLAST 软件进行 DNA 序列比对, 表明 *G. stearothermophilus* B0031 来源的 *alaD* 其结构基因部分(1119 bp)与已报道的同菌种来源的 *alaD* 基因

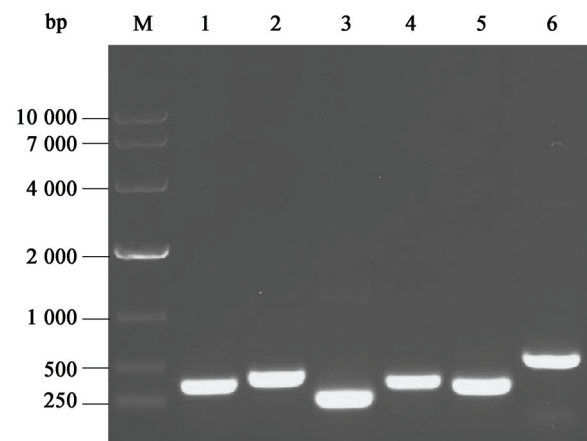


图 1 *E. coli* B0016-060B 突变基因的 PCR 鉴定电泳图谱
Figure 1 PCR identification of gene mutations in *E. coli* B0016-060B

注: M: DL10000 marker; 1: 用 YackAF 和 Pta-pKD13R 引物 PCR; 2: 用 YpflBF 和 YpflBR 引物 PCR; 3: 用 AdhE-pKD13F 和 YadhER 引物 PCR; 4: 用 YfrdAF 和 YfrdAR 引物 PCR; 5: 用 LdhA-pKD13F 和 YldhAR 引物 PCR; 6: 用 YdadXF 和 YdadXR 引物 PCR。

Note: M: DL10000 marker; 1: PCR with YackAF and Pta-pKD13R primers; 2: PCR with YpflBF and YpflBR primers; 3: PCR with AdhE-pKD13F and YadhER primers; 4: PCR with YfrdAF and YfrdAR primers; 5: PCR with LdhA-pKD13F and YldhAR primers; 6: PCR with YdadXF and YdadXR primers.

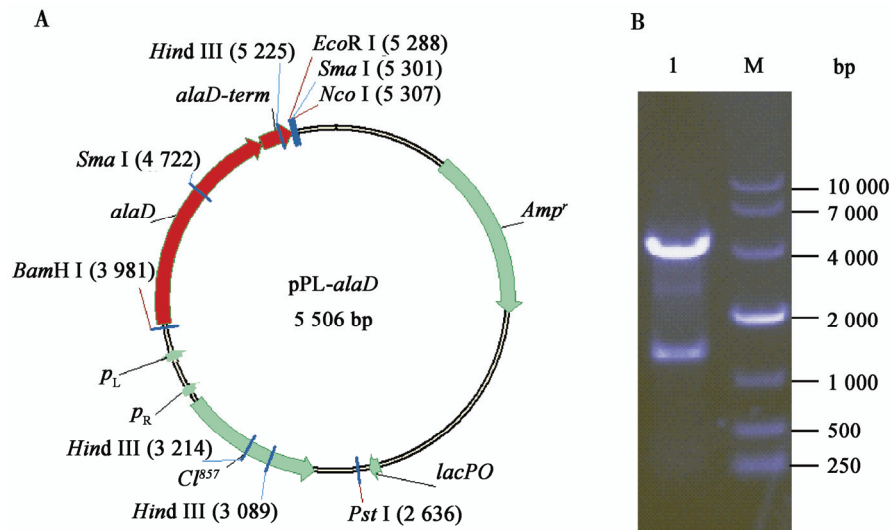


图2 pPL-*alaD* 质粒物理图谱(A)及酶切验证图谱(B)

Figure 2 Map of recombinant vector pPL-*alaD* (A) and restriction pattern of pPL-*alaD* (B)

注: 1: *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pPL-*alaD*; M: DL10 000 marker.

Note: 1: pPL-*alaD*/*Bam*H I, *Eco*R I; M: DL10 000 marker.

(GenBank 登录号: M33299.1)^[19]最高相似性达到 98%, 有 24 个碱基位点不同。用 BLAST 软件进行氨基酸序列比对, 表明与同菌种来源的丙氨酸脱氢酶(NCBI 登录号: WP_033014465)最高相似性为 99%, 其中本文获得的 ALD 的 224 位为苏氨酸, 而文献报道的该位点多为异亮氨酸。

将克隆到的 *alaD* 基因片段用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 克隆于 pPL451 质粒载体的相同酶切位点, 获得重组质粒 pPL-*alaD*, 其物理图谱如图 2A 所示。重组质粒 pPL-*alaD* 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 电泳获得了 4.2 kb 和 1.2 kb 两条带(图 2B), 表明质粒构建正确。将 pPL-*alaD* 质粒转化菌株 B0016-060B, 获得 B0016-060B/pPL-*alaD* 重组菌株, 进一步进行发酵实验检测其 L-丙氨酸合成性能。

2.3 L-丙氨酸浓度对菌体生长的影响

菌株 B0016-060B 不具有发酵型丙氨酸脱氢酶(ALD), 发酵液中不积累 L-丙氨酸, 因此以该菌株为研究对象, 在其培养基中分别添加终浓度为 0、1、10、20、30 g/L 的 L-丙氨酸, 考察 L-丙氨酸对菌体生长的影响。结果如表 3 所示, 添加终浓度为 1 g/L 的 L-丙氨酸使得菌体比生长速率显著降低, 随着

L-丙氨酸添加浓度的增加, 菌体生长速率大幅度降低, 表明 L-丙氨酸对菌体生长存在抑制作用。

因此, L-丙氨酸发酵生产过程中, 在菌体生长阶段应限制 L-丙氨酸的合成量, 以减少其对菌体生长的抑制作用; 而当菌体浓度达到一定值时, 再高水平表达 L-丙氨酸脱氢酶, 可促进 L-丙氨酸的快速合成。

2.4 B0016-060B/pPL-*alaD* 菌株丙氨酸发酵特征

野生型菌株 B0016、重组菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 及对对照菌株 B0016-060B 进行摇瓶发酵培

表 3 不同 L-丙氨酸添加浓度下 B0016-060B 菌株的比生长速率

Table 3 Specific growth rate of B0016-060B under different concentrations of L-alanine

L-丙氨酸添加量 L-alanine addition (g/L)	比生长速率 Specific growth rate μ (h^{-1})
0	0.47±0.01
1	0.40±0.00
10	0.11±0.00
20	0.08±0.00
30	0.06±0.00

养,测定发酵液中 L-丙氨酸和有机酸合成量,结果如表 4 所示。

野生菌株 B0016 在 M9-1 培养基中进行好氧-限氧两阶段发酵培养,主要代谢产物为乳酸、乙酸、琥珀酸、甲酸和乙醇,其合成量与野生型菌株 B0013 相仿^[7],L-丙氨酸含量极低(小于 0.05 g/L)。将竞争代谢途径删除后,重组菌株 B0016-060B 中上述副产物的合成量都大幅度降低,而由于丙酮酸的分解代谢途径被阻断,丙酮酸积累量增加,同时还还原型辅酶利用途径的删除也导致糖酵解途径产生的 NADH 不能被氧化再生,使得限氧阶段糖消耗速率降低。

菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 在 28 °C 下进行两阶段培养,几乎不能诱导 p_{R-pL} 启动子起始表达,发酵过程中仅检测出少量的 L-丙氨酸(0.26 g/L)。而在 42 °C 下进行限氧发酵,菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 利用葡萄糖合成 11 g/L L-丙氨酸,其得率达到 70.3 g 丙氨酸/100 g 葡萄糖,生产强度达到 0.2 g/(L·h)。上述结果表明通过控制温度调节 p_{R-pL} 启动子的活性,在 28 °C 下可有效关闭 L-丙氨酸的合成,避免 L-丙氨酸的积累对菌体生长产生抑制作用;而在 42 °C 下可高效开启 L-丙氨酸的合成,实

现了重组大肠杆菌 L-丙氨酸合成的开关控制。

前期研究中,用 p_L 启动子成功调控了 D-乳酸发酵过程,并优化了开关控制的培养条件(33 °C 生长菌体,42 °C 诱导及限氧发酵)。本文利用该最佳培养条件,在 5 L 发酵罐中,考察菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 进行 L-丙氨酸的发酵效果。发酵过程中 L-丙氨酸和菌体浓度如图 3 所示。在菌体生长阶段控制较低温度,使得 L-丙氨酸的合成量可控制在极低的水平,保证了菌体快速生长。经 42 °C 诱导,L-丙氨酸开始快速合成,并且在限氧条件下糖酵解途径可与 L-丙氨酸合成途径耦合,实现还原力的循环,促进了 L-丙氨酸的快速合成。最终发酵液中,L-丙氨酸产量达 67.2 g/L,体积生产强度达到 2.06 g/(L·h)。限氧发酵阶段 L-丙氨酸转化率可达 87.2 g/100 g 葡萄糖,整个发酵阶段 L-丙氨酸转化率也可达到 67.1 g/100 g 葡萄糖。发酵液中主要副产物是乙酸(5.8 g/L),其他副产物含量都低于 0.2 g/L。

3 结论

野生型 *E. coli* B0016 菌株经好氧-限氧两阶段发酵,产生大量的乳酸、乙酸、甲酸、乙醇、琥珀酸等代谢产物(表 4)。将这些代谢产物合成途径编码

表 4 L-丙氨酸发酵性能的比较
Table 4 Comparison of alanine fermentation

菌株 Strain	丙氨酸 Alanine		转化率 Yield for indicated agent (g/100 g glucose) ^f						
	生产强度 Productivity (g/L·h) ^d	限氧阶段转化率 Oxygen-limited yield (g/100 g glucose) ^e	丙氨酸 Alanine	乳酸 Lactate	乙酸 Acetate	琥珀酸 Succinate	甲酸 Formate	丙酮酸 Pyruvate	乙醇 Ethanol
B0016 ^a	0.00±0.00	0.1±0.0	0.1±0.0	42.5±1.8	17.3±0.9	15.1±0.5	9.2±0.7	1.4±0.1	5.9±0.9
B0016-060B ^{a,b}	0.00±0.00	0.5±0.0	0.4±0.0	0.0±0.0	3.9±0.4	8.2±0.5	0.0±0.0	23.8±1.2	0.7±0.0
B0016-060B/pPL- <i>alaD</i> ^{b,c}	0.00±0.00	2.0±0.4	2.1±0.1	0.0±0.0	9.2±0.5	2.0±0.2	0.0±0.0	15.0±0.6	0.1±0.0
B0016-060B/pPL- <i>alaD</i> ^a	0.20±0.00	70.3±3.9	59.4±3.1	0.0±0.0	5.6±0.1	1.5±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0

注: ^a: 菌体生长阶段在 28 °C 进行,限氧发酵阶段在 42 °C 进行; ^b: 底物葡萄糖未消耗完; ^c: 整个发酵过程在 28 °C 进行; ^d: 限氧阶段的平均生产强度; ^e: 限氧阶段的平均转化率; ^f: 整个发酵阶段的平均转化率。

Note: ^a: Cells were cultured in shake flasks at 28 °C during growth phase and at 42 °C during oxygen-limited phase; ^b: Incomplete utilization of glucose substrate; ^c: Cells were cultured in shake flasks at 28 °C during the entire fermentation process; ^d: Average productivity during the oxygen-limited phase; ^e: Average alanine yield during the oxygen-limited phase; ^f: Average yield during the overall fermentation phase.

基因敲除获得菌株 B0016-060B, 显著降低了这些产物的积累量(表 4), 其残余量与前期研究结果相仿^[7]。此外, DadX 是 *E. coli* 中主要的丙氨酸消旋酶^[20], 将该基因敲除, 减少 L-丙氨酸向 D-丙氨酸的转化, 可获得高光学纯度的 L-丙氨酸^[16]。Zhang 等^[16]通过敲除 *mgsA* 基因提高菌体生长速率并去除了残余的乳酸副产物。可能是由于出发菌株之间的差异, 使得本文在没有敲除 *mgsA* 基因的情况下, 仍可达到较高的菌体生长速率(图 3), 且发酵液中乳酸副产物含量极低。

Zhang 等^[16]将来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 的 *alaD* 基因整合于重组 *E. coli* SZ194 染色体上, 经驯化后, 最终菌株 XZ132 (*pflB frd adhE ackA mgsA dadX ldhA::alaD*) 经 48 h 可利用无机盐培养基以及 120 g/L 葡萄糖合成 1 279 mmol/L

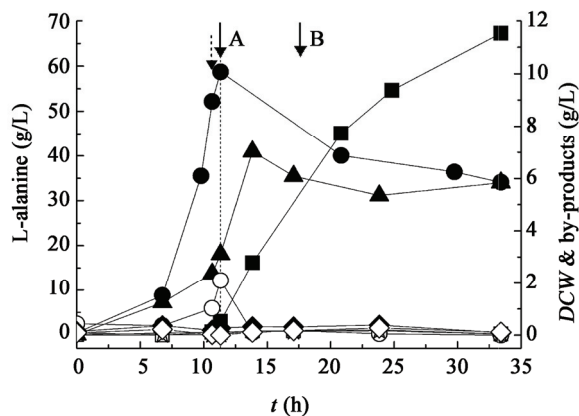


图 3 菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 丙氨酸发酵过程

Figure 3 Representative experiment of alanine fermentation by *E. coli* B0016-060B/pPL-*alaD*

注: ■: 丙氨酸; ●: 细胞干重(DCW); ▲: 乙酸; ○: 丙酮酸; ◆: 乳酸; ◇: 琥珀酸; □: 甲酸; ☆: 乙醇。虚线箭头表示培养温度由 33 °C 转为 42 °C。虚线表示发酵由好氧培养阶段转为限氧培养阶段。箭头表示向发酵罐中添加 120 g (A) 和 120 g (B) 葡萄糖。

Note: ■: Alanine; ●: Dry cell mass (DCW); ▲: Acetate; ○: Pyruvate; ◆: Lactate; ◇: Succinate; □: Formate; ☆: Ethanol. The dotted arrow shows the time when the culture was shifted from 33 °C to 42 °C. The dotted line indicates the time when the culture was shifted from the aerobic cultivation to the oxygen-limited production phase. Additions of glucose of 120 g (A) and 120 g (B) were made to the bioreactor as indicated by arrows.

丙氨酸, 丙氨酸转化率达到 95 g/100 g 葡萄糖, L-丙氨酸光学纯度达到 99.5%, 是目前利用重组 *E. coli* 菌株进行 L-丙氨酸合成的最高产量。基于上述成功例子, 且考虑到来源于嗜热菌 *G. stearothermophilus* 的 ALD 具有较好的热稳定性^[16], 所构建的重组菌株在较高温度培养时对该酶活性影响会较小, 本文克隆了该来源的 ALD 在重组 *E. coli* 中进行 L-丙氨酸合成。所获得的 *alaD* 基因与 Zhang 等^[16]报道的 (GenBank 登录号: EF154460.1) 相比, 有 39 个位点碱基不同, 存在 8 个位点氨基酸序列的差异, 这可能使两个酶的催化性能有所差别, 导致两个发酵过程也产生差别。然而, 发酵实验表明该 ALD 酶同样可进行 L-丙氨酸的高效合成。

Zhang 等^[16]用乳酸脱氢酶基因(*ldhA*)的启动子控制 ALD 的表达, 该启动子受生长调节, 可在厌氧条件下高效表达。然而, 前期乳酸发酵过程研究中, 发现 P_{ldhA} 启动子对于基因表达的调控并不严格。例如, 乳酸发酵重组菌株 B0013-070 (*ackA pta pps pflB dld poxB adhE frdA*) 好氧阶段仍可合成 7 g/L 乳酸, 与菌体生长竞争丙酮酸, 抑制了菌体的生长^[7]。因此, 用 P_{ldhA} 启动子调控丙氨酸发酵过程, 同样可能导致菌体生长阶段丙氨酸积累而抑制菌体生长。Lee 及 Smith 等在 *E. coli* 菌株中用 *trc* 启动子调控 *alaD* 基因(来源于 *Bacillus sphaericus*) 的表达^[12,15], 但需添加 IPTG 进行诱导, 其价格昂贵, 不适于工业应用。本文选用 p_L-p_R 启动子对 ALD 的表达进行开关调控, 相对于基因工程中一些常用的启动子, 该启动子为严谨型启动子, 在低温下无本底表达, 且仅通过调节温度就可以实现有效调控, 不需要添加一些昂贵的化合物进行诱导; 另外, 由于 pPL451 质粒在无抗生素选择压力时仍可较稳定存在^[18], 故在发酵罐发酵试验时未加抗生素, 更符合实际生产过程, 具有更好的应用前景。通过控制温度, 可在菌体生长阶段严格关闭菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* L-丙氨酸的合成水平, 避免产物对菌体生长的抑制和竞争作用。同时, 在产物

合成阶段可开启 L-丙氨酸的快速合成。重组菌株 B0016-060B/pPL-*alaD* 经发酵罐发酵,可产生 67.2 g/L L-丙氨酸,其体积生产强度达到 2.06 g/(L·h),显示出较好的生产潜力。进一步对该菌株的开关控制发酵条件进行优化,提高其 L-丙氨酸生产性能,以及将 *p_L-alaD* 基因整合于染色体上进行稳定表达的研究结果将在后续文章中报道。

参 考 文 献

- [1] Kern A, Tilley E, Hunter IS, et al. Engineering primary metabolic pathways of industrial micro-organisms[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129(1): 6-29
- [2] Krärner R. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 45(1): 1-21
- [3] Mijts BN, Schmidt-Dannert C. Engineering of secondary metabolite pathways[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(6): 597-602
- [4] Jones BB, Chan H, Rothstein S, et al. RNA polymerase binding sites in *λplac5* DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(11): 4914-4918
- [5] Bunch PK, Mat-Jan F, Lee N, et al. The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 1997, 143(1): 187-195
- [6] Zhou L, Niu DD, Tian KM, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 560-568
- [7] Zhou L, Zuo ZR, Chen XZ, et al. Evaluation of genetic manipulation strategies on D-lactate production by *Escherichia coli*[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 981-989
- [8] Love CA, Lilley PE, Dixon NE. Stable high-copy-number bacteriophage[*λ*] promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1996, 176(1/2): 49-53
- [9] Elvin CM, Thompson PR, Argall ME, et al. Modified bacteriophage *λ* promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1990, 87(1): 123-126
- [10] Ptashne M. A Genetic Switch: Phage *λ* and Higher Organisms[M]. Cambridge: Cell Press, 1992: 11
- [11] Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, et al. Conversion of *actococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(6): 588-592
- [12] Lee M, Smith G, Eiteman M, et al. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli aceF ldhA* mutants expressing the *Bacillus sphaericus alaD* gene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(1): 56-60
- [13] Shibata T, Kakimoto T, Chibata I. Stimulation of L-aspartate beta-decarboxylase formation by L-glutamate in *Pseudomonas dacunhae* and improved production of L-alanine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(3): 359-364
- [14] Uhlenbusch I, Sahn H, Sprenger GA. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(5): 1360-1366
- [15] Smith GM, Lee SA, Reilly KC, et al. Fed-batch two-phase production of alanine by a metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(20): 1695-1700
- [16] Zhang XL, Jantama K, Moore JC, et al. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 355-366
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [18] Yang Y, Qin Q, Guo WZ. Separation and quantitative analysis of amino acids derivatized with phenyl isothiocyanate by high performance liquid chromatography (HPLC)[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 1994, 12(4): 295-296 (in Chinese) 杨扬, 秦强, 郭伟忠. 苯基异硫氰酸酯衍生氨基酸的高效液相色谱分析[J]. *色谱*, 1994, 12(4): 295-296
- [19] Kuroda S, Tanizawa K, Tanaka H, et al. Alanine dehydrogenases from two *Bacillus* species with distinct thermostabilities: molecular cloning, DNA and protein sequence determination, and structural comparison with other NAD(P)⁺-dependent dehydrogenases[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(4): 1009-1015
- [20] Wild J, Hennig J, Lobočka M, et al. Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12[J]. *Molecular and General Genetics*, 1985, 198(2): 315-322