利用重组大肠杆菌发酵甘油合成 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：本文探究以甘油为唯一碳源发酵合成 L-丙氨酸的可行性。以删除了乙酸、甲酸、乙醇、琥珀酸、乳酸代谢产物合成途径的 *Escherichia coli* B0016-050 为出发菌株，用 λp_L 启动子及其调控下的嗜热脂肪芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）来源的丙氨酸脱氢酶基因（*alaD*）替换 B0016-050 菌株染色体上丙氨酸消旋酶基因（*dadX*），获得温度控制型 L-丙氨酸合成菌株 B0016-060BC。菌株 B0016-060BC 以甘油为唯一碳源进行两阶段发酵（包括菌体生长阶段和 L-丙氨酸合成阶段），表明在菌体生长至对数后期起始 L-丙氨酸合成或者提高 L-丙氨酸发酵阶段的通气量可提高 L-丙氨酸合成水平。进一步经 5 L 发酵罐发酵，可合成 63.64 g/L L-丙氨酸，整个发酵阶段体积生产强度达到 1.91 g/L h、转化率达到 62.89 g/100 g 甘油，仅合成少量的乙酸（1.73 g/L）等副产物。实现了以甘油为唯一碳源高效合成 L-丙氨酸，为工业应用提供了重要参考。

关键词：L-丙氨酸；甘油；大肠杆菌；发酵；代谢工程；基因开关

文章篇号：1673-9078(2016)6-163-169 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.026

L-Alanine Production through Glycerol Fermentation by Recombinant *Escherichia coli*

ZHOU Li, DENG Can, CUI Wen-jing, LIU Zhong-mei, ZHOU Zhe-min

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

Abstract: The feasibility of L-alanine fermentation using glycerol as a sole carbon source was investigated. The recombinant strain *Escherichia coli* B0016-050 with deletions of acetate, formate, ethanol, succinate, and lactate synthesis routes served as the parent strain. The λp_L promoter and L-alanine dehydrogenase (derived from *Geobacillus stearothermophilus*) controlled by the λp_L promoter were used to replace the *dadX* gene (encoding L-alanine racemase) on the chromosome of strain B0016-050 to generate the thermoregulated L-alanine fermentation strain B0016-060BC. The fermentation by strain B0016-060BC was a two-phase process (consisting of a cell growth phase and an L-alanine synthesis phase) with glycerol as the sole carbon source, indicating that L-alanine production in strain B0016-060BC could be improved by initiating the production in the late exponential growth phase or by increasing air supplementation in the fermentation stage. Fermentation in a 5-L bioreactor yielded 63.64 g/L L-alanine, with overall productivity and yield of 1.91 g/L h and 62.89 g/100 g glycerol, respectively, and only a small amount of acetate (1.73 g/L) was produced as a byproduct. Therefore, the efficient production of L-alanine using glycerol as the sole carbon source is possible, providing an important reference for industrial applications.

Key words: L-alanine; glycerol; *Escherichia coli*; fermentation; metabolic engineering; genetic switch

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[1]。由于 L-丙氨酸具有甜味，也被用于食品添加剂[2]。近年来，L-丙氨酸还被用于合成聚酰胺（polyamides，(PA)s）、聚酯-酰胺（poly(ester-amide)s，(PEA)s）、聚酯酰胺硫（poly(ester-amide-sulfide)s，(PEAS)s）聚酯酰亚胺（poly(ester-imide)s，(PEI)s）等，以制备具有重要工业和商业应用价值的工程塑料[3]。然而，目前 L-丙氨酸生产成本高，是其工业应用的限制因素[4]。近年来，以可再生资源葡萄糖通过微生物发酵合成 L-丙氨酸受到了人们的关注[1]。利用基因工程手段，将外源丙氨酸脱氢酶基因引入 *Escherichia coli* 菌株，在 *E. coli* 中实现了利用葡萄糖为碳源合成 L-丙氨酸，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[2, 4, 5]。然而，未见重组大肠杆菌利用其他碳源合成 L-丙氨酸的报道。

收稿日期：2015-09-08

基金项目：国家自然科学基金项目(31300087)；江苏省自然科学基金项目(BK20130131)

作者简介：周丽（1982-），女，博士，讲师，研究方向：发酵工程

通讯作者：周哲敏（1969-），男，博士，教授，研究方向：酶学与酶工程

甘油是脂肪酸工业和生物柴油制造工业的副产物。近年来，生物柴油的大量制造导致甘油产量巨大（油脂水解生成脂肪酸过程伴随产生 10%甘油），价格也大幅度下降[6]。因此，利用甘油作为发酵原料制造大宗化学品具有丰富、廉价的优势，同时还可降低生物柴油制造业处理副产废物的压力[7]。此外，与葡萄糖、木糖等糖类底物相比，甘油代谢产生更高的还原力，是发酵合成还原性化合物的理想碳源[8]。大肠杆菌可以利用甘油，其代谢途径与糖酵解途径的差别在于产生 3-磷酸甘油醛的过程。甘油代谢为 3-磷酸甘油醛的过程中，产生 1 分子 NADH（厌氧条件下）或者 QH_2（好氧条件下）[9]；而葡萄糖酵解为 3-磷酸甘油醛的代谢过程中，不产生 NADH。3-磷酸甘油醛进一步代谢可产生 1 分子 NADH 用于还原丙酮酸并加氨生成 L-丙氨酸（图 1）。因此，以甘油为碳源发酵合成 L-丙氨酸过程中，还原型辅酶积累，需要适度提供氧气将过剩的还原型辅酶氧化以实现辅酶的回收利用。如果氧气供给量小，会导致过剩的还原型辅酶不能被氧化和回收利用，甘油不能被继续代谢；而氧气供给量过大，会导致用于还原丙酮酸合成 L-丙氨酸的还原型辅酶也经电子传递链氧化，降低了 L-丙氨酸的合成水平（图 1）。因此，控制适度的氧气供给量是高效发酵甘油合成 L-丙氨酸的关键所在。

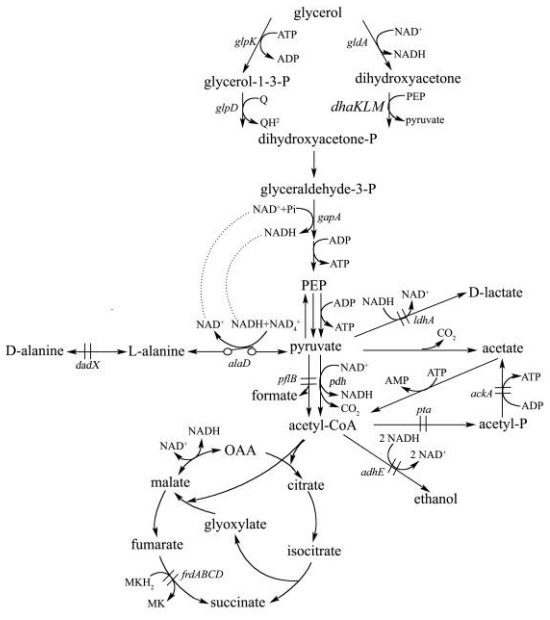


图 1 *Escherichia coli* B0013-060BC 重组菌株发酵甘油产 L-丙氨酸过程中的主要代谢反应

Fig.1 Main metabolic reactions during L-alanine fermentation from glycerol by *Escherichia coli* B0013-060BC

注：基因及所编码的酶：*glpK*，甘油激酶；*glpD*，需氧甘油-3-磷酸脱氢酶；*gldA*，甘油脱氢酶；*dhaKLM*，二羟基丙酮激酶；*gapA*，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；*pflB*，丙酮酸甲酸裂解酶；*pdh*，丙酮酸脱氢酶；*ldhA*，发酵型D-乳酸脱氢酶；*pta*，磷酸转乙酰酶；*ackA*，乙酸激酶；*adhE*，乙醇脱氢酶；*frdABCD*，富马酸还原酶；*dadX*，丙氨酸消旋酶；*alaD*，*Geobacillus stearothermophilus*菌株来源的丙氨酸脱氢酶（ALD）。缩写：PEP，磷酸烯醇式丙酮酸；Q，泛醌；QH_2，泛醇；MK，甲基萘醌；MKH_2，甲基萘醇。丙氨酸脱氢酶的表达受λ p_L启动子开关控制。虚线表示同种代谢化合物。双线表示该菌株中敲除的基因。

本文以删除了副产物乙酸、甲酸、乙醇、琥珀酸、乳酸合成途径的重组 *E. coli* CICIM B0016-050 (Δ*ack-pta* Δ*pflB* Δ*adhE* Δ*frdA* Δ*ldhA*) [10]为出发菌株，将其染色体上的丙氨酸消旋酶编码基因 *dadX* 替换为 p_R-p_L 启动子以及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*，构建出重组菌株 B0016-060BC（图 1）。该重组菌株不具有抗生素抗性基因，L-丙氨酸脱氢酶编码基因稳定存在于染色体上，且可通过温度开关控制 L-丙氨酸合成。进一步考察该菌株发酵甘油合成 L-丙氨酸的性能，获得了较高的 L-丙氨酸合成水平，具有较好的工业应用潜力。本研究探讨以甘油为唯一碳源发酵合成 L-丙氨酸的可能性，有助于促进 L-丙氨酸的工业应用进程。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与引物

菌株 *Escherichia coli* CICIM B0016 为野生型菌株，购于江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心；前期研究中，在菌株 B0016 中依次叠加删除 *ack-pta*、*pflB*、*adhE*、*frdA*、*ldhA* 基因，构建了菌株 B0016-050[10]；菌株 B0016-060BC 由本研究构建。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。质粒 pPL-*alaD* 由前期研究构建[10]；质粒 pPL-*alaD-FRT-kan-FRT* 由本研究构建。所用菌株、质粒见表 1，引物序列见表 2。

Ex*Taq* DNA 聚合酶，Prime star DNA 聚合酶，各种限制性内切酶，T4 DNA 连接酶购于宝生物工程（大连）公司；质粒提取、纯化和胶回收试剂盒购于北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

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	相应特征	来源
Escherichia coli 菌株		
B0016-050	B0016, Δ*ack-pta* Δ*pflB* Δ*adhE* Δ*frdA* Δ*ldhA*	[10]
B0016-060BC	B0016, Δ*ack-pta* Δ*pflB* Δ*adhE* Δ*frdA* Δ*ldhA* Δ*dadX*::$cI^{ts}857$-p_R-p_L-*alaD*-FRT	本研究构建
质粒		
pKD46	Amp^r, *γ β exo* (red recombinase), temperature-conditional replicon	CGSC[b]; [11]
pKD13	Amp^r, Kan^r, FRT-Kan-FRT cassette	CGSC[b]; [11]
pCP20	Amp^r, FLP, temperature-conditional replicon	CGSC[b]; [11]
pPL-*alaD*	Amp^r, *alaD*	[10]
pPL-*alaD-FRT-kan-FRT*	Amp^r, Kan^r, *alaD-FRT-kan-FRT*	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。

表 2 本研究中所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列(5′→3′)	酶切位点
PKD13F-EcoRI	TTT*GAATTC*GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	*Eco*RI
PKD13R-EcoRI	TTT*GAATTC*ATTCCGGGGATCCGTCGACC	*Eco*RI
DadXR-pPL451	ACGTTGCCTCCGATCCGGCTTACAACAAGTTACACCGTCACAACCGGGAC ggctgcaggtgatgattatcagcc[a]	
DadX-pKD13F	CATCACGTCCGGGCCATTTACATGGCGCACACAGCTAAGGAAACGAGATG gtgtaggctggagctgcttc[a]	
YdadXF	GTTTTAATACCGAGCTGTTGCAACCG	
YdadXR	ACATTAACAACTACAGTTGCTGACCAGCC	

注：[a]：小写字母表示与pKD13同源碱基序列。

1.2 培养基

LB 培养基成分为(g/L)：胰蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10。

M9-1 液体培养基成分为(g/L)：$Na_2HPO_4·12H_2O$ 15.1，KH_2PO_4 3.0，NH_4Cl 1.0，NaCl 0.5，$(NH_4)_2SO_4$ 13.2，并补加 0.1%(*V/V*) 1 mol/L $MgSO_4$ 和 0.1%(*V/V*) 的微量元素母液。微量元素成分为(g/L)：$FeCl_3$ $6H_2O$ 2.4，$CoCl_2$ $6H_2O$ 0.3，$CuCl_2$ $2H_2O$ 0.15，$ZnCl_2$ 0.3，Na_2MO_4 $2H_2O$ 0.3，H_3BO_3 0.075，$MnCl_2$ $4H_2O$ 0.495。

1.3 发酵方法

1.3.1 摇瓶发酵方法

将保藏于-80 ℃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 ℃、200 r/min 培养 10 h。8000 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 甘油的 M9-1 液体培养基中（250 mL 三角瓶中），进行好氧-低供氧两阶段发酵培养。好氧菌体生长阶段以 33 ℃、200 r/min 培养至细胞干重（*DCW*）分别达到 0.57、0.95、1.37 g/L，低供氧发酵阶段添加 4 mL 500 g/L 甘油和 4 g $CaCO_3$，42 ℃下，分别于 0、100、150、200 r/min 继续培养 48 h 结束发酵。每组实验进行 3 个平行实验。

1.3.2 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。8000 r/min 离心 5 min，收集 LB 液体培养基中获得的菌体，并以 5%（*V/V*）的接种量接种于 150 mL 含有 5 g/L 甘油的 M9-1 液体培养基中（500 mL 三角瓶中），33 ℃、200 r/min 摇床培养 9 h。

发酵罐接种方式：将上述种子液以 5%（*V/V*）的接种量接种于含有 M9-1 培养基的 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，甘油初始浓度为 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 1 vvm，搅拌转速为 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通量直至 3.3 vvm，同时将搅拌转速与 DO 值关联来控制溶解氧浓度始终大于 40%；使用 NH_4OH 和 10%（*V/V*）H_2SO_4 维持 pH 值为 7.0；发酵温度控制为 33 ℃。当菌体浓度达到 11.5 g/L 时，将发酵罐温度设定为 42 ℃进入低供氧发酵产酸阶段。

低供氧阶段培养方法：第二阶段，空气通量调为 2.3 vvm，搅拌转速与 DO 值关联来控制溶解氧浓度始终大于 10%，用 NH_4OH 来维持 pH 值为 7.0，发酵温度为 42 ℃，并分三次补加 140 g、140 g、76 g 甘油，以维持发酵过程中发酵液甘油浓度高于 10 g/L，当所有补加的甘油消耗尽后即结束发酵。发酵罐发酵进行两次平行实验。

1.4 分析方法

1.4.1 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 g/L *DCW*

1.4.2 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%（*V/V*）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 μm 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 μL 样品中加入 250 μL 0.1 mol/L PITC 乙腈溶液和 250 μL 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 μL 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 μm 有机滤膜过滤后进行高压液相检测。

1.4.3 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。

1.4.4 氨基酸测定方法

色谱柱为 AccQ Tag 3.9×150 mm (Waters)。流动相 A 液为 80%（*V/V*）乙腈水溶液，B 液为 97:3（*V/V*）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。

1.4.5 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。

1.4.6 甘油测定方法

甘油含量用高压液相色谱进行分析，检测器为示差检测器，色谱柱为 Aminex HPX-87H 300×7.8 mm (BIO-RAD)，流动相为 5 mmol/L H_2SO_4，流速为 1 mL/min，柱温为 50 ℃。

1.4.7 数据统计分析

$$转化率=\frac{P_2\times V_2-P_1\times V_1}{G_2\times V_2-G_1\times V_1}\times 100\%$$

$$体积生产强度=\frac{P_2\times V_2-P_1\times V_1}{V_2(t_2-t_1)}$$

其中：*P* 为产物浓度(g/L)，*G* 为甘油浓度(g/L)，*V* 为发酵液体积(L)，*t* 为时间(h)。

2 结果与讨论

2.1 *E. coli* B0016-060BC 重组菌株的构建

用 Datsenko 等[11]报道的基因删除方法将温度调节型基因开关 p_R-p_L 以及来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 菌株的 *alaD* 基因整合于 *E. coli* B0016-050 菌株染色体上并将 *dadX* 基因替换。其具体过程为：

首先，构建重组质粒 pPL-*alaD-FRT-kan-FRT*。用引物 PKD13F-EcoRI 和 PKD13R-EcoRI 扩增质粒 pKD13 上的 *FRT-kan-FRT* 基因片段，克隆于丙氨酸脱氢酶基因表达质粒 pPL-*alaD* 上的 *Eco*RI 酶切位点，获得重组质粒 pPL-*alaD-FRT-kan-FRT*。用 *Eco*RI 酶切重组质粒 pPL-*alaD-FRT-kan-FRT* 获得了 5.51 kb 和 1.30 kb 两条电泳条带（如图 2），进一步通过 DNA 测序验证，表明该重组质粒构建成功。

其次，以重组质粒 pPL-*alaD-FRT-kan-FRT* 为模板，用引物 DadXR-pPL451 和 DadX-pKD13F 进行 PCR 扩增，获得两端各具有 50 bp *dadX* 基因的同源序列、中部为 $cI^{ts}857$-p_R-p_L-*alaD-FRT-kan-FRT* 的突变盒基因片段。将该突变盒片段转化入含有 pKD46 质粒的 B0016-050 菌株中，借助质粒 pKD46 上的 Red 重组系统将突变盒整合于染色体上 *dadX* 基因处，卡那霉素抗性平板上获得的转化子 B0016-061BC 用验证引物 YdadXF 和 YdadXR 进行菌落 PCR 验证，获得了 4.41 kb 电泳条带（图 3），而原始菌株 B0016-050 应获得

1.51 kb 电泳条带（图 3），表明染色体上 *dadX* 基因成功被突变盒基因片段替换。最后用 pCP20 质粒去除重组菌中的卡那抗性基因，并进一步用 YdadXF 和 YdadXR 引物进行 PCR 验证，获得 3.19 kb 电泳条带（图 3），表明成功获得了 B0016-060BC 菌株。

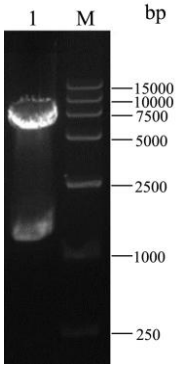


图 2 pPL-*alaD-FRT-kan-FRT* 重组质粒酶切鉴定电泳图谱

Fig.2 Restriction enzyme digestion of recombinant vector pPL-*alaD-FRT-kan-FRT*

注：1: *Eco*RI酶切重组质粒pPL-*alaD-FRT-kan-FRT*；M: DL15000 marker。

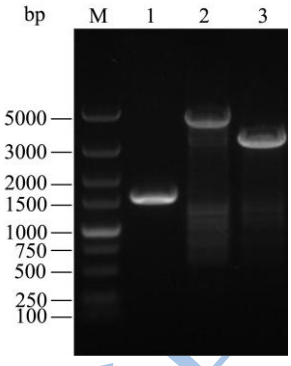


图 3 *E. coli* B0016-060BC 菌株突变基因的 PCR 鉴定电泳图谱

Fig.3 PCR identification of gene mutations in *E. coli* B0016-060BC

注：M: DL5000 marker; 1: B0016-050 菌株 PCR 产物; 2: B0016-061BC 菌株 PCR 产物; 3: B0016-060BC 菌株 PCR 产物。

前期研究中，我们利用温控开关策略在质粒水平调控 L-丙氨酸脱氢酶基因的表达，可在菌体生长阶段严格阻断 L-丙氨酸的合成，有效解决 L-丙氨酸积累抑制菌体生长的问题，并在产物合成阶段高效开启 L-丙氨酸合成途径，实现了以葡萄糖为唯一碳源的 L-丙氨酸高效合成[10]。本文进一步将 L-丙氨酸脱氢酶基因及其温控调节元件整合于大肠杆菌染色体上，相对于前期在质粒水平表达 L-丙氨酸脱氢酶的报道[2,5,10]更具有优势：目的基因可以稳定地遗传；不需在培养液中添加抗生素；目的基因及其调控系统为单一拷贝，不会因过量表达而增加细胞负担，甚至使细胞代谢失衡降低菌株生长活力[12]；多项研究已表明，目的基因的适度表达而非过量表达可获得更高产量的目的代谢化合物[13]，同时在前期研究中发现，在目的基因可进行高效表达的前提下，将目的基因整合于染色体上通常比质粒水平表达获得的目的代谢产物的产量高。

2.2 培养条件对 B0016-060BC 菌株发酵甘油合成 L-丙氨酸的作用

前期研究中，用 p_L 启动子成功调控了 D-乳酸发酵过程，并优化了调控基因开关的最佳温度（33 ℃阻断基因开关、进行菌体生长，42 ℃开启基因开关、进行诱导及发酵）[14]。本文利用该最佳培养温度对甘油发酵合成 L-丙氨酸过程中通气量及 L-丙氨酸合成起始点的作用进行进一步研究。

2.2.1 通气量对 B0016-060BC 菌株发酵甘油合成 L-丙氨酸的作用

大肠杆菌以甘油为底物合成 L-丙氨酸过程中还原力的积累量大于消耗量，需要适当提供氧气作为电子传递链的最终电子受体来消耗过剩的还原力，以促进辅酶 I 的高效回复利用和代谢流的高效运行。摇瓶转速是影响摇瓶供氧的主要因素，因此，本文首先考察发酵阶段摇瓶转速对 L-丙氨酸合成的作用。

菌株 B0016-060BC 好氧阶段培养至细胞干重 1.37 g/L，低供氧发酵阶段分别于 0、100、150、200 r/min 继续培养 48 h 结束发酵。每组实验进行 3 个平行实验。结果如图 4 所示，提高第二阶段摇瓶转速可提高 L-丙氨酸的得率和生产强度，摇瓶转速为 200 r/min 时获得最高 L-丙氨酸合成量。表明，以甘油为唯一碳源进行 L-丙氨酸高效合成需要提供较充足的氧气量。

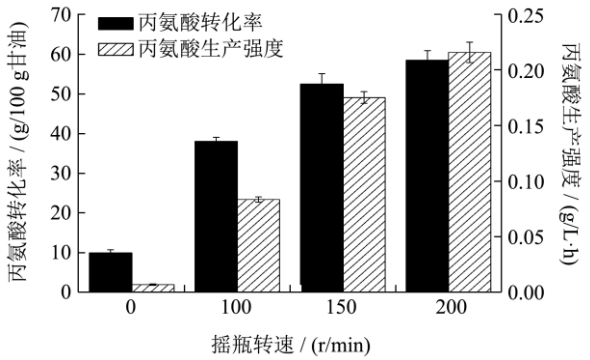


图 4 摇瓶转速对 B0016-060BC 菌株 L-丙氨酸合成的作用

Fig.4 Effect of shaking speed on L-alanine production by B0016-060BC

2.2.2 B0016-060BC 菌株 L-丙氨酸发酵生产起

始点的确定

代谢途径中关键酶的活性在好氧阶段的不同时期会发生变化[12]，因此菌体生长阶段和产物合成阶段的转折点对 L-丙氨酸合成可能具有影响。

菌体生长阶段分别在菌体浓度达到 0.57、0.95、1.37 g/L 时将培养温度调节为 42 ℃，同时摇瓶转速设定为 200 r/min，诱导表达丙氨酸脱氢酶进行 L-丙氨酸发酵合成，以考察热诱导表达丙氨酸脱氢酶的时机对 L-丙氨酸合成的影响。如图 5 所示，相对于对数生长前、中期（菌体浓度分别为 0.57 和 0.95 g/L），在菌体生长至对数后期（菌体浓度为 1.37 g/L）开始诱导丙氨酸脱氢酶基因表达并发酵合成 L-丙氨酸，可获得更高的 L-丙氨酸得率和转化率。

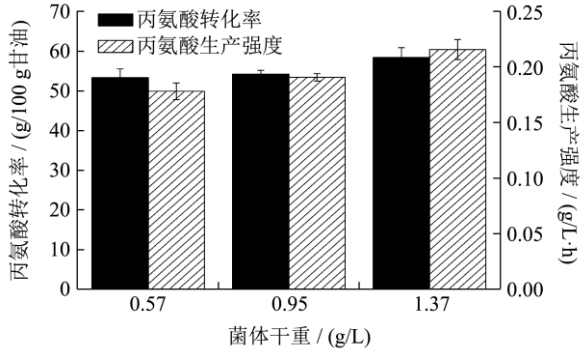


图 5 热诱导时机对 B0016-060BC 菌株 L-丙氨酸合成的作用

Fig.5 Effect of thermo-induction on L-alanine production by B0016-060BC

注：菌体干重指菌体生长和L-丙氨酸发酵合成两个阶段转折点所达到的菌体量。

2.3 B0016-060BC 菌株发酵罐发酵甘油合成 L-丙氨酸

本文进一步在 5 L 发酵罐中考察菌株 B0016-060BC 发酵甘油合成 L-丙氨酸的效果。由于发酵罐发酵供氧强度远大于摇瓶发酵实验，需要重新设定发酵罐氧气的供给水平。初步设定在菌体生长阶段控制溶解氧浓度大于 30%以提供充足氧气进行菌体生长，而在 L-丙氨酸发酵阶段适度降低溶解氧浓度为 10%以保留适量还原型辅酶进行 L-丙氨酸发酵合成。此外，根据摇瓶发酵结果，初步确定发酵罐中菌体生长至对数后期，菌体浓度达到 11.46 g/L 时开始低供氧发酵。

发酵过程中 L-丙氨酸、菌体和甘油浓度变化情况如图 6 所示。在菌体生长阶段控制较低温度（33 ℃），使得 L-丙氨酸的合成量可控制在极低的水平（0.22 g/L），保证了菌体的快速生长。经 42 ℃诱导并适度提高氧气的供给量，L-丙氨酸开始快速合成，表明 L-丙氨酸脱氢酶的表达被启动同时实现了还原力的有效循环，促使了 L-丙氨酸的合成。最终发酵液中，L-丙氨酸产量达 63.64 g/L。第二阶段 L-丙氨酸体积生产强度达到 2.85 g/(L ħ)，整个发酵阶段体积生产强度达到 1.91 g/(L ħ)。第二发酵阶段 L-丙氨酸转化率可达 71.64 g/100 g 甘油，整个发酵阶段 L-丙氨酸转化率也可达到 62.89 g/100 g 甘油。发酵液中主要副产物是乙酸（1.73 g/L），副产物甲酸、丙酮酸、乳酸、琥珀酸和乙醇含量都低于 0.5 g/L。

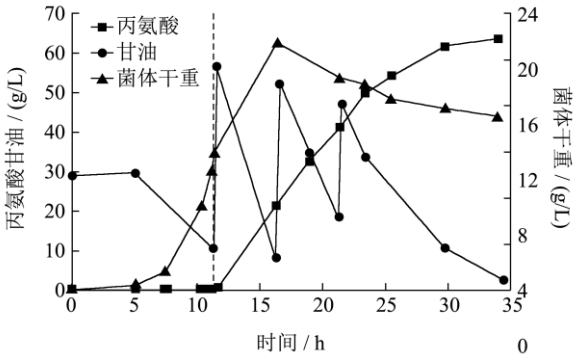


图 6 菌株 B0016-060BC L-丙氨酸发酵过程

Fig.6 L-alanine production from fermentation by *E. coli* B0016-060BC

注：■：丙氨酸；□：甘油；●：细胞干重（*DCW*）. 虚线表示发酵由33 ℃、好氧培养阶段转为42 ℃、限氧培养阶段。

甘油发酵合成 L-丙氨酸过程中，需要适度提供氧气将过剩的还原型辅酶氧化以实现辅酶的回收利用，同时推动代谢流高效运行。本文控制 L-丙氨酸发酵阶段 DO 值为 10%，推测菌体主要通过 GlpK 和 GlpD 好氧途径降解甘油（图 1），使得最大限度地减少 NADH 的生成量，可保证 NADH 辅酶在 GapA 和 AlaD 催化的反应中进行高效循环，最终促使 L-丙氨酸快速合成。如果降低 DO 值，甚至将 DO 值控制为 0，通过 GldA 和 DhaKLM 厌氧途径代谢甘油，会导致 L-丙氨酸合成速率显著降低（数据未显示），该结果也证实了上述推测。然而，L-丙氨酸发酵合成阶段通入氧气也导致菌体大量积累，降低了 L-丙氨酸的转化率，进一步对丙酮酸脱氢酶活性进行开关控制，在 L-丙氨酸发酵合成阶段通过阻断三羧酸循环来控制菌体生长，必将提高 L-丙氨酸的转化率，相关研究工作正在进行。

3 结论

本文构建了染色体上整合 λp_L 启动子及丙氨酸脱氢酶的温度调控型 L-丙氨酸合成重组菌株 *E. coli* B0016-060BC。该菌株摇瓶培养最佳条件为：低温（33 ℃）下菌体生长至浓度为 1.37 g/L（对数后期）

进入高温（42 ℃）L-丙氨酸合成阶段，L-丙氨酸合成阶段最佳摇瓶转速为 200 r/min。经 5 L 发酵罐培养，菌株 B0016-060BC 可利用甘油合成 63.64 g/L L-丙氨酸，整个发酵阶段体积生产强度达到 1.91 g/(L·h)，转化率达到 62.89 g/100 g 甘油，显示出较好的生产潜力，为发酵甘油合成 L-丙氨酸的工业化提供借鉴。

参考文献

[1] Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, et al. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(6): 588-592

[2] 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

[3] Mallakpour S, Dinari M. Progress in synthetic polymers based on natural amino acids [J]. Journal of Macromolecular Science Part A -Pure and Applied Chemistry, 2011, 48(8): 644-679

[4] Zhang X, 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

[5] 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

[6] Yazdani SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(3): 213-219

[7] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes [J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(6): 877-902

[8] Clomburg JM, Gonzalez R. Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2): 419-434

[9] Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 103(1): 148-161

[10] 周丽,邓璨,崔文璟,等.温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 L-丙氨酸[J].微生物学通报,2015,DOI: 10.13344/j.microbiol.china.150072
ZHOU Li, Deng Can, Cui Wen-jing, et al. L-Alanine production in recombinant *Escherichia coli* with thermo-regulated genetic switch [J]. Microbiology China, 2015, DOI: 10.13344/j.microbiol.china.150072

[11] Datsenko K A, Wanner B L. 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

[12] Yuan LZ, Rouvière PE, LaRossa RA, et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli* [J]. Metabolic Engineering, 2006, 8(1): 79-90

[13] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(36): 12678-12683

[14] Zhou L, Niu D, Tian K, et al. Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(5): 560-568

现代食品科技